

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

FERNANDA ABRANTES NASCIMBENI

**Avaliação da produção biológica de hidrogênio em
reator em batelada sob condição termófila**

São Carlos, SP

2013

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.

N244a

Nascimbeni, Fernanda Abrantes

Avaliação da produção biológica de hidrogênio em reator em batelada sob condição termófila / Fernanda Abrantes Nascimbeni; orientadora Maria Bernadete Amâncio Varesche. São Carlos, 2013.

Monografia (Graduação em Engenharia Ambiental) --
Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de
São Paulo, 2013.

1. hidrogênio. 2. fermentação. 3. sacarose. 4.
bacilos gram-positivos. I. Título.

Fernanda Abrantes Nascimbeni

Avaliação da produção biológica de hidrogênio em reator em batelada sob condição termófila

Monografia apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Engenharia Ambiental.

Orientadora: Prof. Dra. Maria Bernadete Amâncio Varesche

São Carlos, SP

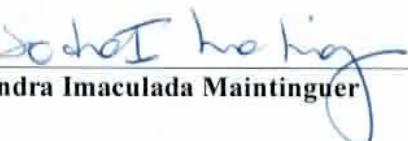
2013

FOLHA DE APROVAÇÃO

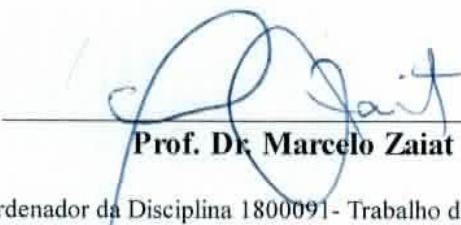
Candidato(a): **Fernanda Abrantes Nascimbeni**

Monografia defendida e aprovada em: **08/02/2013** pela Comisão Julgadora:


Maria Bernadete Amancio Varesche Silva


Sandra Imaculada Maintinguer


Carolina Zampol Lazaro


Prof. Dr. Marcelo Zaiat

Coordenador da Disciplina 1800091- Trabalho de Graduação

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, que acreditaram em mim até nos momentos que nem eu mesma acreditei.

À professora Dra. Maria Bernadete Amâncio Varesche, pela oportunidade e orientação no trabalho.

À Carol Zampol, pela orientação e auxílio durante todas as fases do trabalho.

Ao pessoal do LPB: Janja, Isabel, Sandra, Tiago, Dago e todos os outros que sempre se mostraram dispostos a ajudar quando precisei.

À Universidade de São Paulo, por propiciar todas as experiências vivenciadas na graduação.

Aos “Piores”, pela amizade, incentivo e ajuda em todos os períodos da faculdade. Em especial ao Guto e ao Marco, pelas sugestões e auxílios durante este trabalho.

Meus sinceros agradecimentos.



ÀS VEZES EU ACHO QUE O INDÍCIO
MAIS ÓBvio DE QUE EXISTEM FORMAS
DE VIDA INTELIGENTE FORA DA TERRA
é QUE NENHUMA DELAS TENTOU
ENTRAR EM CONTATO CONOSCO.

RESUMO

Nascimbeni, F. A. - *Avaliação da produção biológica de hidrogênio em reator em batelada sob condição termófila.* – Monografia (Trabalho de Graduação) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos, 2013.

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a produção de hidrogênio por consórcio microbiano enriquecido em reatores anaeróbios em batelada à 55°C utilizando sacarose como substrato.

Para a obtenção e enriquecimento do consórcio de bactérias anaeróbias produtoras de hidrogênio realizou-se tratamento térmico de inóculo proveniente de lodo de reator UASB utilizado no tratamento de águas residuárias de abatedouro de aves. Tal inóculo foi utilizado em ensaios de avaliação da produção de H₂, realizados em triplicata, em meio de cultivo Del Nery (1987) modificado com adição de sacarose como substrato em diferentes concentrações (0,6; 1,2; 2,1 e 5,5 g/L) e pH inicial ajustado à 5,5.

Observou-se ocorrência de seleção da comunidade microbiana, composta por bacilos gram-positivos, durante o enriquecimento da biomassa.

Em todos os reatores foi observada produção de H₂. O rendimento máximo de produção (1,68 mol H₂ / mol sacarose) foi observado no ensaio com 2,1 g/L de sacarose, com 21% de conversão teórica de sacarose a hidrogênio. Sob tal condição foi observada a menor produção de ácido acético (21,80 mg/L) e a maior produção de etanol (74,29 mg/L).

De acordo com análises de DGGE, é possível concluir que a concentração de substrato influenciou na seleção da comunidade microbiana. O ensaio com menor rendimento de produção de H₂ (0,6 g/L de sacarose iniciais), apresentou maior diversidade microbiana, ou seja, menor purificação da comunidade microbiana.

Palavras-chave: hidrogênio, fermentação, sacarose, bacilos gram-positivos.

ABSTRACT

Nascimbeni, F. A. - *Evaluation of biological hydrogen production in batch reactor under thermophilic condition* – Monograph (Bachelor Thesis) - School of Engineering of São Carlos, University of São Paulo, 2013.

This study aimed to evaluate the hydrogen production by enriched microbial consortium in anaerobic batch reactors at 55°C using sucrose as substrate.

To obtain a consortium of anaerobic hydrogen producing bacteria, thermal treatment was done with the inoculum from a UASB reactor used in wastewater treatment of poultry slaughterhouse. This inoculum was used in tests assessing the production of H₂ performed in triplicate in Del Nery (1987) culture medium modified by the addition of sucrose as substrate at different concentrations (0,6; 1,2; 2,1 and 5,5 g/L) and initial pH adjusted to 5,5.

The microbial consortium consisted predominantly by gram-positive bacilli.

For all sucrose concentrations it was observed H₂ production. The highest hydrogen yield was 1,68 mol H₂/mol sucrose for the assay with 2,1 g sucrose /L. It represents 21% of theoretical yield. This same assay showed the lowest production of acetic acid (21,80 mg/L) and the highest production of ethanol (74,29 mg/L).

According to DGGE analysis, it is possible to conclude that substrate concentration influenced the microbial population's selection. The assay with a lower yield of H₂ (0,6 g sucrose/L) showed higher microbial diversity, that is, less purification of microbial community.

Keywords: hydrogen, fermentation, sucrose, gram-positive bacilli.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS.....	3
2.1	Objetivo Geral	3
2.2	Objetivos Específicos	3
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
3.1	Hidrogênio	5
3.2	Produção biológica de hidrogênio	6
3.3	Substratos utilizados na produção de hidrogênio	9
3.4	Microrganismos termofílicos utilizados para produção de hidrogênio	10
3.5	Influência do pH na produção biológica de hidrogênio	11
3.6	Influência da temperatura na produção biológica de hidrogênio	12
3.7	Produção biológica de H ₂ em reatores alimentados com sacarose	13
4	MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1	Inóculo	21
4.2	Meio de Cultivo	21
4.3	Enriquecimento do consórcio microbiano	23
4.4	Ensaios de produção de hidrogênio e ácidos orgânicos	23
4.5	Análises cromatográficas	24

4.6	Avaliação do consumo de substrato	25
4.7	Análises Microbiológicas	25
4.8.	Ajuste dos dados experimentais	27
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5.1	Obtenção e enriquecimento do consórcio microbiano	29
5.2	Ensaios de produção de hidrogênio	30
5.3.	Análises Microbiológicas	46
6.	CONCLUSÕES	49
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 - Estrutura Molecular da Sacarose	9
Figura 4.1 - Fluxograma experimental	20
Figura 4.2 - Modelo esquemático do reator em batelada e retirada de amostra gasosa .	24
Figura 5.1 - Reatores anaeróbios para obtenção e enriquecimento do consórcio microbiano produtor de H ₂ : etapas A a D	29
Figura 5.2 - Produção acumulada de hidrogênio ajustados ao modelo modificado de Gompertz nos ensaios com (A) 0,6 g/L; (B) 1,2 g/L ; (C) 2,1 g/L e (D) 5,5 g/L de sacarose.....	31
Figura 5.3 – Relação entre potencial de produção de hidrogênio (P) e concentração inicial de sacarose.....	33
Figura 5.4 – Relação entre duração da fase <i>lag</i> e concentração inicial de sacarose	34
Figura 5.4 – Relação entre o rendimento de produção de hidrogênio e concentração inicial de sacarose.....	36
Figura 5.6 - Variação temporal da produção acumulada de H ₂ (▲ - eixo da esquerda) e da concentração de substrato (■ - eixo da direita) com (A) 0,6 g/L; (B) 1,2 g/L ; (C) 2,1 g/L e (D) 5,5 g/L de sacarose.....	41
Figura 5.7 - Microscopia óptica de luz comum de bacilos	46
Figura 5.8 - Dendograma para os ensaios com 0,6; 1,2; 2,1 e 5,5 g/L de sacarose.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 - Composição do substrato sintético	22
Tabela 4.2 - Compostos adicionados ao meio de cultivo	23
Tabela 5.1 – Tempo de enriquecimento após o tratamento do inóculo	29
Tabela 5.2 – Parâmetros obtidos por meio do modelo de Gompertz modificado	32
Tabela 5.3 – Resultados obtidos nos ensaios de produção de hidrogênio	34
Tabela 5.4 – Rendimento de conversão de sacarose a hidrogênio e eficiência de conversão teórica	35
Tabela 5.5 - Consumo de sacarose	39
Tabela 5.6 - Produção de hidrogênio por microrganismos em consórcios microbianos ..	45

x

1 INTRODUÇÃO

A revolução industrial marcou significativamente o início de um processo de modificações da humanidade para com a economia, a tecnologia e o meio ambiente. Tal revolução representou o grande aumento na utilização de combustíveis fósseis como fonte de energia. Primeiramente, o carvão vegetal em máquinas a vapor e, posteriormente, a utilização de derivados de petróleo.

A partir da grande crise do petróleo, que ocorreu na década de 70, passou-se a buscar alternativas energéticas a fim de suprir a utilização do petróleo e, neste cenário, o hidrogênio surgiu como uma possível nova fonte de energia. Atualmente, sabe-se que 80% da demanda global de energia provêm de combustíveis fósseis que, além de não serem renováveis, são uma grande ameaça para o equilíbrio do planeta por serem muito poluentes (BBC, 2012). Em tal cenário, o hidrogênio destaca-se como um combustível alternativo devido a sua eficiência elevada de conversão, reciclagem e de natureza não poluente.

O hidrogênio pode ser produzido a partir de combustíveis fósseis, água e biomassa. A estabilidade de processos biológicos de produção de hidrogênio dependem de fatores como pH, alcalinidade, temperatura, carga orgânica, concentração de compostos tóxicos ou inibidores e tempo de detenção hidráulica (FUJISHIMA *et al.*, 2000). Para que o processo de bioprodução de hidrogênio seja estável, faz-se necessário, muitas vezes, o controle dos parâmetros operacionais.

Os processos de produção biológica de hidrogênio podem ser classificados em três categorias principais: biofotólise da água utilizando algas e cianobactérias; fotodecomposição de compostos orgânicos por bactérias fotossintéticas (fotofermentação) e produção fermentativa de hidrogênio a partir de resíduos orgânicos (HALLENBECK & GHOSH, 2009).

Dentre os processos biológicos, a fermentação é indicada como a melhor opção para a produção do gás hidrogênio. Isto porque é possível produzir hidrogênio constantemente em biorreator a partir de substratos orgânicos, com velocidade alta de produção e sem necessidade de fornecimento de luz, como não ocorre no processo fototrófico de produção de H₂. Além disso, existe a possibilidade de utilização de substratos simples, tais como açúcares puros (glicose e sacarose), e também águas residuárias, como, por exemplo, melaço de cana-de-açúcar (NICODEMOS *et al.*, 2008).

Também deve ser considerado que, em processos biológicos fermentativos, há a produção de ácidos orgânicos concomitantemente com hidrogênio, o que também torna interessante os processos de tratamento de efluentes, pois, além da possível utilização do hidrogênio gerado, subprodutos, como ácidos graxos voláteis (AGVs), também podem ser aproveitados. Assim, é possível agregar valor ao tratamento através de seus subprodutos, intensificando o interesse econômico pelo processo, além de benéfico ao meio-ambiente.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a produção de hidrogênio utilizando concentrações diferentes de sacarose, em condição termófila.

2.2 Objetivos Específicos

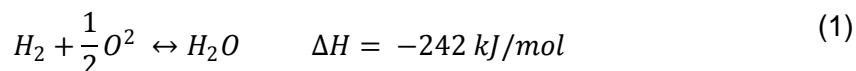
- I. Obter consórcio de bactérias anaeróbias termófilas produtoras de hidrogênio a partir de lodo granulado mesófilo;
- II. Avaliar a produção de hidrogênio utilizando concentrações diferentes de sacarose;
- III. Avaliar a geração de ácidos orgânicos e álcoois;
- IV. Caracterizar a diversidade morfológica microbiana.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Hidrogênio

O hidrogênio, elemento composto por um próton e um elétron, é o mais leve e abundante no universo, perfazendo cerca de três quartos de toda a matéria. É encontrado em combinações com outros elementos, isto porque é um elemento de grande instabilidade e, consequentemente, bastante reativo. No estado livre só pode ser encontrado na atmosfera em pequenas quantidades (MMA, 2012).

O hidrogênio possui elevado calor de combustão comparado a outros combustíveis: enquanto a queima do metano e do etanol liberam 50 e 26,5 kJ/g, respectivamente, a queima do hidrogênio libera 121 kJ/g, tendo como subproduto um mol de água, conforme Reação 1 (BARTACEK *et al.*, 2007).



O fato do hidrogênio produzir apenas água quando é queimado como combustível ou convertido à eletricidade, faz com que seja considerado um combustível não poluente (WANG & WAN, 2009).

Das & Veziroglu (2001) citam que, entre suas aplicações, o hidrogênio tem sido utilizado como reagente nos processos de hidrogenação, para remoção química de oxigênio e para evitar processos de oxidação e corrosão de materiais. Atualmente, tem-se observado também o aumento considerável dos estudos sobre o potencial do hidrogênio como carreador de energia (LEITE *et al.*, 2008).

3.2 Produção biológica de hidrogênio

Segundo Vijayaraghavan e Soom (2004), 96% da geração de hidrogênio no mundo provêm de processos de produção de hidrogênio a partir de combustíveis fósseis. Estes processos de produção são os seguintes: (a) reforma do gás natural; (b) craqueamento térmico do gás natural; (c) oxidação parcial de hidrocarbonetos; e (d) gaseificação do carvão. A partir da água, a obtenção de hidrogênio ocorre, principalmente, por eletrólise, fotólise, processos termoquímicos, decomposição termal direta e produção biológica. A partir da decomposição da biomassa também é possível produzir hidrogênio pela gaseificação ou pirólise com emissão de mistura dos seguintes gases: H₂, CH₄, CO, CO₂ e N₂ (DAS & VEZIROGLU, 2001).

Certos microrganismos, os quais possuem a enzima hidrogenase, tem a capacidade de produzir hidrogênio por meio da combinação de prótons (H⁺) e elétrons (e⁻) (Reação 2).



A hidrogenase associa-se ao sistema de transporte de elétrons e torna-se inativa na presença de oxigênio, característica que pode dificultar o processo de enriquecimento e purificação desta enzima, a fim de ser utilizada em processos de produção de hidrogênio (VIGNAIS & BILLOUD, 2007).

A produção biológica de hidrogênio é realizada pelos microorganismos por meio de duas vias principais: fermentação e fotossíntese. Processos fotossintéticos incluem a biofotólise de água por meio da aplicação de algas e cianobactérias, enquanto a

fotodecomposição de compostos orgânicos ocorre pela ação de bactérias fototróficas anoxigênicas. A produção fermentativa de hidrogênio a partir de compostos orgânicos ocorre a partir da aplicação de bactérias fermentativas (NANDI & SENGUPTA, 1998). Destaca-se também a possibilidade de obtenção desse gás por meio da aplicação de sistema híbrido em reator em condição fermentativa e fototrófica, separadamente (DAS & VERIROGLU, 2001).

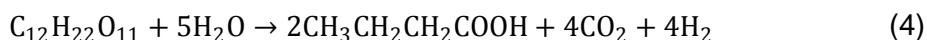
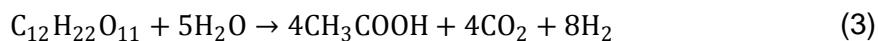
Dentre as formas de obtenção biológica de hidrogênio, a produção fermentativa é tecnicamente simples, utilizando matérias-primas renováveis, como carboidratos, constituintes das águas residuárias (HAN & SHIN, 2004). A utilização de matérias-primas renováveis independe da disponibilidade de combustíveis fósseis, que contribuem para o aumento da concentração de gases do efeito estufa decorrentes da sua combustão.

A etapa fermentativa da digestão anaeróbia de resíduos orgânicos é o processo chave na produção de hidrogênio. Isto porque é nesta etapa que microrganismos acidogênicos decompõem carboidratos, tais como glicose e sacarose, em H₂, CO₂ e AGVs.

Kim & Kim (2012) analisaram diversas fontes de carbono (tais como sacarose, xilose, glicose, amido, entre outras) em reator em batelada (250 mL) com pH inicial ajustado à 6,8 e bloqueio da queda abaixo de 5,5 através da adição de NaOH 1 N. A partir da análise de ácidos orgânicos, os autores verificaram que as fontes de carbono podem regular vias metabólicas, resultando em quantidades diferentes de produção de ácido orgânico e, consequentemente, diferentes rendimentos

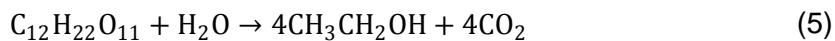
de H₂. O ensaio com 3 g DQO/L de xilose resultou no menor rendimento de produção de H₂ (1,77 mol H₂/mol hexose), na maior produção de ácido lático (554 mg DQO/L) e na segunda menor produção de ácido butírico (780 mg DQO/L). O ensaio com 3 g DQO/L de sacarose resultou no maior rendimento de produção de H₂ (3,17 mol H₂/mol hexose), na maior produção de ácido acético (1.279 mg DQO/L), na terceira menor produção de ácido butírico (822 mg DQO/L) e não foi detectada produção de ácido lático.

A conversão da sacarose a hidrogênio e ácido acético pode ser observada na Reação 3 e a conversão da sacarose a hidrogênio e ácido butírico pode ser observada na Reação 4.



Ácido acético e ácido butírico são os principais produtos finais da fermentação, com rendimento máximo de hidrogênio de 8 e 4 mol de H₂/mol de sacarose, respectivamente. Na prática, entretanto, outros produtos são identificados, tais como ácido propiônico, ácido isobutírico e ácido caprônico (DAS & VEZIROGLU, 2001).

Além disso, a fermentação da sacarose pode assumir a rota de produção de etanol, conforme a Reação 5, na qual não ocorre produção de hidrogênio, e a rota de produção de etanol e hidrogênio concomitantemente, apresentada na Reação 6, com rendimento máximo de produção de 4 mol H₂/mol sacarose (ZHU *et al.*, 2009; RODRIGUES, 2011).



Uma série de fatores podem afetar a produção biológica, tais como tipo de substrato, origem do inóculo, pH e temperatura.

3.3 Substratos utilizados na produção de hidrogênio

Segundo Hallenbeck (2004), a geração de hidrogênio por meio do processo fermentativo pode ocorrer a partir da utilização de diversos substratos, com culturas mistas ou puras.

A glicose é o substrato mais utilizado, seguido pela sacarose (FERNANDES, 2008). Esta situação justifica-se devido a tais carboidratos serem substratos facilmente degradáveis, o que facilita o entendimento do processo. Apesar disso, vem crescendo a quantidade de pesquisas com substratos mais complexos, tal como água residuária.

A sacarose ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$), utilizada como substrato no presente estudo, é um glicídio formado por uma molécula de glicose e uma de frutose. Esta substância encontra-se em abundância na cana-de-açúcar, frutas e beterraba. A estrutura molecular da sacarose, bem como sua constituição, pode ser observada na Figura 3.1.

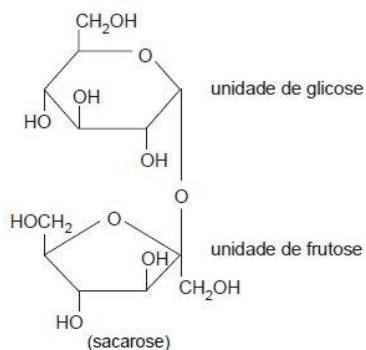


Figura 3.1 - Estrutura Molecular da Sacarose

Tal açúcar pode ser facilmente encontrado em águas residuárias de diversas indústrias, principalmente do ramo alimentício e de bebidas, além da possibilidade de ser encontrada em esgoto doméstico (MAINTINGUER *et al.*, 2008), o que também justifica a escolha de tal glicídio como substrato.

3.4 Microrganismos termofílicos utilizados para produção de hidrogênio

Diversas fontes de inóculo podem ser utilizadas para produção de hidrogênio. Desde culturas puras até culturas mistas, que podem ser encontradas, por exemplo, em diversos lodos de sistemas de tratamento anaeróbio de efluentes.

Os microrganismos relacionados à produção biológica de hidrogênio são classificados em quatro grupos: anaeróbios estritos, anaeróbios facultativos, aeróbios e fototróficos (FANG *et al.*, 2006). Dentre as bactérias fermentativas podem-se citar as espécies *Clostridium*, anaeróbios estritos, e *Entherobacter* e *Bacillus*, que são microrganismos facultativos (MADIGAN *et al.*, 2004).

Na utilização de inóculos com diversos microrganismos, como lodos de sistemas de tratamento de efluentes, é necessário realizar pré-tratamentos a fim de inibir a atividade de microrganismos metanogênicos, que consomem o hidrogênio no processo de produção de metano (KIM *et al.*, 2006).

Dentre os métodos utilizados para suprimir a atividade metanogênica, destaca-se o tratamento térmico descrito por Kim *et al.*

(2006). Contudo, Kraemer & Bagley (2007) afirmaram que o tratamento térmico pode prejudicar a produção de hidrogênio. Isto porque tal tratamento irá selecionar somente os microrganismos formadores de endósporos. Entretanto, alguns microrganismos que não possuem capacidade de esporular, tais como *Enterobacter* e *Citrobacter*, também são capazes de produzir hidrogênio.

Espécies de *Clostridium* são as mais citadas na bibliografia como produtoras anaeróbias de hidrogênio. Tais espécies são Gram-positivas e acidofílicas (desenvolvem-se melhor em pH ácido, com valor próximo a 4) (FANG *et al.*, 2006).

Microorganismos termofílicos, tais como os do gênero *Thermoanaerobacterium* e *Caloramator*, também são identificados como produtores de hidrogênio (LIU *et al.*, 2003; SHIN & YOUN, 2005; HNIMAN *et al.*, 2010).

Bactérias acidogênicas, como *Clostridium* e *Bacillus*, possuem capacidade de formar endósporos a fim de se protegerem de condições desfavoráveis, tais como condições extremas de acidez, alcalinidade, temperaturas e dessecação (ausência de umidade no meio) (MADIGAN *et al.*, 2004).

3.5 Influência do pH na produção biológica de hidrogênio

O controle do pH é extremamente importante, uma vez que influencia diretamente a velocidade de produção de hidrogênio e a ação de microrganismos hidrogenotróficos (consumidores de hidrogênio) (FANG & LIU, 2002).

Lay *et al.* (1999) constataram que valor de pH abaixo de 4,7 inibiu a atividade da hidrogenase, essencial para o processo de produção de hidrogênio. Segundo MU *et al.* (2007), valor de pH 5,5 optimiza a produção de hidrogênio.

3.6 Influência da temperatura na produção biológica de hidrogênio

A temperatura está diretamente associada com a atividade microbiana e com a solubilidade do hidrogênio na fase aquosa. Segundo a Lei de Henry, temperaturas elevadas reduzem a solubilidade de gases na fase aquosa e, consequentemente, sua interação com os microrganismos presentes no processo, o que desfavorece o consumo do gás para geração de outros produtos do processo fermentativo. Hallenbeck (2005) afirma que rendimentos mais elevados são obtidos em processo fermentativo em condição termófila quando comparado com aquele de condição mesófila.

Além disso, o estudo de produção de hidrogênio em temperaturas elevadas é importante, já que diversas águas residuárias, potenciais fontes de produção de hidrogênio, são lançadas nestas temperaturas, como, por exemplo, a vinhaça de cana-de-açúcar, que é emitida dos aparelhos de destilação de 85 a 90°C (ROSSETTO, 1987).

Segundo Levin *et al.* (2006) e Yokoyama *et al.* (2007), para *Clostridium thermocellum* e *Clostridium cellulosi*, a temperatura ótima de produção foi a 60°C. Contudo, Mu *et al.* (2007) observaram 34,6°C como temperatura ótima para a produção de hidrogênio para cultura mista em

reator em batelada (5L), com inóculo proveniente de reator anaeróbio de fluxo ascendente utilizado para tratamento de água residuária de citrato.

3.7 Produção biológica de H₂ em reatores alimentados com sacarose

Khanal *et al.* (2004) pesquisaram produção biológica de hidrogênio a partir de sacarose e amido (ambos com 150 g/L) em valores iniciais diferentes de pH. Os autores realizaram os experimentos em reatores em batelada de 250 mL, sob condição anaeróbia, a 37±1°C, 180 rpm de agitação e inóculo proveniente de composteira. Os melhores resultados obtidos com a utilização do substrato sacarose ocorreram em pH 4,5, com produção acumulada de hidrogênio de 350 mL e rendimento de produção de hidrogênio de 214 mL de H₂/g DQO.

Os autores (Op. cit.) verificaram a produção de diversos subprodutos, tais como ácido acético, propiônico e butírico. Os níveis de ácido propiônico detectados foram consistentemente mais elevados que os níveis de ácido acético e ácido butírico. A partir dos subprodutos presentes, os autores (Op. cit.) inferiram que existiam no consórcio microbiano outras espécies de *Clostridium*, além de *Clostridium butircum*, tais como *Clostridium articum*, *Clostridium novyi* e *Clostridium propionicum*. O produto principal do metabolismo de *Clostridium butircum* é o ácido butírico, cuja concentração não foi elevada. Desse modo, provavelmente outras espécies de *Clostridium* fizeram parte do consórcio microbiano. Tal fato reforça a perspectiva de utilização de culturas mistas

como fontes mais viáveis na produção biológica de hidrogênio a partir de fermentação (KHANAL *et al.*, 2004).

Fan *et al.* (2004) utilizaram sacarose como substrato (2, 3, 4, 5 e 6 g/L) e inóculo proveniente de estrume de gado para produção biológica de hidrogênio. Os ensaios foram montados em frascos de 100 mL em batelada, a 36±1°C, sob 150 rpm de agitação. Foi realizado choque térmico como tratamento do inóculo. Os resultados experimentais demonstraram que a concentração de substrato e pH ótimo para os compostos geradores de gás de hidrogénio foram de 4,0±0,5 g/L de sacarose e 5,4±0,2, respectivamente. Os autores concluíram que os microrganismos foram similares a espécies de *Clostridium*.

Os autores citados anteriormente obtiveram 90 mL de H₂/g sacarose como rendimento máximo de hidrogênio no ensaio com pH de 5,4±0,2 , e 4±0,5 g/L de sacarose. Além disso, não ocorreu detecção de metanogênese em todo o estudo.

Van Ginkel *et al.* (2005) avaliaram o potencial de produção biológica de hidrogênio a partir de águas residuárias de diferentes indústrias alimentícias. Os autores verificaram 60% de H₂ no biogás a partir de todas as águas residuárias e não foi detectado gás metano. Os ensaios foram realizados a partir de águas residuárias de quatro diferentes processos alimentícios: uma indústria de processamento de maçã, uma de processamento de batata e duas indústrias de confeitaria.

Os autores (Op. cit.) obtiveram maior rendimento de produção de gás hidrogênio (0,17 ± 0.01 L H₂/ g DQO) com a utilização de água residuária de indústria de confeitaria, que possuía 0,6 g/L DQO e pH 6,3.

O segundo maior índice de produção ($0,14 \pm 0,01 \text{ L H}_2/\text{g DQO}$) ocorreu com a utilização de água residuária de indústria de processamento de batata, que possuía 21 g/L de DQO e pH 6,4. Os autores observaram, para águas residuárias reais, remoções de 6 a 7% de DQO, índices mais baixos de remoção de matéria orgânica em relação a utilização de compostos puros, como glicose e sacarose. Nesses últimos casos, são removidos de 9 a 17% de DQO (VAN GINKEL *et al.*, 2001; LOGAN *et al.*, 2002). Provavelmente, o ocorrido deveu-se aos componentes de águas residuárias possuírem pesos moleculares mais elevados do que os açúcares simples, além do fato de que a natureza das partículas dos componentes presentes nas águas residuárias ser mais complexa.

Hawkes *et al.* (2008) usaram 10 g/L de ração de trigo como substrato em biorreator (10 L), inoculado com lodo de sistema de tratamento de esgoto. A ração de trigo é um coproducto da indústria de farinha de trigo utilizado para alimentação animal. Os reatores foram mantidos em pH 5,5, a 35°C. A operação ocorreu de modo semi-contínuo, com tempo de detenção hidráulica de 15 horas. Sob tais condições, os autores obtiveram produção de $56 \text{ m}^3 \text{ H}_2/\text{ton}$ de peso seco de ração de trigo. Os autores concluíram que o biohidrogênio produzido a partir de 1,2 milhões de toneladas por ano de ração de trigo que são geradas no Reino Unido seria mais do que duas vezes o necessário de combustível para o transporte utilizado pela indústria de farinha do mesmo país.

Wang & Wan (2008) avaliaram a bioprodução de hidrogênio em reatores em batelada, utilizando glicose (0 a 300 g/L) como substrato, a 35°C e pH inicial 7,0. O potencial de produção de hidrogênio e a

velocidade de produção do referido gás aumentaram com a concentração crescente de substrato de 0 a 25 g/L. O potencial máximo de produção de H₂ foi de 426,8 mL e taxa máxima de produção de 15,1 mL/h, ambos obtidos com 25 g/L de glicose. Contudo, o rendimento máximo de hidrogênio (384,3 mL H₂/g glicose) e a eficiência máxima de degradação do substrato (97,6%) ocorreram no ensaio realizado com 2 g/L de substrato.

Mantinguer *et al.* (2008 e 2011) realizaram estudos para obtenção e caracterização filogenética de consórcio microbiano utilizado em reator anaeróbio em batelada (2L) aplicado à produção de hidrogênio. Tais pesquisas foram realizadas nas seguintes condições: pH inicial ajustado à 5,5 , temperatura controlada em 37°C e 100% do *headspace* com gás hélio, a fim de garantir condição anaeróbia. O inóculo utilizado foi proveniente de lodo granulado de reator UASB de tratamento de águas residuárias de suinocultura, que recebeu tratamento térmico a fim de obter consórcio de bactérias produtoras de hidrogênio.

Os estudos foram realizados utilizando sacarose (630 mg/L , 1185 mg/L , 1816 mg/L e 4128 mg/L) (Mantinguer *et al.*, 2008) e xilose (630 mg/L, 1341 mg/L, 1848 mg/L e 3588 mg/L) (Mantinguer *et al.*, 2011) como substratos. Em todos os ensaios ocorreu produção de hidrogênio, com os seguintes rendimentos: 15% (1,2 mol H₂/mol sacarose), 20% (1,6 mol H₂/mol sacarose), 15% (1,2 mol H₂/mol sacarose), 4% (0,3 mol H₂/mol sacarose), 3% (0,2 mol H₂/mol xilose), 8% (0,5 mol H₂/mol xilose), 10% (0,6 mol H₂/mol xilose) e 14% (0,8 mol H₂/mol xilose), respectivamente. Em todos os reatores foram detectados etanol, ácido acético e ácido

butírico. Em nenhum dos ensaios foi detectado metano. A morfologia predominante foi de bacilos Gram-positivos e formadores de endósporos. Por meio de análise molecular foram verificadas bactérias semelhantes à *Clostridium*, *Burkolderia*, *Klebsiella* e bactérias não cultivadas.

Kim & Kim (2012) avaliaram a produção de hidrogênio com diferentes fontes de carbono (sacarose, xilose, glicose, amido, entre outras), sob condição termófila (60 °C) e anaeróbia, com pH inicial ajustado à 6,8, utilizando inóculo proveniente de reator anaeróbio utilizado no tratamento de resíduos de processamento de tofu. O rendimento de produção de hidrogênio obtido no ensaio realizado com sacarose em que o pH não foi controlado foi de 2,44 mol H₂/mol hexose, com 93,4% de remoção do substrato.

Assim, a necessidade de buscar novas fontes de energia e alternativas de tratamento para águas residuárias em temperaturas elevadas justifica o presente estudo, que objetiva a avaliação da produção biológica de hidrogênio em reator em batelada sob condição termófila.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado de acordo com o fluxograma experimental apresentado na Figura 4.1.

Os ensaios de bioprodução do gás hidrogênio, bem como o enriquecimento do consórcio microbiano, foram realizados em reatores de batelada com *headspace* preenchido com N₂ (100%) para garantir condição anaeróbia, e mantidos em incubadora sob condição termofísica (55ºC).

Todos os ensaios foram realizados em frascos lacrados com volume total de 2,3 L, sendo 1,1 L de volume reacional e 1,2 L de *headspace*. Utilizou-se sacarose em diferentes concentrações como fonte de carbono, meio de cultivo descrito por Del Nery (1987) modificado (conforme item 4.2) e pH ajustado à 5,5 com solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄) (2 M). Destaca-se que todos os ensaios foram realizados em triplicata.

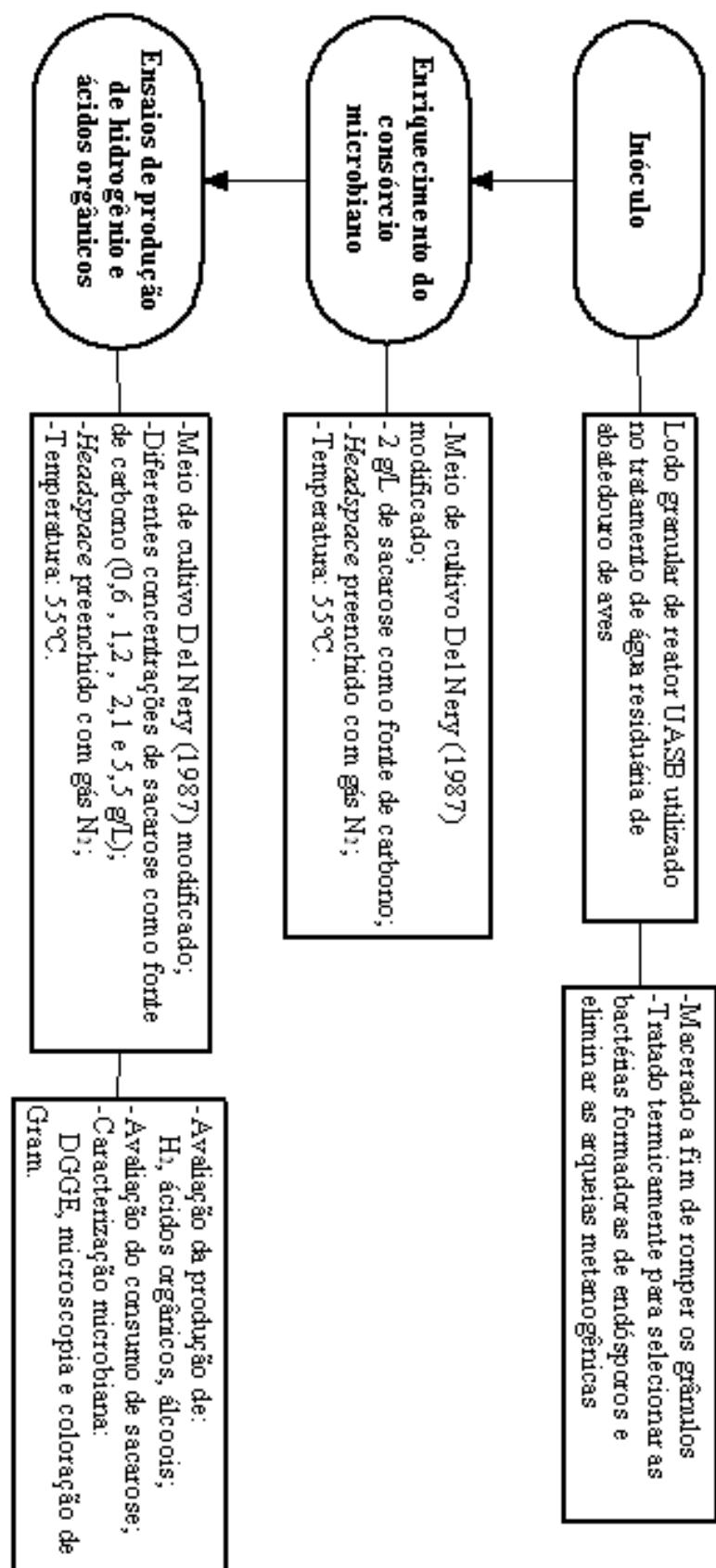


Figura 4.1 - Fluxograma experimental

4.1 Inóculo

O inóculo utilizado foi lodo granulado de reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB) utilizado no tratamento de água residuária de abatedouro de aves cedido pela Avícola Dacar Industrial S.A., localizada em Tietê - SP.

Primeiramente, 400 mL do lodo foi fragmentado através de maceramento a fim de romper os grânulos e, posteriormente, foi submetido ao tratamento térmico conforme descrito por Kim *et al.* (2006). Esse procedimento foi realizado com a finalidade de selecionar as bactérias formadoras de endósporos, tais como aquelas dos gêneros *Clostridium* e *Bacillus*, descritas na literatura como produtoras de hidrogênio, além de eliminar as arquéias metanogênicas, consumidoras do referido gás.

4.2 Meio de Cultivo

O meio de cultura utilizado foi o descrito por Del Nery (1987) (Tabela 4.1), composto pelas soluções A, B, C, D; preparadas separadamente e armazenadas em frascos sob refrigeração. Além destas soluções, foram adicionadas ureia, peptona e soluções de vitaminas (WIDDEL & PFENNING, 1984), preparadas individualmente em condição de assepsia, nas concentrações apresentadas na Tabela 4.2.

O pH inicial do meio foi ajustado à 5,5 (FANG & LIU, 2002; MU *et al.*, 2007). Utilizou-se solução de ácido sulfúrico (2 M) para o ajuste do pH.

O meio de cultivo foi filtrado em membrana 0,22 µm, em sistema de filtração Millipore®, previamente esterilizado com a finalidade de manter condição asséptica. Seguidamente, foi fluxionado gás N₂ (100%) durante 20 minutos na solução e no *headspace* a fim de garantir condição anaeróbia do sistema.

Tabela 4.1 - Composição do substrato sintético

Composto	Concentração
Solução A:	
NiSO ₄ .6H ₂ O (0,5 g/L)	
FeSO ₄ .7H ₂ O (2,5 g/L)	2 mL/L
FeCl ₃ .6H ₂ O (0,25 g/L)	
CoCl ₂ .2H ₂ O (0,04 g/L)	
Solução B:	2 mL/L
CaCl ₂ .6H ₂ O (2,06 g/L)	
Solução C:	2 mL/L
SeO ₂ (0,144 g/L)	
Solução D:	
KH ₂ PO ₄ (5,36 g/L)	2 mL/L
K ₂ HPO ₄ (1,30 g/L)	
Na ₂ HPO ₄ .H ₂ O (2,76 g/L)	
Ureia	40 mg/L

Fonte: Del Nery (1987)

Tabela 4.2 - Compostos adicionados ao meio de cultivo

Composto	Concentração
Peptona *	1g/L
Solução de Vitamina 1: ** Vitamina B12 (40 mg/L)	1 mL/L
Solução de Vitaminas 2: ** ácido p-aminobenzóico (40 mg/L) biotina (10 mg/L)	1 mL/L

*Fonte: Maintinguier *et al.* (2008)

**Fonte: Widdel & Pfennig (1984)

4.3 Enriquecimento do consórcio microbiano

Após o tratamento térmico do inóculo, descrito no item 4.1, o lodo granulado foi enriquecido em frascos Duran® lacrados, com *headspace* preenchido com gás N₂ (100%), com meio de cultivo descrito no item 4.2, acrescido de 2 g/L de sacarose e pH inicial ajustado à 5,5. Os reatores foram mantidos em incubadoras sob condição termofílica (55°C) ao longo de oito semanas. Durante este período, realizou-se repique da biomassa repetidas vezes. Para realização do repique, a biomassa foi centrifugada por 5 minutos a 11.000 rpm e 4°C, em condição asséptica, a fim de concentrá-la e, por fim, adicionar novo meio de cultivo.

4.4 Ensaios de produção de hidrogênio e ácidos orgânicos

Após a obtenção e enriquecimento do consórcio microbiano, utilizou-se o mesmo como inóculo para os ensaios de avaliação da produção de gás hidrogênio e ácidos orgânicos em reatores em batelada com meio de cultura descrito no item 4.2, acrescido de sacarose (0,6; 1,2; 2,1 e 5,5 g/L).

Todos os ensaios foram realizados em triplicada, em frascos com volume total de 2,3 L, sendo 1,1 L de volume reacional e 1,2 L de *headspace*. Além disso, o pH inicial foi ajustado à 5,5 em todos os ensaios.

Anteriormente a realização dos ensaios fixou-se que a retirada de amostras líquidas, logo após o fechamento de cada frasco, seria de 100 mL e as retiradas contínuas de amostras não ultrapassariam 10% do volume reacional, a fim de não alterar as condições experimentais.

Durante a realização dos ensaios, a composição do biogás foi analisada periodicamente por meio da retirada de amostras gasosas de 250 µL do *headspace* com auxílio de seringa com trava. A Figura 4.2 apresenta desenho esquemático dos reatores utilizados e a amostragem do biogás.

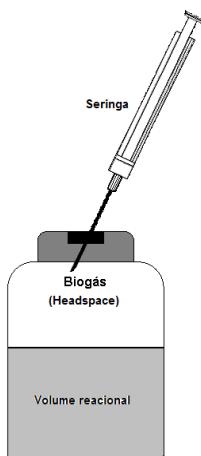


Figura 4.2 - Modelo esquemático do reator em batelada e retirada de amostra gasosa

4.5 Análises cromatográficas

A composição do biogás foi analisada por meio da retirada de amostras (250 µL) do *headspace* dos reatores em todos os ensaios de

produção de hidrogênio. A análise foi realizada em cromatógrafo gasoso (GC 2010, Shimadzu®), equipado com detector de condutividade térmica (TCD – Thermal Conductivity Detector) e coluna CarboxenTM 1010 PLOT (30 m x 0,53 mm, Supelco), com argônio como gás de arraste (grau cromatográfico). A temperatura do injetor foi 220°C, a do detector 230°C e 130°C a temperatura da coluna, com aquecimento de 46°C min⁻¹ até 135°C.

As determinações de álcoois e ácidos orgânicos foram realizadas em cromatógrafo gasoso (GC 2010, Shimadzu®) com coluna HP-INNOWAX (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), e detector de ionização de chama (FID) utilizando hidrogênio como gás de arraste, ar sintético e nitrogênio como gases auxiliares.

4.6 Avaliação do consumo de substrato

Para avaliação do consumo de substrato ao longo do experimento, a concentração da sacarose foi determinada pelo método colorimétrico descrito por Dubois *et al.* (1956), adaptado por Herbert *et al.* (1971).

4.7 Análises Microbiológicas

Ao final dos ensaios, foram realizadas análises microscópicas e moleculares da biomassa dos reatores, conforme apresentados a seguir.

4.7.1. Análises microscópicas

A partir de amostras de biomassa coletadas dos reatores foram realizadas análises de microscopia óptica de luz comum utilizando o microscópio Olympus BX-60, acoplado à câmera para captura de imagens

(Evolution QE, Media Cybernetics Inc., USA), e software Image Pro-Plus 4.5.

Além disso, também foi utilizada coloração diferencial de Gram para a caracterização do consórcio microbiano, conforme procedimento padrão, nas quais células Gram-positivas colorem-se de azul e células Gram-negativas colorem-se em vermelho (DMS, 1991).

4.7.2. DGGE

Para a análise de eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE – *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*), foram utilizadas amostras de biomassa dos ensaios de produção de hidrogênio com concentrações diferentes de substrato, as quais foram coletadas ao término dos experimentos. A extração de DNA foi realizada segundo protocolo de Griffiths *et al.* (2000) modificado, descrito por Maintinguier *et al.* (2008).

Para esta análise, foi realizada amplificação dos fragmentos do RNAr 16S utilizando-se iniciadores específicos para o Domínio Bacteria: 968 FGC (5'-AACGCGAAGAACCTTAC-3') (NIELSEN *et al.*, 1999) e 1392 R (5'-AACGGCGGTGTGTAC-3') (FANG *et al.*, 2002) com GC clamp (5'- CGC CCG CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGGG – 3').

O gel foi preparado com gradiente desnaturante nas concentrações de 45 % e 65 %. O sistema utilizado foi DGGE D CodeTM – *Universal Mutation Detection System* (Bio-Rad, Inc., Hercules, Califórnia). As condições de eletroforese foram as seguintes: temperatura constante de

60°C, 75 V por 16 horas. O gel foi corado com solução TAE 1X contendo 1 g.mL⁻¹ de brometo de etídeo por 10 minutos. O aparelho utilizado para leitura do padrão de bandas do gel foi transiluminador UV (Stratagene – Eagle Eye TM III), sob exposição a luz UV (254nm), acoplado ao computador com o software Eaglesight (Stratagene – versão 3.22). Dendrograma foi construído usando software Bionumerics versão 2.5, com coeficiente de Jaccard.

4.8. Ajuste dos dados experimentais

Fez-se uso do software Origin® 6.1 (Origin Lab Corporation), utilizando o algorítimo de Levenberg-Marquadt através da ferramenta 'Non-linear Curve Fit', para ajustar os pontos obtidos experimentalmente de produção cumulativa de hidrogênio com a equação do modelo de Gompertz modificada (5) (ZWIETERING *et al.*, 1990). Tal modelo é considerado adequado para descrever a produção de biogás em ensaios realizados em batelada.

$$H(t) = P \cdot \exp \left\{ -\exp \left[\frac{R_m \cdot e}{P} \cdot (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (5)$$

Sendo:

P = potencial de produção de hidrogênio (mmol);

Rm = taxa máxima de produção de hidrogênio (mmol/h);

λ = período da fase lag (h);

e = 2,718281828.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção e enriquecimento do consórcio microbiano

Na Figura 5.1 estão representados os reatores em batelada utilizados na etapa de obtenção e enriquecimento do consórcio microbiano produtor de gás hidrogênio.

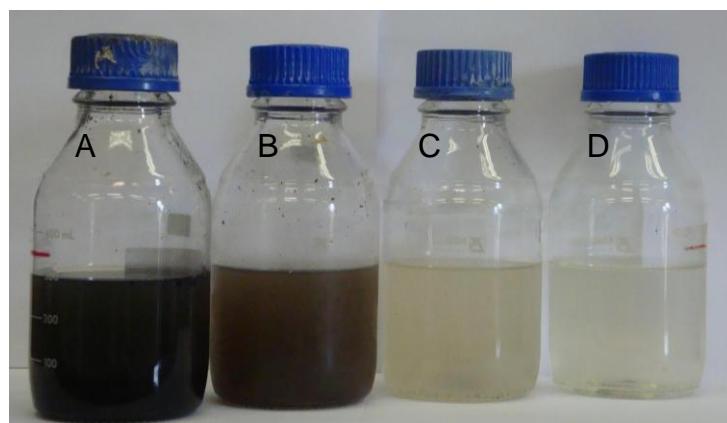


Figura 5.1 - Reatores anaeróbios para obtenção e enriquecimento do consórcio microbiano produtor de H₂: etapas A a D

A duração da purificação e enriquecimento da biomassa, conforme os frascos apresentados na Figura 5.1, encontra-se na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 – Tempo de enriquecimento após o tratamento do inóculo

Frasco (Figura 5.1)	Tempo de enriquecimento (semanas)
A	0
B	2
C	5
D	7

5.2 Ensaios de produção de hidrogênio

Os ensaios de produção de hidrogênio foram realizados com diferentes concentrações de sacarose (0,6; 1,2; 2,1 e 5,5 g/L), em temperatura termófila (55°C) e condição anaeróbia. Os resultados de consumo de substrato, produção acumulada de hidrogênio, potencial de produção de hidrogênio, rendimento de produção de hidrogênio e produção de ácidos orgânicos e álcoois, relativos a todos os ensaios, serão apresentados neste item.

Em todos os ensaios realizados foi observada geração do gás hidrogênio, ácido acético, etanol e não foi observada geração de metano.

Utilizou-se o modelo de Gompertz modificado para realizar o ajuste dos dados experimentais de produção de hidrogênio (Figura 5.2). Considerou-se que o ajuste realizado com este modelo foi apropriado, pois os valores do coeficiente de determinação (R^2) obtidos foram superiores a 0,9 para todos os ensaios.

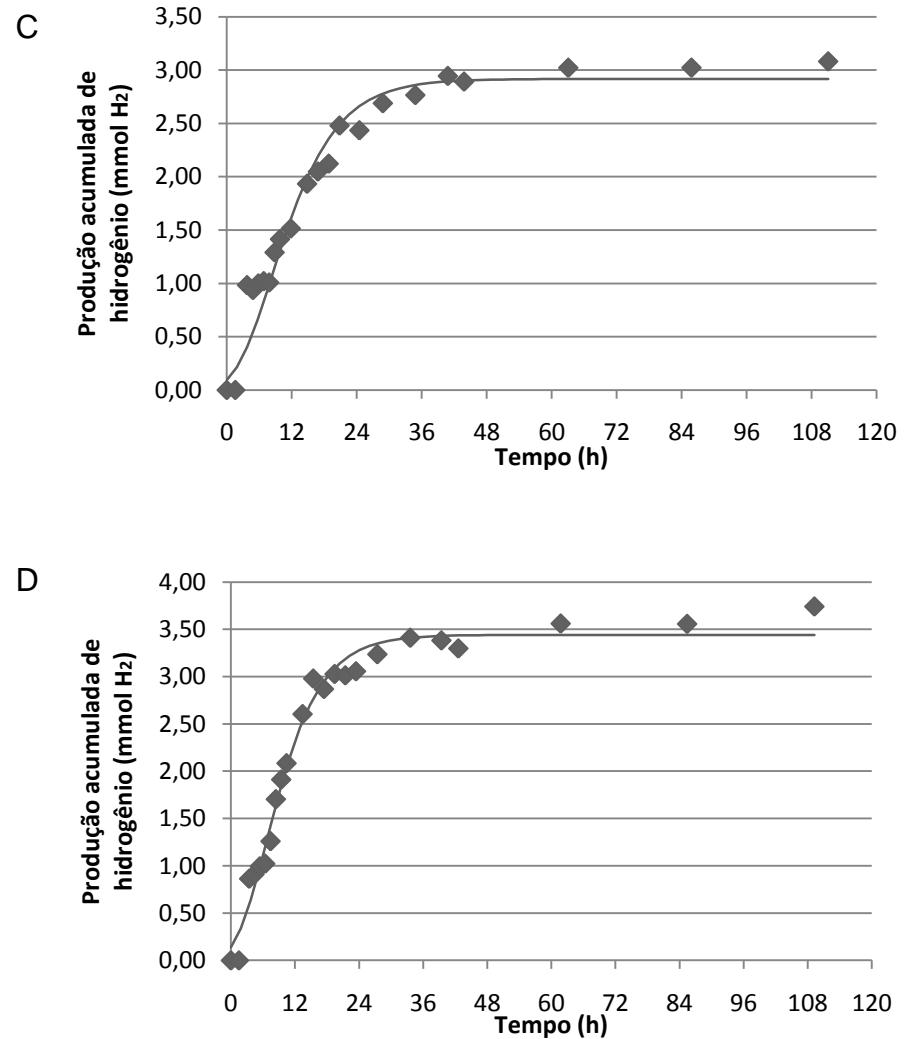
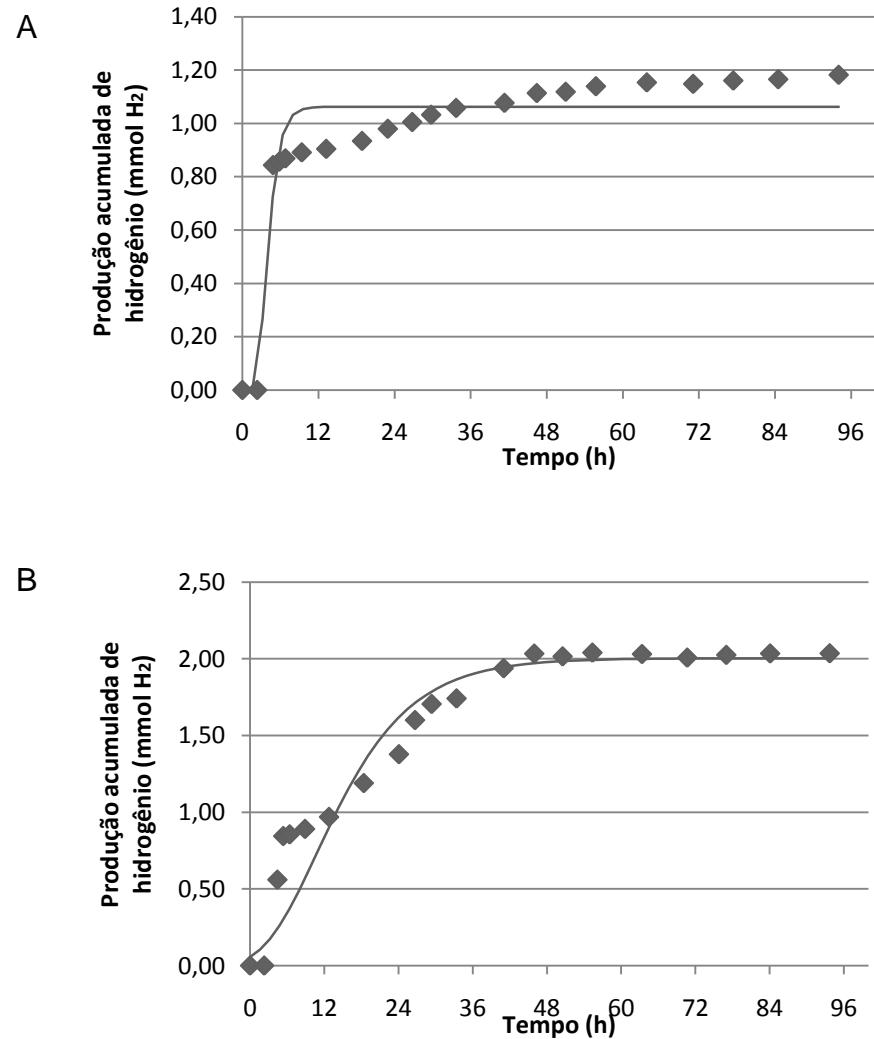


Figura 5.2 - Produção acumulada de hidrogênio ajustados ao modelo modificado de Gompertz nos ensaios com (A) 0,6 g/L; (B) 1,2 g/L ; (C) 2,1 g/L e (D) 5,5 g/L de sacarose

A partir do modelo de Gompertz modificado, extraíram-se os seguintes parâmetros: potencial de produção de hidrogênio (mmol), taxa máxima de produção de hidrogênio (mmol/h) e duração da fase *lag* (h), apresentados na Tabela 5.2.

Tabela 5.2 – Parâmetros obtidos por meio do modelo de Gompertz modificado

Parâmetros	Sacarose (g/L)			
	(A)	(B)	(C)	(D)
Concentração de sacarose (g/L) inicial	0,6	1,2	2,1	5,5
Concentração de sacarose (g/L) final	0,01	0,2	1,6	4,9
*Potencial de produção de H ₂ (mmol)	1,06	2,00	2,92	3,44
*Taxa máxima de produção de H ₂ – Rm (mmol/h)	0,32	0,09	0,16	0,22
*fase <i>lag</i> (h)	2,36	2,29	1,60	0,97
*R ²	0,93	0,91	0,96	0,98

Observou-se que o potencial de produção de H₂ foi de 1,06; 2,00; 2,92 e 3,44 mmol para 0,6; 1,2; 2,1 e 5,5 g/L de sacarose, respectivamente. A relação entre o potencial de produção de hidrogênio e a concentração inicial de substrato nos ensaios pode ser observada na Figura 5.3.

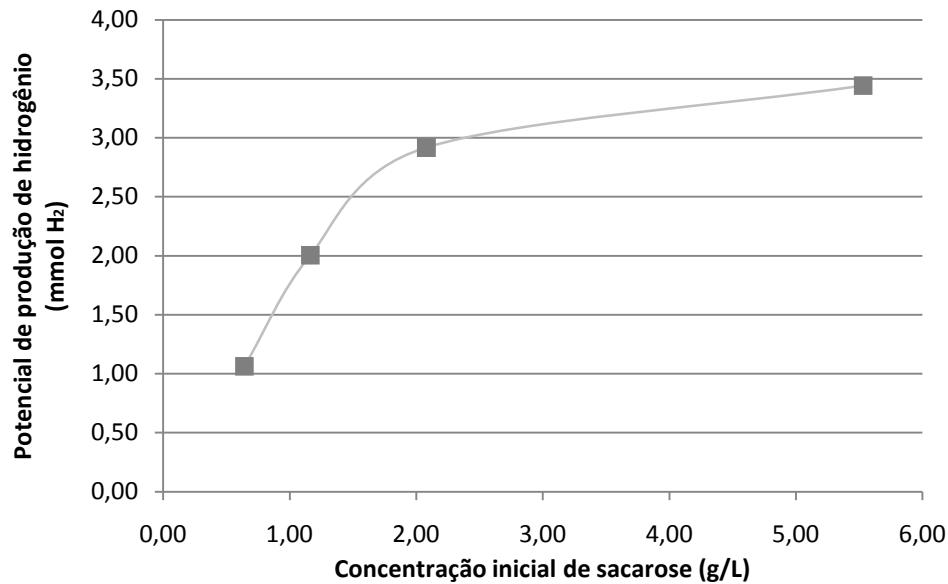


Figura 5.3 – Relação entre potencial de produção de hidrogênio (P) e concentração inicial de sacarose

Através do modelo de Gompertz modificado também se obteve a taxa máxima de produção de hidrogênio (Tabela 5.2). Esta taxa variou de 0,09 a 0,32 mmol/h nos ensaios com 1,2 e 0,6 g/L de sacarose, respectivamente. Destaca-se que os valores de taxa máxima de produção também não seguiram a tendência do potencial de produção de biogás e de produção acumulada de hidrogênio, tampouco a tendência observada no rendimento de produção de H₂.

Além destes, obteve-se um terceiro parâmetro através do modelo de Gompertz modificado: a duração da fase *lag* (apresentada na Tabela 5.2). A relação entre a duração desta fase de adaptação e a concentração inicial de sacarose pode ser observada na Figura 5.4.

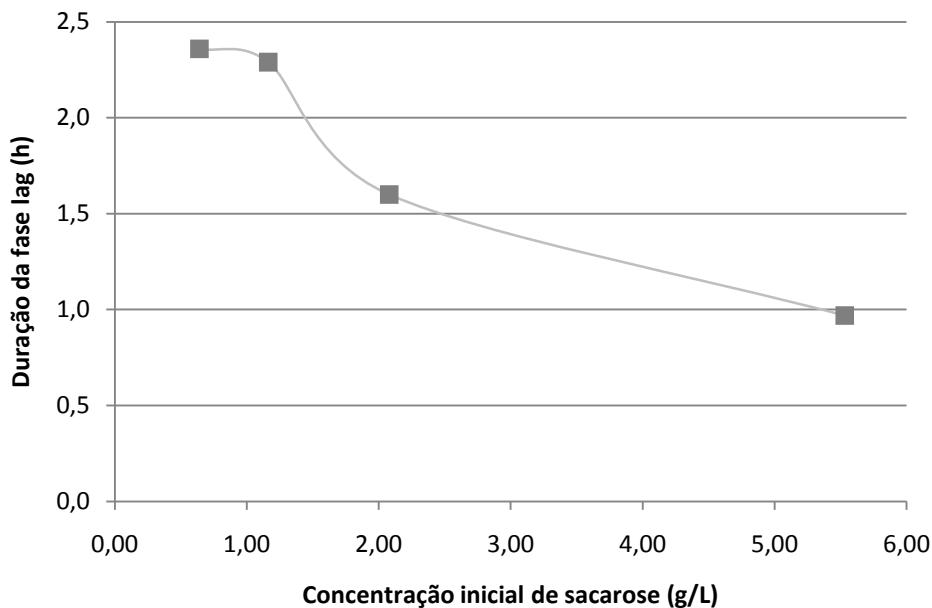


Figura 5.4 – Relação entre duração da fase *lag* e concentração inicial de sacarose

Os demais resultados dos ensaios realizados, referentes ao consumo de substrato, produção acumulada de hidrogênio, produção de ácidos orgânicos e álcoois, são apresentados na Tabela 5.3.

Tabela 5.3 – Resultados obtidos nos ensaios de produção de hidrogênio

Parâmetros	Sacarose (g/L)			
	(A)	(B)	(C)	(D)
Concentração de sacarose (g/L) inicial	0,6	1,2	2,1	5,5
Concentração de sacarose (g/L) final	0,01	0,2	1,6	4,9
Tempo de duração do ensaio (h)	94,0	93,7	111,1	109,3
Produção acumulada de H ₂ (umol/L)	968,99	1.679,78	2.456,49	2.992,30
Ácido acético (mg/L)	128,08	49,17	21,80	22,09
Etanol (mg/L)	63,28	68,92	74,29	67,25

É possível observar que a produção acumulada de hidrogênio, bem como o potencial de produção do mesmo gás, aumentou conforme o

aumento da concentração de substrato. Contudo, esta tendência não foi observada na eficiência de conversão teórica de sacarose a hidrogênio e no rendimento de produção de H₂, cujos maiores índices foram observados no ensaio com 2,1 g/L de sacarose (21% e 1,68 mol H₂/mol sacarose, respectivamente).

Destaca-se que, também neste ensaio, com 2,1 g/L de sacarose, verificou-se a menor produção de ácido acético (21,80 mg/L) e a maior produção de etanol (74,29 mg/L). Este resultado foi diferente do esperado, já que a rota com maior conversão de sacarose a hidrogênio é a com produção de ácido acético, conforme apresentado na Reação 3.

A razão entre o potencial de produção de hidrogênio e a quantidade de sacarose consumida expressa o rendimento de produção de hidrogênio (mol H₂/mol sacarose). Tal parâmetro é importante na avaliação da viabilidade econômica de processos, já que o mesmo representa a produção do gás por quantidade de substrato consumido.

Os resultados de rendimento obtidos dos ensaios realizados, em mol H₂/mol sacarose e a eficiência de conversão teórica, em porcentagem estão apresentados na Tabela 5.4.

Tabela 5.4 – Rendimento de conversão de sacarose a hidrogênio e eficiência de conversão teórica

Ensaio	Rendimento de conversão (mol H ₂ /mol sacarose)	Eficiência de conversão (%)
0,6 g/L de sacarose	0,48	5,94
1,2 g/L de sacarose	0,60	7,55
2,1 g/L de sacarose	1,68	20,95
5,5 g/L de sacarose	1,49	18,66

A relação entre o rendimento de produção de hidrogênio e a concentração inicial de sacarose nos ensaios pode ser observada na Figura 5.5.

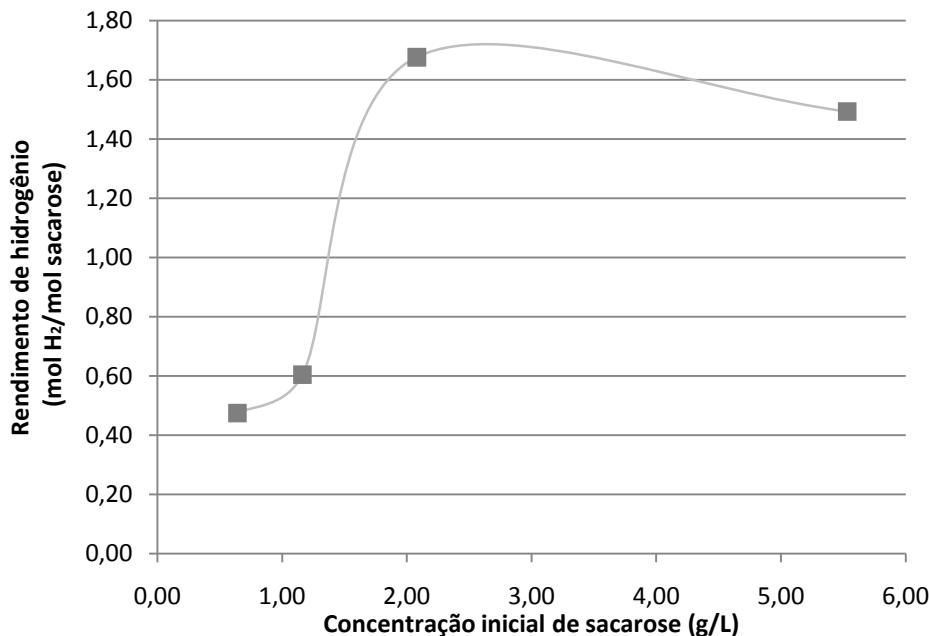


Figura 5.5 – Relação entre o rendimento de produção de hidrogênio e concentração inicial de sacarose

O rendimento teórico máximo de conversão de sacarose a hidrogênio (equação 2, item 3.2.) é de 8 mol H₂/mol sacarose. Os valores dos rendimentos obtidos experimentalmente nos ensaios da presente pesquisa foram de até 21% da eficiência teórica.

Notou-se que o rendimento de produção de hidrogênio não seguiu a tendência de crescimento de acordo com o aumento da concentração de substrato. Contudo, observou-se índice de rendimento similar entre os ensaios com as menores concentrações de substrato; ou seja, 0,475 mol H₂/mol sacarose para o ensaio com 0,6 g/L de sacarose e 0,604 mol H₂/mol sacarose para o ensaio com 1,2 g/L de sacarose.

Observou-se, para as maiores concentrações de substrato (2,1 g/L e 5,5 g/L), rendimento de produção de hidrogênio de 1,676 mol H₂/mol sacarose e 1,492 mol H₂/mol sacarose, respectivamente. Assim, o rendimento máximo ocorreu no ensaio com 2,1 g/L de sacarose. Nesta mesma condição, verificou-se maior eficiência de conversão teórica (21%) e menor produção de ácido acético (21,80 mg/L). A partir de tais resultados, foi possível inferir que, em tal ensaio, a rota de produção de hidrogênio predominou em relação à rota de produção de ácido acético. Além disso, o rendimento de produção foi diretamente associado à mínima produção de ácidos orgânicos.

Outros autores também obtiveram rendimento máximo de produção de hidrogênio em ensaios realizados com concentrações próximas a do presente estudo. Wang & Wan (2008) obtiveram 384,3 mL H₂/g glicose de rendimento máximo em ensaio realizado com 2 g/L de glicose a 35°C. E Kim & Kim (2012) obtiveram 2,44 mol H₂/mol sacarose como rendimento máximo em ensaio realizado com 3 g DQO/L de sacarose a 60±1°C.

Em ensaios realizados em condição mesófila, com outros parâmetros similares aos utilizados no presente estudo (pH inicial ajustado à 5,5, meio de cultivo Del Nery (1987) modificado, condição anaeróbia, inóculo proveniente de lodo de reator anaeróbio tratado termicamente), Maintinguier *et al.* (2008) obtiveram o melhor rendimento de produção de 1,6 mol H₂/mol sacarose (20% da eficiência de conversão teórica) em reator com 1.184 mg/L de sacarose. O melhor índice de rendimento dos autores é bastante próximo ao melhor índice de rendimento da presente pesquisa. Contudo, no presente estudo, tal índice

ocorreu no ensaio com 2,1 g/L de sacarose como substrato. Destaca-se que os ensaios realizados por Maintinguer *et al.* (2008) foram a 37°C e os ensaios realizados na presente pesquisa foram a 55°C. Assim, a temperatura mais elevada do presente estudo não foi favorável a produção de hidrogênio, como era esperado, já que Maintinguer *et al.* (2008) obtiveram rendimento de produção de H₂ próximo ao da presente pesquisa em menor temperatura e com menor concentração de substrato.

Destaca-se a utilização de inóculo mesófilo na presente pesquisa para realização de ensaios em condições termófilas.

Notou-se que nos ensaios com menor concentração de substrato, a duração da fase *lag* foi maior, seguindo a tendência inversa do potencial de produção de hidrogênio e da produção acumulada do referido gás.

A partir de tais dados, observou-se que a comunidade microbiana necessitou de mais tempo para adaptar-se e iniciar a produção nos ensaios com 0,6 e 1,2 g/L de sacarose.

Deve-se levar em consideração que o enriquecimento da biomassa foi realizado com 2 g/L de sacarose. Portanto, é possível inferir que a maior duração da fase *lag* ocorreu devido à menor concentração de sacarose e a possível dificuldade da biomassa para se adaptar a menores concentrações de substrato.

O consumo total da sacarose, em porcentagem, em cada um dos ensaios realizados, é apresentado na Tabela 5.5.

Tabela 5.5 - Consumo de sacarose

Ensaio	Consumo de sacarose (%)
0,6 g/L de sacarose	98
1,2 g/L de sacarose	80
2,1 g/L de sacarose	23
5,5 g/L de sacarose	12

Notou-se que o consumo foi maior nos ensaios com as menores concentrações de sacarose, atingindo quase a totalidade (98%) de remoção do glicídio no ensaio com 0,6 g/L de sacarose e 80% de remoção no ensaio com 1,2 g/L de sacarose. Nos ensaios com 2,1 e 5,5 g/L de sacarose observou-se reduzido consumo. Apesar de tal fato, no ensaio com 2,1 g/L de sacarose observou-se maior rendimento de produção de hidrogênio (1,68 mol H₂/mol sacarose) e maior eficiência de conversão teórica de sacarose a hidrogênio (21%).

Wang & Wan (2008) constataram 97,6% de eficiência máxima de remoção de substrato em ensaio realizado com 2 g/L de glicose em condição mesófila (35°C), e Kim & Kim (2012) obtiveram 93,4% de remoção de sacarose em ensaio realizado com 3 g DQO/L em condição termófila (60±1° C).

Não foi avaliada a concentração de microrganismos nos ensaios e, portanto, a razão entre concentração de substrato e concentração de microrganismos (S/M) não foi calculada. Contudo, foi possível inferir que esta relação foi maior nos ensaios com maior concentração de substrato. Isto porque quanto maior a relação S/M, maior é a probabilidade de haver mais substrato do que capacidade dos microrganismos presentes de

consumí-lo, diminuindo assim o índice de consumo (TCHOBANOGLOUS *et al.*, 2003).

A seguir, na Figura 5.6, são apresentadas a produção acumulada de gás hidrogênio e a concentração de substrato ao longo do tempo para cada um dos ensaios realizados.

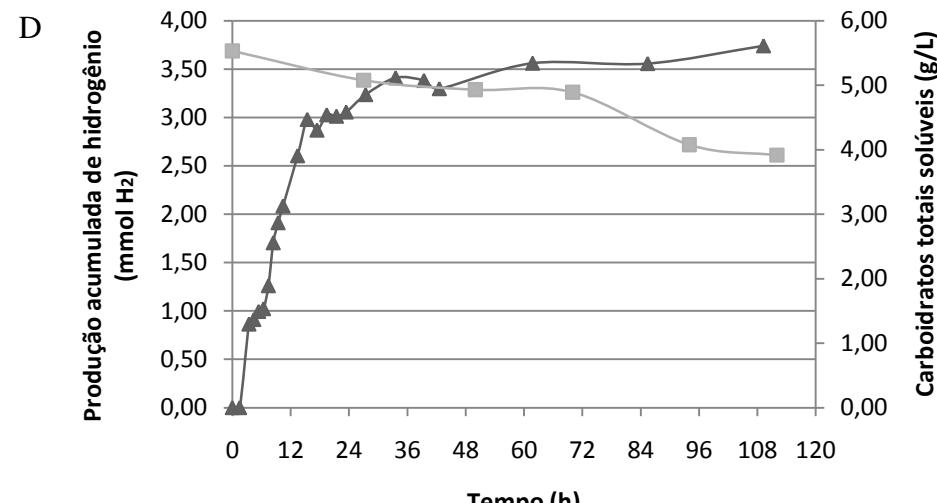
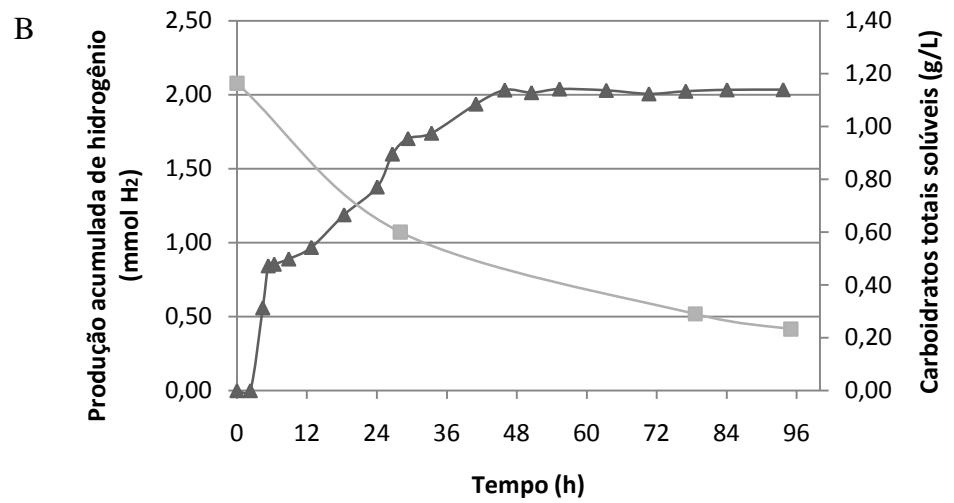
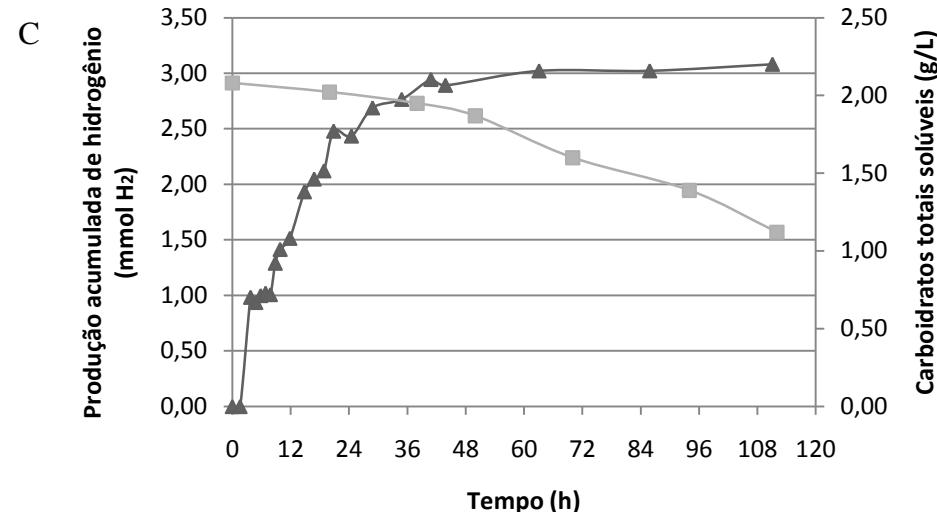
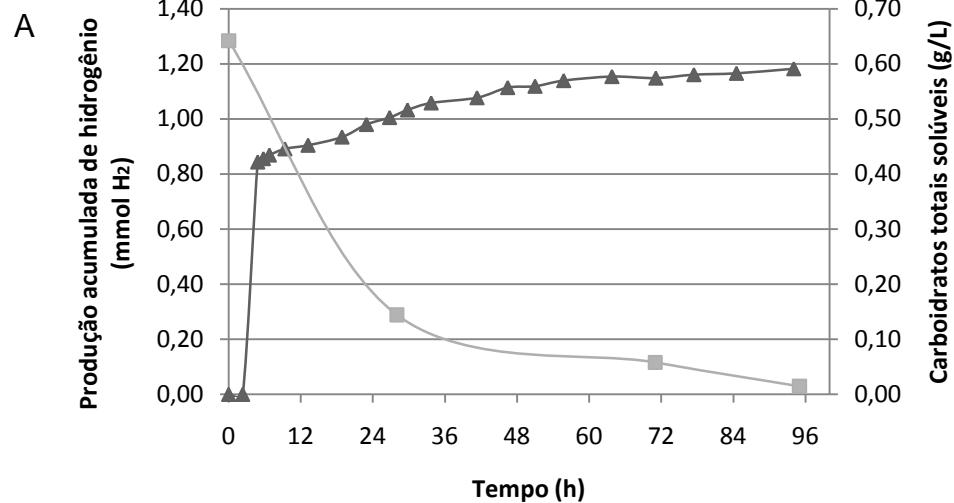


Figura 5.6 - Variação temporal da produção acumulada de H₂ (▲ - eixo da esquerda) e da concentração de substrato (■ - eixo da direita) com (A) 0,6 g/L; (B) 1,2 g/L ; (C) 2,1 g/L e (D) 5,5 g/L de sacarose

Notou-se que, quanto menor a concentração de sacarose, mais rapidamente ocorreu a estabilização da produção acumulada do gás hidrogênio. Isso possivelmente se deve à baixa concentração de substrato, o qual foi consumido mais rapidamente, estabilizando a produção de biogás.

Além disso, observou-se que não ocorreu inibição da produção de H₂ com o aumento da concentração de substrato, já que a produção de hidrogênio fez-se aumentar com o aumento da disponibilidade de substrato.

Em todos os ensaios realizados ocorreu produção de etanol e ácido acético (Tabela 5.3). Para o ensaio com menor concentração de sacarose (0,6 g/L), observou-se a maior produção de ácido acético (128,08 mg/L), seguido pelo ensaio com 1,2 g/L de sacarose (49,17 mg/L). No ensaio com 2,1 g/L de sacarose observou-se a menor concentração de ácido acético (21,80 mg/L).

No ensaio com 0,6 g/L de sacarose, que resultou na máxima produção de ácido acético (128,08 mg/L), observou-se a maior remoção de sacarose (98%) e o menor rendimento de produção de H₂ (0,48 mol H₂/mol sacarose). No ensaio com 2,1 g/L de sacarose observou-se o maior índice de rendimento de produção de H₂ (1,68 mol H₂/mol sacarose) e a menor produção de ácido acético (21,80 mg/L). A partir de tais resultados, foi possível inferir que no ensaio com 0,6 g/L de sacarose a rota de produção de ácidos orgânicos foi predominante em relação a rota de produção de hidrogênio, e que no ensaio com 2,1 g/L de sacarose ocorreu o inverso.

Em relação a produção de etanol, os valores obtidos foram semelhantes, ou seja; 63,28 a 74,29 mg/L. Observou-se valor máximo no ensaio com 2,1 g/L de sacarose (74,29 mg/L). Alguns autores, como Wang *et al.* (2008), estudaram a inibição da produção de hidrogênio causada por ácidos orgânicos e etanol. Tais autores observaram diminuição do rendimento e do potencial de produção de hidrogênio, bem como a eficiência de degradação do substrato com o aumento de etanol, ácido acético, ácido butírico e ácido propiônico em ensaios realizados a 35°C com glicose como substrato. Foi observado que o efeito inibitório causado pelo etanol foi menor do que o causado pelos ácidos orgânicos. Tal possibilidade está de acordo com os resultados encontrados no presente estudo; ou seja, no ensaio (2,1 g/L sacarose) com maior rendimento de produção de hidrogênio (1,68 mol H₂/mol sacarose) e eficiência de conversão teórica (21%), foi observado menor índice de produção de ácido acético (21,80 mg/L) e maior índice de produção de etanol (74,29 mg/L).

Contudo, faz-se necessário destacar que a inibição observada por Wang *et al.* (2008) ocorreu para concentrações mais elevadas (de 0,6 a 18 g/L de ácido acético e de 0,46 a 13,8 g/L de etanol) do que no referido estudo, cujos valores foram de 109,96 mg/L de ácido acético e 74,29 mg/L de etanol.

Maintinguem *et al.* (2008) obtiveram produção de ácido acético, ácido butírico e etanol, além de pequenas concentrações de ácidos propiônico, isobutírico e isovalérico em ensaios específicos em condição mesófila. Para o presente trabalho obteve-se apenas produção de ácido

acético e etanol. Portanto, provavelmente, não ocorreu a rota de degradação envolvendo ácido butírico (reação 3 apresentada no item 3.2).

Khanal *et al.* (2004) realizaram ensaios com 150 g/L de sacarose e observaram produção de ácidos acético, butírico e propiônico, sendo o último em maiores quantidades. Os autores concluíram que no consórcio microbiano, provavelmente, diversas espécies de *Clostridium*, tais como, *Clostridium articum*, *Clostridium novyi* e *Clostridium propionicum*, além do *Clostridium butyricum*, foram capazes de produzir diferentes ácidos orgânicos. Considerando que o presente estudo apresentou apenas ácido acético, pode-se sugerir que a comunidade microbiana foi bastante selecionada e, possivelmente, sem ampla diversidade de espécies, tal como no estudo de Khanal *et al.* (2004).

O resumo dos resultados obtidos por outros autores em ensaios com características semelhantes são apresentados na Tabela 5.6.

Tabela 5.6 - Produção de hidrogênio por microrganismos em consórcios microbianos

Inóculo	Substrato	Concentração de substrato	Temperatura	Rendimento	Referência
lodo anaeróbio	sacarose	2,1 g/L	55°C	1,68 mol H ₂ /mol sacarose	Presente estudo
lodo anaeróbio	glicose	2,0 g/L	35°C	384,3 mL H ₂ /g glicose	Wang & Wan (2008)
lodo anaeróbio	sacarose	1,2 g/L	37°C	1,6 mol H ₂ /mol sacarose	Maintiguer (2008)
lodo anaeróbio	xilose	3,6 g/L	37°C	0,8 mol H ₂ /mol xilose	Maintiguer (2011)
lodo de sistema de tratamento de esgotos	ração de trigo	10,0 g/L	35°C	56 m ³ H ₂ /t ração de trigo	Hawkes et al. (2008)
estruno de gado	sacarose	4,0 ± 0,5 g/L	36 ± 1°C	90 mL de H ₂ /g sacarose	Fan et al. (2004)
composteira	sacarose	150,0 g/L	37 ± 1°C	214 mL de H ₂ /g DQO	Khanal et al. (2004)
lodo anaeróbio	sacarose	3,0 g DQO/L	60 ± 1°C	2,44 mol H ₂ /mol hexose	Kim & Kim (2012)

Conforme apresentado na Tabela 5.6, o rendimento máximo de produção obtido na presente pesquisa foi similar a pesquisas de outros autores, tal como Kim & Kim (2012), que obteve 2,44 mol H₂/mol hexose em ensaio com 3,0 g DQO/L de sacarose a 60 ± 1°C, e Maintinguer (2008), que obteve 1,6 mol H₂/mol sacarose em ensaio com 1,2 g/L de sacarose a 37°C.

Destaca-se também que outros autores obtiveram rendimento máximo de produção de gás hidrogênio utilizando concentrações de substrato iniciais próximas à utilizada na presente pesquisa, tal como Wang & Wan (2008) e Kim & Kim (2012), que obtiveram rendimento

máximo no ensaio com 2,0 g/L de glicose e 3,0 g DQO/L, respectivamente.

5.3. Análises Microbiológicas

Em todos os reatores foi observado predomínio de bacilos (Figura 5.7).

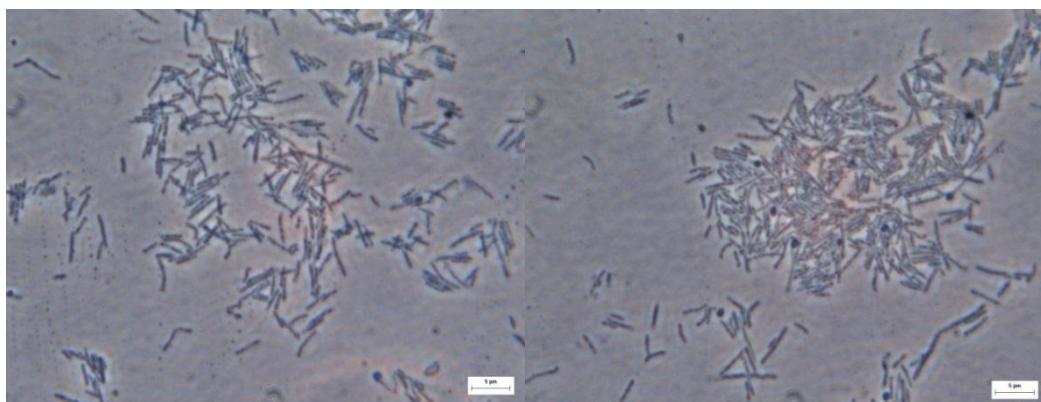
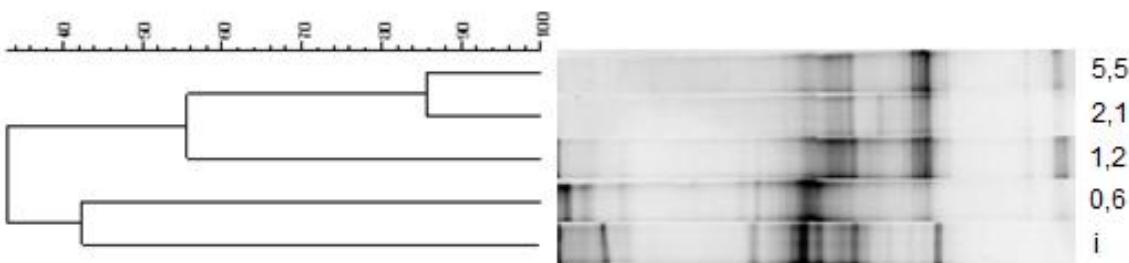


Figura 5.7 - Microscopia óptica de luz comum de bacilos

Observou-se também predomínio de bactérias gram-positivas. Tal resultado foi bastante satisfatório, já que bactérias produtoras de hidrogênio, tais como as do gênero *Clostridium*, são bacilos gram-positivos.

Amostras de biomassa dos ensaios de produção de hidrogênio foram retiradas para análise da estrutura da comunidade microbiana por meio da técnica de DGGE. A partir da análise comparativa do padrão de bandas obteve-se o dendrograma apresentado na Figura 5.8.



**Figura 5.8 - Dendograma para os ensaios com 0,6; 1,2; 2,1 e 5,5 g/L de sacarose
(i = inóculo)**

A partir do dendrograma apresentado acima, foi possível inferir que a concentração de substrato foi fator importante na seleção das populações, uma vez que a amostra com menor concentração de sacarose foi mais similar ao inóculo (42%) do que com as outras amostras (33%). As amostras com maior concentração de substrato (2,1 e 5,5 g/L) foram mais similares entre si (86%).

Devido a similaridade entre o ensaio com 0,6 g/L de sacarose iniciais e o inóculo ter sido elevada, sugere-se que este ensaio, o qual apresentou menor rendimento de produção de hidrogênio, apresentou maior diversidade microbiana, ou seja, neste ensaio ocorreu a menor purificação da comunidade microbiana.

6. CONCLUSÕES

Concluiu-se que o inóculo mesófilo proveniente de reator UASB utilizado para tratamento de água residuária de avícola, as condições de cultivo e o tratamento utilizados foram adequados para selecionar a comunidade microbiana de interesse.

Além disso, não foi detectada produção de CH₄ nos ensaios realizados, o que corrobora a não ocorrência do processo de metanogênese e reforça a seleção microbiana em prol da comunidade produtora de H₂.

Observou-se que as concentrações de substrato utilizadas não causaram inibição do processo de produção de biogás, já que o potencial de produção de hidrogênio, bem como a produção acumulada do referido gás, aumentaram com o aumento da concentração de sacarose.

Em todos os ensaios foram detectados ácido acético e etanol, o que indica, provavelmente, que não ocorreu a rota de degradação envolvendo ácido butírico.

A duração da fase *lag* foi maior nos ensaios com 0,6 e 1,2 g/L de sacarose. Considerando que o enriquecimento da biomassa foi realizado com 2 g/L de sacarose, concluiu-se que a comunidade microbiana necessitou de mais tempo para se adaptar e iniciar a produção de hidrogênio nos ensaios com menor concentração de substrato. Observou-se máximo rendimento de produção de H₂, maior eficiência de conversão teórica e menor produção de ácido acético no ensaio com 2,1 g/L de sacarose.

Destaca-se que os rendimentos de conversão a sacarose obtidos experimentalmente, de até 21% da eficiência teórica, foram próximos ao encontrado na bibliografia em ensaios com condições similares.

A concentração de substrato foi fator importante na seleção das populações, conforme resultado obtido na análise de DGGE. O ensaio com 0,6 g/L de sacarose iniciais apresentou maior diversidade microbiana, ou seja, menor purificação da comunidade microbiana.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARTACEK, J.; ZABRANSKA, J.; LENSKY, P. N. L. – Developments and constraints in fermentative hydrogen production. *Biofuels Bioproducts & Biorefining-Biofpr*, v.1, p. 201-214, 2007.

BBC Brasil – Guia de Energia Global. Disponível em [<http://www.bbc.co.uk/portuguese/especial/1931_energia/index.shtml>](http://www.bbc.co.uk/portuguese/especial/1931_energia/index.shtml). Acesso em dezembro de 2012.

DAS, D.; VEZIROGLU, T.N. – Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. *International Journal of Hydrogen Energy*, 26 (1), p. 13-28, 2001.

DEL NERY, V. Utilização de lodo anaeróbio imobilizado em gel no estudo de partida de reatores de fluxo ascendente com manta de lodo. Dissertação de Mestrado, Escola de Engenharia de São Carlos, USP, 1987.

DMS – Scientific Services of Culture Collections. Curso Ministrado na Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia “André Tosello”, Campinas, 1991.

DUBOIS, S.M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.L.; REBERS, P.A.; SMITH, F. – Colorimetric methods for determination of sugar and related substance. *Analytical Chemistry*, 28(3), p. 350-356, 1956.

FAN, Y.; LI, C.; LAY, J.J.; HOU, H.; ZHANG, G. - Optimization of initial substrate and pH levels for germination of sporing hydrogen-producing anaerobes in cow dung compost. *Bioresource Technology*, v.91, p. 189–193, 2004.

FANG, H. H. P.; LIU, H. – Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture. *Bioresource Technology*, v.82, p. 87-93, 2002.

FANG, H. H. P., LI, C. L. & ZHANG, T. – Acidophilic biohydrogen production from rice slurry. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 31, p. 683-692, 2006.

FANG, H. H. P., ZHANG, T. & LI, C. – Characterization of Fe-hydrogenase genes diversity and hydrogen-producing population in an acidophilic sludge. *Journal of Biotechnology*, v. 126, p. 357-364, 2006.

FERNANDES, B.S. - Produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fico. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, 2008.

FUJISHIMA S., MIYAHARA, T., NAIKE, T. - The effect of moisture content on anaerobic digestion of dewatered sludge: ammonia inhibition to carbohydrate removal and methane production. *Water Science and Technology*, 41, p. 119-127, 2000.

GRIFFITHS, R.I., WHITELEY, A.S., O`DONNELL, A. G. - Rapid Method for coextraction of DNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA and rRNA-based microbial community composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000.

HALLENBECK, P.C. - Fundamental of the fermentative production of hydrogen. Anaerobic Digestion. 10th Word Congress Moreal, Canada, 1, p. 249-252, 2004.

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

HALLENBECK, P. C.; GHOSH, D. - Advances in fermentative biohydrogen production: the way forward? *Trends in Biotechnology*, Vol. 27, N°. 5, p. 287-297, 2009.

HAN, S.K.; SHIN, H.S. - Biohydrogen production by anaerobic fermentation of food waste. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29, p. 569-577, 2004.

HAWKES, F.R.; FORSEY, H.; PREMIER, G.C.; DINSDALE, R.M.; HAWKES, D.L.; GUWY, A.J.; CHERRYMAN, J.M.S.; SHINE, J.; AUTY, D. – Fermentative production of hydrogen from a wheat flour industry co-product. *Bioresource Technology*, 99(11), p. 5020-5029, 2008.

HERBERT, D.; PHILIPPS, O.S.; STRANG, R.E. - Carbohydrate analysis. *Methods Enzymol SB*, p. 265-277, 1971.

HNIMAN, A.; PRASERTSAN, P.; O-THONG, S. – Community analysis of thermophilic hydrogen-producing consortia enriched from Thailand hot springwith mixed xylose and glucose. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36, p. 14217-14226, 2010.

KHANAL, S. K., CHEN, W. H., LI,L.; SUNG,S. - Biological hydrogen production: effects of pH and intermediate products. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29, p. 1123 – 1131, 2004.

KIM, D-H.; HAN, S-K.; KIM, S-H.; SHIN, H-S. - Effect of gas sparging on continuous fermentative hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31, p. 2158-69, 2006.

KIM, D.H., & KIM, M.S. - Thermophilic fermentative hydrogen production from various carbon sources by anaerobic mixed cultures.

International Journal of Hydrogen Energy, v. 37, Issue 2, p. 2021-2027, 2012.

KRAEMER, J. T. & BAGLEY, D. M. - Improving the yield from fermentative hydrogen production. *Biotechnology Letters*, 29, p. 685-695, 2007.

LAY, J. J.; LEE, Y. J.; NOIKE, T. – Feasibility of biological hydrogen production from organic fraction of municipal solid waste. *Water Research*, v.33, p. 2579-2586, 1999.

LEITE, J. A. C.; FERNANDES, B.S.; POZZI, E.; BARBOZA, M.; ZAIAT, M. - Application of na Anaerobic Packed-bed Bioreactor for the Production of Hydrogen and Organic Acids. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.33, p. 579-586, 2008.

LEVIN, D.B.; ISLAM, R.; CICEK, N.; SPARLING, R. – Hydrogen production by Clostridium tgermocellum 27405 from cellulosic biomass substrates. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 31, p. 1496-1503, 2006.

LIU, H.; ZHANG, T.; FANG, H. H. P. – Thermophilic H₂ production from a cellulose-cointaining wastewater. *Biotechnol Lett*, 25, pp. 365-369, 2003.

LOGAN, B. E., OH, S.E., VAN GINKEL, S.W. - Biological hydrogen production measured in batch anaerobic respirometers. *Environ Sci Technol*; 36 (11) : 2530–5, 2002.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. – *Microbiologia de Brock*. São Paulo: Prentice Hall, 10^a Edição, 2004.

MAINTINGUER, S. I.; FERNANDES, B. S.; DUARTE, I. C. S.; SAAVEDRA, N. K.; ADORNO, M. A. T.; VARESCHE, M. B. – Fermentative hydrogen production by microbial consortium. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.33, p. 4309-4317, 2008.

MAINTINGUER, S. I.; FERNANDES, B. S.; DUARTE, I. C. S.; SAAVEDRA, N. K.; ADORNO, M. A. T.; VARESCHE, M. B. – Fermentative hydrogen production with xylose by *Clostridium* and *Klebsiella* species in anaerobic batch reactors. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.36, p. 13508-13517, 2011.

MMA – Ministério do Meio Ambiente, República Federativa do Brasil. Energias Renováveis – Hidrogênio. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/clima/energia/energias-renovaveis/item/124>> . Acesso em dezembro de 2012.

MU, Y.; YU, H.Q.; WANG,G. - A kinetic approach to anaerobic hydrogen-producing process. *Water Research*, 41, p. 1152-1160, 2007.

NANDI, R. & SENGUPTA, S. - Microbial production of hydrogen: An overview. *Critical Reviews in Microbiology*, 24, p. 61-84, 1998.

NIELSEN, A.T., LIU, W-T, FILIPE, C., GRADY, L., MOLIN, S., STHAL, D.A. - Identification of a novel group of bacteria in sludge from a deteriorated biological phosphorus removal reactor. *Applied Environmental Microbiology*, 1999.

NICODEMOS, R.M ; LIMA, A. M. de ; ASSIS, A. J. de . - Produção de hidrogênio a partir da fermentação de compostos orgânicos. XII SIC, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, 2008.

RODRIGUES, J. A. R. – Do engenho à biorrefinaria. A usina de açúcar como empreendimento industrial para a geração de produtos bioquímicos e biocombustíveis. *Química Nova*, v. 34, nº 7, p. 1242-1254, 2011.

ROSSETTO, A. J. - Utilização agronômica dos subprodutos e resíduos da indústria açucareira e alcooleira. In: Paranhos, S.B. (ed.). Cana-de-açúcar: cultivo e utilização. Campinas: Fundação Cargill, v.2, p.435-504, 1987.

SHIN, H. S.; YOUN, J. H. – Conversion of food waste into hydrogen by thermophilic acidogenesis. *Biodegradation*, 16, pp. 33-44, 2005.

TCHOBANOGLOUS, G.; BURTON, F. L.; STENSEL, H. D. - Wastewater engineering: treatment and reuse. Metcalf & Eddy. 4º Edition Boston, McGrawHill, Inc. 1819 p. 2003.

VAN GINKEL, S.W., LAY, J.J., SUNG, S. - Biohydrogen production as a function of pH and substrate concentration. *Environ Sci Technol*. 35 (24) : 4719–25. 2001.

VAN GINKEL, S.W.; OH, S.E.; LOGAN, B.E. – Biohydrogen gas production from food processing and domestic wastewaters. *International Journal of Hydrogen Energy*, 30 (12), p. 1535-1542, 2005.

VIGNAIS, P.M. & BILLOUD, B. - Occurrence, classification, and biological function of hydrogenases: an overview. *Chem. Rev* 107, 4206-4272, 2007.

VIJAYARAGHAVAN,K.; SOOM, M.A.M. - Trends in biological hydrogen production – a review. *International Journal of Hydrogen Energy*, in press, 2004.

WANG, J.; WAN, W. - The effect of substrate concentration on biohydrogen production by using kinetic models. *Science in China Series B-Chemistry*, v.51, p. 1110-1117, 2008.

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

WIDDEL, F.; PFENNIG, N. - Genus Desulfobacter. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2, 1599p., 1984.

YOKOYAMA, H.; WAKI, M.; OGINO,A.; OHMORI, H.; TANAKA, Y. - Hydrogen Fermentation Properties of Undiluted Cow Dung. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 104(1), p. 82-85, 2007.

ZHU, H.; PARKER, W.; BASNAR, R.; PRORACKI, A.; FALLETTA, P.; BÉLAND, M.; SETO, P. – Buffer requirements for enhanced hydrogen production in acidogenic digestion on foods wastes. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 5097-5102, 2009.

ZWIETERING, M. H., JONGERBURGER, I., ROMBOUTS, F. M. & VANTRIET, K. - Modeling of the bacterial-growth curve. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, p. 1875-1881, 1990.