

ANDRESSA ESTEVAM

OBTENÇÃO DE BiOH_2 A PARTIR DA FERMENTAÇÃO ANAERÓBIA
DE EFLUENTE DE CERVEJARIA UTILIZANDO CULTURA PURA
ISOLADA DO AMBIENTE

CASCVEL
PARANÁ - BRASIL
MARÇO - 2017

ANDRESSA ESTEVAM

OBTENÇÃO DE BiOH_2 A PARTIR DA FERMENTAÇÃO ANAERÓBIA
DE EFLUENTE DE CERVEJARIA UTILIZANDO CULTURA PURA
ISOLADA DO AMBIENTE

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação de Engenharia em Energia na Agricultura, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Helton José Alves

Coorientador: Prof. Dr. Cristiano Andrigheto

CASCADEL
PARANÁ - BRASIL
MARÇO-2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

E84o Estevam, Andressa .
Obtenção de BIOH 2 a partir da fermentação anaeróbia de efluente de cervejaria utilizando cultura pura isolada do ambiente. / Andressa Estevam. — Cascavel - PR: UNIOESTE, 2017. 81f.

Orientador: Prof. Dr. Helton José Alves
Coorientador: Prof. Dr. Cristiano Andrigheto

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Cascavel, 2017
Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Energia na Agricultura - PPGEA.
Bibliografia
1. Biogás. 2. Hidrogênio. 3. Digestão anaeróbia. 4. Resíduos como combustível. I. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. II. Título.

CDD 20.ed. 621.47

Ficha catalográfica elaborada por Rosângela A. A. Silva – CRB 9ª/1810

ANDRESSA ESTEVAM

Obtenção de BioH₂ a partir da fermentação anaeróbia de efluente de cervejaria utilizando cultura pura isolada do ambiente

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Energia na Agricultura em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Energia na Agricultura, área de concentração Agroenergia, linha de pesquisa Biocombustíveis, APROVADO(A) pela seguinte banca examinadora:



Orientador(a) - Helton José Alves

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)



Simone Damasceno Gomes

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)



Adriana Fiorini

Cascavel, 13 de março de 2017

Àqueles que me apoiaram incondicionalmente, meus pais, Jorge e Maria Neide, por todo amor, compreensão, apoio e incentivo principalmente nas dificuldades vividas durante essa fase. Sem vocês nenhuma conquista faz sentido.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade de concluir esse trabalho me apontando o caminho correto e pela força para superar os desafios que surgiram ao longo desse período;

À UNIOESTE por fornecer os recursos para a realização desta pesquisa;

À Capes pelo incentivo financeiro concedido;

Ao professor Dr. Helton José Alves pela excelente orientação, pelo apoio, paciência e por confiar no meu trabalho;

Ao professor Dr. Cristiano Andrigueto pela co-orientação e apoio ao longo dos experimentos;

A prof^o Mabel Arantes por toda a ajuda e apoio na realização dos experimentos, por ensinar com paciência e por todo o suporte que me ofereceu, principalmente nos últimos meses;

Ao professor Jamal Awadallak pela ajuda com a modelagem cinética do trabalho;

Aos colegas do Laboratório de Catálise e produção de Biocombustíveis, em especial a Monica, Andressa, Fernanda e Carine pela agradável convivência, amizade e companheirismo. Aos amigos e namorado que souberam compreender os períodos de ausência e aturaram todo o estresse;

A minha família, destaco aqui meus avós e tios, pelas orações, pela força e por acreditar em mim e na minha capacidade de seguir em frente;

A Universidade Federal do Paraná por fornecer recursos e equipamentos para a realização desta pesquisa.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ART	Açúcares Redutores Totais
AVG	Ácidos Graxos Voláteis
AnBR	Anaerobic Batch Reactor
BioH ₂	Biohidrogênio
CG	Cromatografia a gás
CH ₄	Metano
CO ₂	Dióxido de Carbono
C/N	Carbono/Nitrogênio
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CO	Monóxido de Carbono
DBO	Demanda bioquímica de oxigênio
DQO	Demanda química de oxigênio
H ₂	Hidrogênio (gás)
NH ₃ -N	Nitrogênio amoniacal
PO ₄ ³⁻	Fosfato inorgânico
ST	Sólidos totais
STF	Sólidos Totais Fixos
STV	Sólidos Totais voláteis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema da fermentação anaeróbia	6
Figura 2. Ágar MacConkey contendo um isolado do grupo <i>Enterobacter-Klebsiella</i> .22	
Figura 3. Frasco utilizado nos ensaios preliminares.....	25
Figura 4. Reator anaeróbio de mistura mecânica e sistema de medição de volume de biogás.....	26
Figura 5. Curva de crescimento referente a cepa 2.	33
Figura 6. Lâmina de colocação de Gram referente a cepa 2.	36
Figura 7. Composição do biogás para duas cepas (1 e 2) e quatro tipos de substrato	37
Figura 8. Resultados obtidos para os ensaios 1, 2 e 3 referentes a: Volume de H ₂ , variação do pH, concentração de açúcares (ART) e concentração celular,	41
Figura 9. Composição do Biogás para os ensaios 1 (A), 2 (B) e 3 (C).	42
Figura 10. Produção volumétrica de H ₂ dos ensaios 2 a 5 em que: (A) produção diária e (B) produção acumulada.	43
Figura 11. Comparativo entre Produção volumétrica, consumo de ART e concentração celular nos ensaios 4 e 5.....	44
Figura 13. Composição dos ácidos orgânicos para os ensaios 2 a 5 ao longo do tempo.	47
Figura 14. Modelagem cinética normalizada para o ensaio 4.	56
Figura 15. Modelagem cinética normalizada para o ensaio 5.	56
Figura 16. Composição % dos para os ácidos orgânicos produzidos nos ensaios 4 e 5.	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Micro-organismos utilizados como cultura pura para produção de H ₂	10
Tabela 2. Estudos sobre o efeito da variação de temperatura na produção de H ₂ ...	12
Tabela 3. Comparação do rendimento entre diferentes substratos na produção de H ₂	14
Tabela 4. Exemplos de substratos utilizados na fermentação para produção de H ₂ .	15
Tabela 5. Caracterização físico-química de efluente de cervejaria	18
Tabela 6. Caracterização inicial do efluente bruto em comparação à legislação	19
Tabela 7. Estudos utilizando efluente de cervejaria como substrato para produção de H ₂	20
Tabela 8. Composição do efluente sintético contendo glicerol como fonte de carbono	23
Tabela 9. Identificação e composição dos substratos utilizados isoladamente ou em mistura	24
Tabela 10. Frequência das análises realizadas para os ensaios de produção de H ₂	28
Tabela 11. Caracterização bioquímica para os isolados	35
Tabela 12. Caracterização físico química do Lote 1 de efluente de cervejaria	38
Tabela 13. Caracterização físico química do Lote 2 de efluente de cervejaria	39
Tabela 14. Variação de DQO entre os ensaios 2 a 5	48
Tabela 15. Variação de alcalinidade, concentração de sólidos totais, fósforo inorgânico e relação C/N para os ensaios 2 a 5.	49
Tabela 16. Comparação dos resultados obtidos neste trabalho e resultados da literatura para os parâmetros: Produtividade, Vazão de biogás, teor de hidrogênio e vazão molar.....	52
Tabela 17. Comparação dos resultados obtidos neste trabalho e resultados da literatura para Produção de H ₂ utilizando culturas puras.....	54
Tabela 18. Parâmetros cinéticos relacionados à modelagem cinética realizada.....	55

ESTEVAM, Andressa. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, agosto de 2016.
Obtenção de BIOH₂ a partir da fermentação anaeróbia de resíduo de cervejaria utilizando cultura pura isolada do ambiente. Prof. Dr. Helton José Alves, Prof. Dr. Cristiano Andrigheto

RESUMO

A busca por combustíveis alternativos para substituir a demanda atual de combustíveis fósseis vem crescendo mundialmente, como é o caso da utilização de biomassa para a produção de energia limpa. O H₂, além de ser importante insumo no setor industrial é um excelente combustível devido a seu poder calorífico e à não geração de gases poluentes. A produção de hidrogênio por fermentação anaeróbia vem se destacando como uma importante rota de produção pois permite a utilização de substratos residuais por micro-organismos produtores de H₂. Tais micro-organismos podem ser encontrados em muitas fontes na forma de consórcios microbianos anaeróbios, para uso na forma de cultura mista ou para isolamento de espécies. Este trabalho teve como objetivo o isolamento de bactérias do ambiente, com capacidade de produzir hidrogênio por fermentação anaeróbia de diferentes substratos e a aplicação destas culturas à produção de H₂ utilizando como fonte de carbono o efluente de cervejaria. Cepas de bactérias isoladas de cama de aviário foram caracterizadas e testadas quanto ao potencial de produção de H₂ em ensaios de pequena escala, em frascos estáticos e diferentes substratos, em condição mesofílica. A partir da seleção de uma cepa de melhor performance foram conduzidos ensaios em reator agitado mecanicamente, em batelada com duração de 72 horas e utilizando como fonte de carbono efluente de cervejaria, exclusivamente. A produção de H₂ ocorreu em todos os ensaios sendo obtidos os valores médios de vazão de biogás de 72 mL h⁻¹, vazão molar de H₂ de 1,2 mmol H₂ h⁻¹ e teor de H₂ no biogás de 30 a 40%, sendo este composto somente por CO₂ e H₂.

PALAVRAS-CHAVE: biogás, hidrogênio, digestão anaeróbia, inóculo puro, resíduos da agroindústria

ESTEVAM, Andressa. State University of West of Paraná, August 2017. **Obtaining BIOH₂ from the anaerobic fermentation of agro-industrial wastes using pure cultures isolated from environment.** Professor. Dr. Helton José Alves, Professor. Dr. Cristiano Andrigheto.

ABSTRACT

The search for alternative fuels to replace the current demand for fossil fuels is growing worldwide, as is the case of the use of biomass for the production of clean energy. H₂, besides being an important input in the industrial sector, is an excellent fuel due to its calorific value and the non-generation of gaseous pollutants. The production of hydrogen by anaerobic fermentation has been highlighted as an important route of production because it allows the use of residual substrates by microorganisms producing H₂. Such microorganisms can be found in many sources in the form of anaerobic microbial consortia, for use in the form of mixed culture or for isolation of species. This work aimed at the isolation of bacteria from the environment, with the capacity to produce hydrogen by anaerobic fermentation of different substrates and the application of these cultures to the production of H₂ using as a source of carbon the brewery effluent. Strains of bacteria isolated from avian litter were characterized and tested for potential H₂ production in small scale trials, in static bottles and different substrates, in mesophilic condition. From the selection of a strain of better performance, the experiments were carried out in a mechanically stirred reactor, in a batch of 72 hours and using exclusively the brewery effluent. The H₂ production occurred in all the tests and the average biogas flow rate was 72 mL h⁻¹, H₂ H₂ molar flow rate of 1.2 mmol H₂ h⁻¹ and H₂ content in the biogas of 30 to 40%, being this compound only by CO₂ and H₂.

KEYWORD: Biogas, hydrogen, anaerobic digestion, pure inoculum, agro-industrial waste

Índice

INTRODUÇÃO	1
1. OBJETIVOS.....	3
2.2. Objetivos específicos	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1. Hidrogênio.....	4
3.2. Fermentação Anaeróbia.....	5
3.3. Micro-organismos produtores de H ₂	8
3.4.1. Bactérias metanogênicas	10
3.4.2. Temperatura.....	11
3.4.3. pH.....	13
3.4.4. Substrato.....	14
3.5. A problemática do efluente de cervejaria e o potencial para a produção de BioH ₂	16
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
4.1. Materiais e procedimentos referentes à 1 ^a etapa do trabalho	21
4.1.2. Caracterização bioquímica dos isolados e seleção de cepas para ensaios de produção de H ₂	22
4.1.3. Determinação da cinética de crescimento da cepa selecionada 23	
4.1.4. Substratos avaliados nos testes iniciais de produção de H ₂	23
4.1.5. Ensaios em frascos estáticos e batelada	24
4.2. Materiais e procedimentos referentes à 2 ^a etapa do trabalho	26
4.2.1. Reator Anaeróbio de mistura mecânica	26
4.2.2. Ensaios de produção de H ₂ em reator.....	27
4.2.3. Tratamentos e resultados.....	28
4.2.4. Modelagem cinética do processo de produção de hidrogênio ..	29
4.2.5. Modelo para o reator batelada	31
4.2.6. Métodos numéricos	32
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5.1. Isolamento e caracterização dos micro-organismos	32
5.2. Avaliação das cepas produtoras de H ₂ em diferentes substratos ...	36
5.3. Ensaio de produção de H ₂ em reator anaeróbio	39
5.3.1. Ensaios com liberação do biogás de forma intermitente	39
5.3.2. Ensaios com liberação do biogás de forma contínua	42
5.3.3. Identificação das rotas metabólicas seguidas no bioprocessos ..	45
5.3.4. Avaliação de parâmetros físico químicos	49

	5.3.5. Comparação da produção de H ₂ entre este trabalho e a literatura	50
	5.3.6. Modelagem cinética da biorreação.....	54
6.	CONCLUSÕES.....	59
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

1. INTRODUÇÃO

Durante muitos anos os combustíveis fósseis dominaram o mercado, porém, o impacto ambiental causado pela sua utilização tem levado os cientistas a buscarem cada vez mais energias limpas e alternativas (Dermibas, 2007; Long et al., 2013). Entre os combustíveis potencialmente cotados para substituir a dependência dos combustíveis fósseis está o hidrogênio, e sua produção tem se destacado como um recurso sustentável para os problemas econômicos e ambientais causados pelo uso massivo dos combustíveis fósseis. Considerado uma energia limpa, sua combustão pode fornecer até 2,75 vezes mais energia que na combustão de hidrocarbonetos, além de que o produto da sua combustão é água (LAY et al., 1999).

Dentre as diversas formas de obtenção do hidrogênio, destacam-se a eletrólise, a reforma de combustível e a obtenção biológica. Atualmente a maior parte do hidrogênio obtido em escala industrial é baseado na reforma a vapor, que utiliza energia térmica para dissociá-lo. A energia utilizada para promover essa dissociação é majoritariamente da queima de combustíveis fósseis, o que ainda classifica o hidrogênio como combustível fóssil quando o sistema global é considerado.

A produção de hidrogênio se dá também a partir de gás natural, de óleos pesados ou Nafta e do carvão (DAS E VEZIROGLU, 2008). Além destas técnicas é possível citar ainda a gaseificação, pirólise, biodigestão anaeróbia e a fermentação (OLALEYE *et al.*, 2014; INTANOO *et al.*, 2014).

Dentre as formas de produção de hidrogênio que se tem conhecimento, a produção biológica está em evidencia atualmente. A fermentação da biomassa residual é uma alternativa promissora (LEVIN E CHAHINE, 2009) principalmente devido a sua simplicidade e a possibilidade de utilização de diversos substratos (MONLAU et al., 2013).

A produção de hidrogênio através da fermentação microbiológica por culturas mistas ou puras tem se destacado como alternativa energética devido ao baixo impacto ambiental utilizando-se de materiais renováveis como a matéria orgânica presente em águas residuárias (PENTEADO, 2012).

Uma variedade de culturas capazes de produzir hidrogênio em grande escala tem sido isolada de lodos oriundos de processos anaeróbios, solo, água e esgotos, tornando esses materiais inóculos em meios para a produção de hidrogênio. Diversos estudos são conduzidos utilizando culturas puras, principalmente de micro-

organismos como *Clostridium* e *Enterobacter*, em diversos substratos residuais, tornando esse processo biotecnológico uma alternativa para a produção de energia limpa aliada ao aproveitamento residual (POLETO, 2014).

O efluente de cervejaria pode ser considerado como um potencial substrato para a produção de hidrogênio, uma vez que apresentam elevadas cargas orgânicas que, geralmente, não atendem aos padrões de lançamentos determinados pelas leis ambientais (TABATABAEI et al., 2010; XIANGWEN et al., 2008). Tendo em vista os benefícios ambientais e energéticos condizentes ao processo de fermentação anaeróbia, tornam-se pertinentes os trabalhos visando a obtenção de hidrogênio por fermentação anaeróbia (BioH₂) de resíduos agroindustriais a partir de inóculos puros isolados do ambiente.

1. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Produção de H₂ a partir de inóculos puros isolados do ambiente.

2.2. Objetivos específicos

Obter culturas puras viáveis de bactérias da família *Enterobacteriaceae* isoladas de cama de aviário e fezes de suínos.

Selecionar uma cultura para avaliação de produção de H₂ por fermentação anaeróbia.

Avaliar a utilização de uma cultura pura para a produção de H₂ utilizando como substrato água residuária sintética e de cervejaria em frascos e pequena escala.

Avaliar a produção de H₂ em reator anaeróbio de agitação mecânica, com aumento de escala.

Modelagem cinética da produção de biohidrogênio em reator anaeróbio.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Hidrogênio

O H₂ foi identificado pela primeira vez pelo cientista britânico Henry Cavendish em 1776, é um gás incolor, inodoro e insípido e é considerado insolúvel em água (Demirbas, 2009). É classificado como o elemento mais abundante e também o mais leve do universo, correspondendo a $\frac{3}{4}$ de toda a matéria existente sendo encontrado somente em seu estado associado.

Devido ao gás H₂ não estar na forma disponível em quantidades significativas na natureza, este é considerado como um vetor energético (armazenador de energia), sendo necessário sua extração de uma fonte primária. Para ser obtido em sua forma pura, emprega-se quantidades de energia para dissociá-lo de uma fonte primária (DEMIRBAS, 2009).

O H₂ tem se apresentado como uma fonte em potencial de energia renovável (DEMIRBAS, 2009), possui 122 KJ g⁻¹ de calor de combustão, podendo fornecer até 2,75 vezes mais energia que a combustão de hidrocarbonetos, tendo a água como produto (LAY *et al.*, 1999).

Dentre as diversas formas de obtenção do H₂, destacam-se a eletrólise, a reforma de combustível e a obtenção biológica. Atualmente a maior parte do H₂ obtido em escala industrial é baseado na reforma a vapor, que utiliza energia térmica para dissociá-lo. Na Equação 1 estão representadas as reações envolvidas na produção de H₂ a partir da reforma a vapor do metano (CH₄).



A reforma a vapor do metano é um processo altamente endotérmico, favorecido por baixas pressões e altas temperaturas (650 - 850°C) e embora, como dito anteriormente, seja a tecnologia mais empregada atualmente na indústria esse processo possui como desvantagem os grandes gastos energéticos (SCHWENGBER, 2015).

Enquanto que a reação de deslocamento gás - água ou *Shift* (Equação 2) é utilizada para remover o monóxido de carbono (CO) produzido na primeira etapa ocorre em temperaturas mais baixas (300 - 400°C).



Segundo Das e Veziroglu (2008), a produção de H₂ se dá também a partir de gás natural, de óleos pesados ou Nafta, do carvão e a partir de eletrólise. Além destas técnicas é possível citar ainda a gaseificação, pirólise, biodigestão anaeróbia e a fermentação (OLALEYE *et al.*, 2014; INTANOO *et al.*, 2014).

O BioH₂ pode ser obtido através de duas maneiras: fotossíntese e processo fermentativo, sendo a fermentação o processo mais simples, apresentando as maiores velocidades de obtenção do H₂ (Lay *et al.*, 1999; Mathews e Wang, 2009). Os processos fotossintéticos são catalisados pela presença de luz, o que aumenta o custo do processo com o gasto de energia. Além disso, esse processo é altamente sensível a presença de oxigênio atmosférico.

A obtenção biológica vem sendo a mais atrativa tecnologia de obtenção de H₂ nos últimos anos, devido ao baixo custo e ao baixo consumo de energia durante o processo (HAN e SHIN, 2004).

3.2. Fermentação Anaeróbia

A fermentação anaeróbia é um processo biológico onde um consórcio de diferentes tipos de micro-organismos promove conversão de compostos orgânicos complexos (carboidratos, proteínas e lipídios) em compostos mais simples, como ácidos orgânicos voláteis, álcoois, H₂, CO₂ e CH₄.

O processo de fermentação anaeróbia dividido em quatro etapas principais: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese. Na hidrólise as bactérias hidrolíticas produzem enzimas extracelulares degradam os materiais particulados complexos em compostos dissolvidos mais simples e permeáveis às membranas celulares das bactérias.

Na acidogênese, os compostos solúveis oriundos da hidrólise são metabolizados no interior das células das bactérias, e são convertidos em compostos mais simples. Esses compostos incluem os ácidos orgânicos voláteis (AVG), álcoois, dióxido de carbono (CO₂), H₂, e novas células bacterianas.

Na acetogênese as bactérias acetogênicas oxidam os produtos gerados na etapa anterior em um H₂ e ácido acético para as arqueias metanogênicas. Nesta fase do processo, o H₂ produzido também pode ser convertido em ácido acético pelas bactérias homoacetogênicas.

Na última etapa do processo, as arqueias metanogênicas convertem o H_2 e o ácido acético em metano (CH_4) e monóxido de carbono (CO). As arqueias metanogênicas podem ser divididas em metanogênicas acetoclásticas, que utilizam o ácido acético como substrato, e metanogênicas hidrogenotróficas, que utilizam o H_2 como substrato, devido a afinidade pelo substrato, como pode ser visualizado na Figura 1.

Durante todo o processo alguns metabolitos secundários produzidos são consumidos logo em seguida, assim como o H_2 , por isso, para a produção de H_2 o processo precisa parar após a acetogênese (ALBANEZ, 2015).

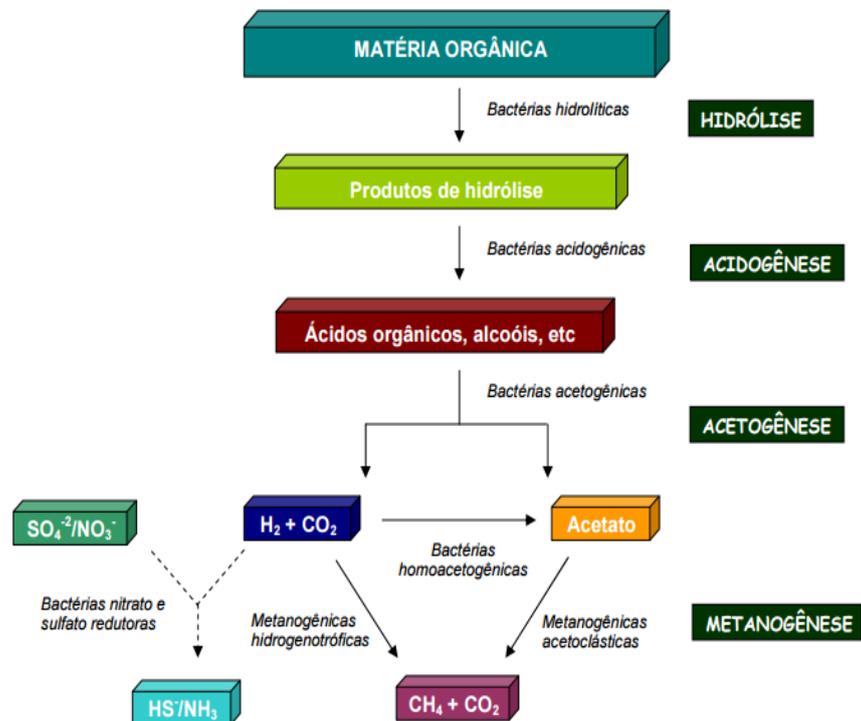
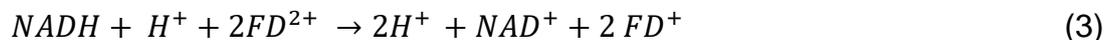


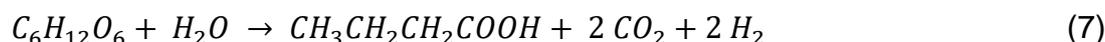
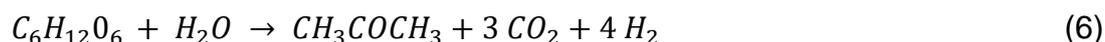
Figura 1. Esquema da fermentação anaeróbia
Fonte: DE SÁ *et al.*, 2014.

A fermentação se inicia com a quebra das moléculas de glicose, através da via glicolítica a glicose é convertida em piruvato e a partir dele várias rotas fermentativas podem ser utilizadas até a formação dos produtos finais da fermentação (Vardar-Schara *et al.*, 2008), considerando uma molécula de glicose ignorando possíveis desvios para outras rotas metabólicas, a cada molécula de glicose metabolizada, ao final da reação obtém-se duas moléculas de piruvato, dois ATP (adenosina trifosfato) e dois NADH (dinucleótido de nicotinamida e adenina) formados.

A obtenção do H₂ molecular pode ocorrer por duas vias, na presença de coenzimas específicas, através da via de decomposição do ácido fórmico ou por reoxidação da via do NADH, equação (3) e (4).



Teoricamente apenas 4 mols de H₂ podem ser obtidos para cada mol de glicose através da fermentação quando a glicose é o açúcar utilizado e o substrato for convertido a ácido acético. Os maiores rendimentos são encontrados quando acetato ou acetona são os produtos da fermentação enquanto que os menores rendimentos são encontrados quando álcoois são produzidos (Vardar-Schara *et al.*, 2008), como pode ser observado nas Equações 5, 6 e 7.



Fonte: Vardar-Schara *et al.*, (2008).

Caso o substrato seja convertido em ácido butírico, apenas 2 mols de H₂ são obtidos a cada dois mols de glicose, devido ao consumo de dois mols de NADH durante a formação dos produtos intermediários. A relação de H₂ produzido durante a fermentação da glicose é determinada pela relação de acetato/butirato produzido na fermentação.

A concentração de H₂ obtido nessas reações dependerá diretamente da via metabólica seguida pelos micro-organismo. Para garantir a máxima produção de H₂, o ideal seria que o processo seguisse sempre a rota metabólica do acetato, porém, devido a manutenção da concentração de NADH e NAD⁺ no sistema isso não é possível (REN *et al.*, 2008).

Para manter o equilíbrio dinâmico na oxidação e redução do NAD⁺/NADH o NADH deve ser consumido para gerar propionato, lactato, etanol e butanol, o que consequentemente diminui o rendimento na produção de H₂ (Lee *et al.*, 2011; Ren *et al.*, 2008). Desta forma, a influencia no metabolismo para favorecer a rota desejada é realizada através da operação do reator.

3.3. Micro-organismos produtores de H₂

Uma variedade de micro-organismos tem sido utilizado para a produção de H₂ via fermentação, as espécies mais comumente associadas a produção biológica de H₂ durante a acidogênese são *Enterobacter*, *Bacillus* e *Clostridium* (Kapdan & Kargi, 2006; Mohan, 2009; Barros *et al.*, 2011). Esses micro-organismos podem ser classificados em quatro grupos distintos: anaeróbios estritos, anaeróbios facultativos, aeróbios e fototróficos (FANG *et al.*, 2006).

Micro-organismos aeróbios e anaeróbios podem ser facilmente encontrados no ambiente, como no solo e na água, especialmente os micro-organismos anaeróbios podem ser encontrados no lodo de estações de tratamento de efluentes que aplicam a digestão anaeróbia para tratar seus resíduos, sendo assim, estas fontes podem ser utilizadas como inóculo dos reatores que visam a produção de H₂ (WANG E WANG, 2009).

Os micro-organismos mais citados como produtores de H₂ pertencem a espécie *Clostridium* e são anaeróbios estritos, enquanto que entre os micro-organismos facultativos destacam-se os *Bacillus* e *Enterobacter* (Madigan *et al.*, 2004). A utilização desses micro-organismos pode ser feita através de uma cultura pura (Elsharnouby *et al.*, 2012) ou através de uma cultura mista (Badiei *et al.*, 2013), em larga escala o emprego de culturas mistas tem se mostrado o mais viável e vantajoso.

Embora a utilização de culturas mistas seja apontada como mais práticas e onde os maiores rendimentos são encontrados, as condições operacionais afetam diretamente a comunidade microbiológica influenciando as vias metabólicas, conseqüentemente afetando o rendimento da produção de H₂ (FANGKUM e REUNGSANG, 2011).

Nas culturas mistas uma variedade de micro-organismos que consomem H₂ podem ser encontrados como bactérias metanogênicas, homoacetogênicas, bactérias hidrogenotróficas redutoras de sulfato, bactérias nitrato redutoras, etc. Portanto, a utilização de culturas mistas pode resultar em consumo do H₂ produzido, rendimento reduzido e aumento da formação de produtos finais e levar ao processo de inibição da reação (BUNDHOO e MOHEE, 2016).

As culturas puras são caracterizadas pela utilização de um tipo de micro-organismo, as vantagens da utilização de culturas puras na produção biológica de H₂ estão relacionadas a seletividade desses micro-organismos quanto ao substrato, a possibilidade de manipulação do metabolismo através da alteração das condições de crescimento, a redução de subprodutos e aos elevados rendimentos.

Entretanto, as culturas puras são suscetíveis às contaminações, sendo assim, para garantir a esterilidade da reação seria necessário o emprego de condições assépticas, o que aumentaria o custo global da produção (NTAIKOU *et al.*, 2010; ANTONOPOULOU *et al.*, 2008; FANG, 2010).

Sá *et al.*, (2013) estudou caminhos metabólicos dos organismos do gênero *Clostridium* na conversão dos substratos glicerol, glicose, frutose, xilose para a produção de H₂. Cabe ressaltar que na rota metabólica realizada utilizando a sacarose até o gliceraldeído-3-fosfato as reações liberam energia, enquanto que na rota a partir do glicerol até o mesmo composto orgânico há reações que consomem energia, sendo energeticamente desfavorável.

Kapdan e Kargi (2006) obtiveram 1,97 mmol H₂ g glicose⁻¹ utilizando uma cultura pura de *Enterobacter aerogenes* e 2,2 mol H₂ mol glicose⁻¹ utilizando a estirpe *Enterobacter cloacae* ITT-BY 08. Nakashimada *et al.*, (2002) obteve 1,97 mmol H₂ g substrato⁻¹.

A qualidade do inóculo é um fator que influencia na produção de H₂, pois as bactérias produtoras de H₂ são encontradas em reatores anaeróbios, sendo assim a partida dos reatores pode ser dada através de um inóculo proveniente desses reatores ou provenientes de isolamento laboratorial (REN *et al.*, 2008).

O processo fermentativo utilizando culturas puras, teoricamente, tem um manuseio mais simples, tendo um espectro maior de substratos metabolizáveis. Diversos micro-organismos anaeróbios facultativos pertencentes a família *Enterobacteriaceae* são capazes de produzir H₂, liberando CO₂ e H₂ na fase gasosa e acumulando etanol, ácido fórmico e 2,3-butanodiol na fase líquida, na Tabela 1 são apresentados exemplos de culturas puras utilizadas na produção biológica de H₂. Wang e Wan (2009) descreve a utilização de glicose como fonte de carbono em experimentos utilizando micro-organismos como *Clostridium* e *Enterobacter*, geralmente, esses experimentos são conduzidos em batelada.

Tabela 1. Micro-organismos utilizados como cultura pura para produção de H₂

Micro-organismo	Substrato	Condições utilizadas	Produção de H ₂	Referência
<i>Bacillus</i> sp. F2.5	Glicose	Batelada	1.53 mol H ₂ mol glicose ⁻¹	SHAH et al, 2016
<i>Bacillus</i> sp. F2.	Glicose	Batelada	0.88 H ₂ mol glicose ⁻¹	SHAH et al, 2016
<i>Bacillus</i> sp. F2.8	Glicose	Batelada	0.88 H ₂ mol glicose ⁻¹	SHAH et al, 2016.
<i>E. cloacae</i>	Glicose	Batelada	707mL L ⁻¹	SUN <i>et al.</i> , 2015
<i>E. cloacae</i> ITT-BT08 C.	Efluente de destilaria	Batelada	165,3 mL H ₂ g DQO ⁻¹	MISHRA e DAS 2014.
<i>pasteurianum</i> , <i>C. butyricum</i> e <i>Klebsiella</i> sp.	Glicerol	Batelada	0,93 mol H ₂ mol glicerol ⁻¹	LO <i>et al.</i> (2013).

3.4. Fatores que afetam a fermentação

Diversos são os fatores que afetam a produção biológica de H₂, sendo parâmetros operacionais ou físico-químicos, os mais importantes são o tipo de inóculo e substrato, a temperatura, a presença e a concentração de nutrientes e o pH (XIAO *et al.*, 2010; WANG & WANG, 2009).

3.4.1. Bactérias metanogênicas

As bactérias metanogênicas também afetam a produção, a presença desses micro-organismos é um dos fatores mais problemáticos no processo de obtenção de H₂, uma vez que estes consomem o H₂ produzido pelos micro-organismos desejáveis ao processo (CAI *et al.*, 2004; SINGH, 2013). Todavia, antes de inocular é necessário que se faça um pré-tratamento afim de remover as bactérias metanogênicas. O pré-

tratamento pode ser através da elevação da temperatura (choque-térmico), redução do pH ou uma combinação destes (REN *et al.*, 2008).

O pré-tratamento com a elevação da temperatura é realizado devido a algumas bactérias produtoras de H₂ formarem esporos e desta forma sobreviverem a condições extremas (Amorim *et al.*, 2008). Atualmente este é o método que vem sendo mais utilizado (Amorim, 2008; Arooj *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2010; Seifert *et al.*, 2009; Wang e Wang, 2008).

Entretanto, esta preocupação se refere principalmente ao uso de inóculos mistos, oriundos de ambientes anaeróbios metanogênicos como biodigestores, estações de tratamento, etc.

3.4.2. Temperatura

A temperatura tem uma grande influência nos processos fermentativos, pois está relacionada à taxa de crescimento e atividade metabólica dos micro-organismos (Elsharnouby *et al.*, 2013). A maioria dos experimentos realizados são conduzidos em temperaturas mesofílicas, na faixa dos 35°C (ALVES *et al.*, 2006), porém, Wang e Wang (2008) demonstraram em seus experimentos que o aumento da temperatura contribui para maiores rendimentos de H₂.

Entretanto, Fuess *et al.*, (2014) destacaram que em condições mesofílicas a produção de H₂ se torna instável e descontínua, enquanto que em condições termofílica a produção de torna estável e contínua. Nestes casos, um balanço energético deve ser realizado, pois a faixa mesofílica é geralmente preferível, pois em maiores temperaturas há o gasto energético no aquecimento das águas residuárias.

Li *et al.*, (2007) apresentaram que, 73 dos 121 estudos de caso foram realizados utilizando temperaturas mesofílicas (Valdez-Vazquez e Poggi-Varaldo, 2009), entretanto, a temperatura ótima para cada processo depende do tipo e origem do inóculo, da quantidade de compostos biodegradáveis presentes e das condições operacionais do sistema como um todo. Na Tabela 2 são elencados alguns estudos cujo foco era o efeito da temperatura na produção biológica de H₂.

Tabela 2. Estudos sobre o efeito da variação de temperatura na produção de H₂

Inóculo	Substrato	Temperatura (°C)		Rendimento Máximo de H ₂ (mol H ₂ mol de substrato ⁻¹)	Refêrencia
		Faixa estudada	Temperatura		
Lodo anaeróbio	Glicose	33 - 41	41	1,67	Mu <i>et al.</i> , 2006
Lodo de esgoto municipal	Xilose	30 - 55	50	1,30	Lin <i>et al.</i> , 2008
Lodo anaeróbio	Sacarose	25 - 45	35	3,73	Wang <i>et al.</i> , 2005
Cultura mista anaeróbia	Glicose	37 - 65	45	1,71	Karadag e Puhakka, 2010
Lodo de tratamento de águas residuárias	Sacarose	30 - 45	40	3,88	Lee <i>et al.</i> , 2006
<i>Clostridium acetobutyricum</i> ATCC824	Glicose	30 - 40	37	2,00	Chin <i>et al.</i> , 2003
<i>Ethanoligenens harbiense</i>	Glicose	20 - 50	35	1,92	Xing <i>et al.</i> , 2008
<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>	Sacarose	45 - 70	60	2,55	Chang <i>et al.</i> , 2011

A produção de H₂ utilizando Enterobactérias pode apresentar rendimentos elevados, é vantajosa do ponto de vista energético e possui características que facilitam sua utilização em larga escala. Devido ao seu comportamento mesófilo podem ser utilizadas em temperaturas que variam de 25°C a 40°C, apresentando rendimento teórico de aproximadamente 10 mol H₂ mol glicose⁻¹, o que é considerado um rendimento elevado em processos biológicos (ZHANG *et al.*, 2011).

3.4.3. pH

O pH tem um importante papel na eficiência de produção do H₂ sendo considerado peça chave na fermentação devido a sua influência na atividade enzimática e nas rotas metabólicas, assim como na hidrólise do substrato.

A presença de íons H⁺ no sistema também é importante para manter os níveis de ATP adequados, uma vez que o excesso de H⁺ faz com que o ATP seja utilizado para garantir a neutralidade da célula ao invés de ser utilizado para a produção do H₂ (GIOANNIS, 2013).

Nos experimentos de Ferchichi *et al* (2005), obtiveram-se ótimos resultados em um reator em batelada utilizando soro de queijo e variando o pH na faixa de 5 a 10. A variação influenciou a produção de H₂ de forma a obter a máxima taxa e o maior rendimento. Nas faixas mais baixas de pH foram encontrados os melhores resultados, o melhor rendimento e a melhor taxa de produção foram encontrados na faixa de pH 6. Conduzir os ensaios em pH abaixo de 4,7, inibe a atividade de enzimas relacionadas a produção de H₂, especialmente as hidrogenases, sendo assim é altamente desfavorável diminuindo a eficiência do processo (LAMAISON, 2009; LOVATO, 2014).

Devido a diversidade de micro-organismos produtores de H₂ não há um substrato preferencial, uma faixa de pH e uma temperatura ideal, esses parâmetros são condições operacionais que, não apenas determinam o crescimento dos micro-organismos, mas também influenciam na rota metabólica a ser seguida, o que afeta diretamente o rendimento final de H₂ e os subprodutos orgânicos gerados nesse processo (NTAIKOU *et al.*, 2010).

Uma das maneiras de controlar o pH para que ele se mantenha em uma faixa ideal de produção é adicionar alcalinidade no processo (LOVATO, 2014; AMORIM, 2009). A alcalinidade é uma das variáveis importantes no tratamento de efluentes

quando se utiliza a biodigestão anaeróbia, pois a redução demasiada do pH nesses ensaios afeta diretamente o metabolismo dos micro-organismos envolvidos no processo. De modo geral, a alcalinidade consiste na capacidade de neutralização de ácidos, agindo de forma a tamponar o sistema. Em meios aquosos, os íons responsáveis pela alcalinidade são HCO_3^- , CO_3^{2-} e OH^- (APHA, 2012).

3.4.4. Substrato

Um fator a ser considerado no processo de obtenção de H_2 via fermentação é a seleção do melhor substrato, levando em consideração sua disponibilidade, biodegradabilidade e custo de obtenção. Devido aos baixos custos e a facilidade de controle da fermentação, os resíduos orgânicos são considerados como um dos melhores substratos para uma produção eficiente de H_2 (SU *et al.*, 2010).

Uma grande vantagem na produção de H_2 a partir da fermentação está no fato dos micro-organismos serem capazes de selecionar o substrato mesmo quando na mistura estão presentes outros compostos (Neves, 2009). Portanto, a purificação do substrato não se faz necessária, salvo exceções onde se empregam substratos lignocelulósicos, por exemplo, onde pré-tratamentos de hidrólise são usualmente empregados no intuito de biodisponibilizar o conteúdo aos micro-organismos, sendo assim, a gama de compostos a serem utilizados como substrato é maior (DRAPCHO *et al.*, 2008; CHAIRATTANAMANOKORN, *et al.*, 2009), a Tabela 3 apresenta uma comparação entre diferentes substratos utilizados para a produção de H_2 .

Tabela 3. Comparação do rendimento entre diferentes substratos na produção de H_2

Substrato	Consumo de substrato (%)	Rendimento máximo de H_2 (mol H_2 mol substrato ⁻¹)	Rendimento máximo teórico de H_2 (mol H_2 mol substrato ⁻¹)
Sacarose	96±0,87	4,17±0,49	8
Glicose	95±1,62	2,19±0,55	4
Frutose	87±1,21	2,09±0,19	4
Xilose	93±0,60	1,88±0,23	6
Glicerina	97±0,22	0,80±0,14	3

Fonte: Adaptado de Sá *et al.*, 2013.

A digestão anaeróbia dos resíduos orgânicos é uma das etapas chave na produção de H_2 porque é nesta etapa que os micro-organismos acidogênicos

convertem os carboidratos a H_2 , CO_2 e ácidos graxos voláteis (AGV). Kim e Kim (2012) utilizaram como fonte de carbono a sacarose, xilose, amido, glicose, entre outros, em reator batelada com pH inicial ajustado para 6,8 e obtiveram a partir da análise dos ácidos orgânicos formados, que a fonte de carbono utilizada pode regular a rota metabólica, o que resulta em diferentes rendimentos e diferentes quantidades de ácidos orgânicos produzidos.

A glicose, seguida da sacarose são os substratos mais utilizados por serem facilmente degradados, entretanto vem crescendo o número de pesquisas utilizando substratos mais complexos, como as águas residuárias (Fernandes, *et al.*, 2008), além disso, a glicose é facilmente encontrada nas águas residuárias industriais, principalmente as indústrias alimentícias, de refrigerantes e de biocombustíveis (PEIXOTO, *et al.*, 2011), na Tabela 4 são elencados outros substratos utilizados na produção de H_2 .

Tabela 4. Exemplos de substratos utilizados na fermentação para produção de H_2

Substrato	Rendimento (H_2)	Referência
Vinhaça (mandioca)	65,3 mL H_2 g ⁻¹ SSV	Luo <i>et al.</i> (2010)
Glicerol	5,27 (% mol g glicerol ⁻¹)	Rossi <i>et al.</i> (2011)
Extrato de sorgo doce	10,51 L H_2 kg sorgo doce ⁻¹	Antonopoulou <i>et al.</i> , 2010
Efluente sintético	0,5 mol H_2 mol sacarose ⁻¹	Gomes <i>et al.</i> , 2015
Efluente de amidonaria	1,1, L d ⁻¹ d ⁻¹	Andreani <i>et al.</i> , 2015

Van Ginkel *et al.*, (2005) realizaram análises preliminares para determinar as concentrações de nitrogênio amoniacal (NH_3-N) e fósforo (PO_4^{3-}) em águas residuárias domésticas e de processamento de alimentos, onde os resultados indicaram que esses nutrientes são limitantes na maioria das águas residuárias para a atividade dos micro-organismos.

A importância desses nutrientes não está somente na sua presença/ausência, mas sim na proporção em que são encontrados, Lin e Lay (2004) descreveram que a relação entre carbono e nitrogênio influencia diretamente na composição do biogás e

na velocidade de produção de H₂, entretanto, ainda não existe um consenso a cerca de uma concentração (Wang & Wan, 2009).

3.5. A problemática do efluente de cervejaria e o potencial para a produção de BioH₂

Muitos resíduos orgânicos estão sendo utilizados na produção de H₂, principalmente das indústrias de alimentos, arroz, resíduos de batata doce e amido, entretanto, os efluentes de cervejaria que possuem uma alta carga orgânica ainda são pouco utilizados para essa finalidade (JANHOM *et al.*, 2009).

O setor cervejeiro é um dos setores que se destacam na economicamente na indústria alimentícia, sendo a quinta bebida mais consumida no mundo, o consumo *per capita* médio de cerveja era de 23 L ano⁻¹ (Filladeau *et al.*, 2006). No Brasil a produção de cerveja atingiu a marca dos 12,4 bilhões de litros, o que representou um acréscimo de 19% em relação a 2009, dando ao Brasil a terceira maior produção de cerveja no mundo (REIS, 2009).

A cerveja é resultante do processo de fermentação alcóolica do malte após sofrer as etapas de beneficiamento. Nesta etapa muitos resíduos com alta carga orgânica são gerados e normalmente estes não atendem ao padrão de lançamento, sendo assim, torna-se necessário o tratamento desses resíduos antes do despejo, o que faz com que diversas cervejarias tenham em sua planta o seu sistema de tratamento de águas residuárias (SHAO *et al.*, 2008).

Os efluentes líquidos gerados em grande quantidade geralmente variam em composição, uma vez que a necessidade de limpeza dos equipamentos, pisos e garrafas são frequentes, podendo ser 10 vezes maior que o volume de cerveja produzido (Tabatabaei *et al.*, 2010). Fatores como o tipo de cerveja produzido, o tipo de levedura e de outras matérias-primas utilizadas também contribuem para a variação da composição do efluente (GUERREIRO, 2006).

A composição desse efluente apresenta um alto poder de poluição devido a sua alta carga orgânica, teor de sólidos em suspensão e a presença de fósforo e nitrogênio. De modo geral os resíduos podem ser descritos em quatro etapas:

- Maltaria: restos de grãos, sólidos sedimentáveis, proteínas e açúcares;
- Cozimento do mosto: açúcares, proteínas, taninos e resinas;

- Fermentação: álcool, ácido, aldeídos, cetonas, ésteres e leveduras;
- Maturação: proteínas e produtos de sua degradação

As águas residuárias de cervejaria possuem uma DQO alta por conta dos compostos orgânicos presentes como os açúcares, ácidos graxos voláteis, etanol, etc. Os sólidos suspensos representam a maior parte da carga orgânica presente no efluente, podendo ser facilmente removidos desde que utilizado um sistema de tratamento adequado para essa finalidade (GOLDAMMER, 2008), na Tabela 5 apresentam-se alguns parâmetros que caracterizam o efluente de cervejaria. A variabilidade de volume, pH e a concentração de sólidos é o que caracteriza um dos maiores problemas neste tipo de efluente (HUIGE, 2006)

Tabela 5. Caracterização físico-química de efluente de cervejaria

	Referência		Parâmetros			
	DQO (gL ⁻¹)	DBO (gL ⁻¹)	pH	N (mgL ⁻¹)	PO ₄ ⁻³ (mgL ⁻¹)	SST (gL ⁻¹)
Ahn <i>et al.</i> , (2001)	1,3	0,9	6,7	23,0	(-)	0,2
Alvarado-Lassman <i>et al.</i> , (2008)	2,1	1,4	10,0	13,3	4,8	0,7
Driessen e Vereijken (2003)	2,0-6,0	1,2-3,6	4,5-12,0	25,0-80,0	10,0-50,0	0,2-1,0
Leal <i>et al.</i> , (1998)	2,8	(-)	6,7	20,0	9,0	(-)
Rao <i>et al.</i> , (2007)	2,0-6,0	1,2-3,6	3,0-12,0	(-)	10,0-50,0	2,9-3,0
Yu e Gu (1996)	2,0-2,8	1,1-1,9	(-)	30,0-57,0	8,0-18,0	0,2-,0,6

(-) Dado não disponível

Normalmente apresentam temperatura na faixa dos 25 a 38°C e pH entre 2 e 12, essa variação está associada às características e a quantidade de produtos químicos utilizados nos processos de limpeza e desinfecção dos tanques, filtros e caldeiras (GOLDAMMER, 2008).

Na caracterização de efluente bruto de cervejaria, Tabela 6, realizado por Gonzales *et al.*, (2015) observou-se que os níveis de fosforo total e nitrogênio total estavam muito acima dos valores estipulados pela lei, de acordo com a resolução nº 357/2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA.

Tabela 6. Caracterização inicial do efluente bruto em comparação à legislação

Parâmetro	Unidade	Caracterização	CONAMA	IAP
Turbidez	NTU	228	100	100
DQO	mg L ⁻¹	3635	-	200
Fósforo T	mg L ⁻¹	5.65	0.05	0.05
Nitrogênio T	mg L ⁻¹	21.98	3.07	3.07

Adaptado de: Gonzales *et al.*, 2015.

Embora não exista um valor limite determinado pelo CONAMA para a DQO, a resolução nº 70/2009 do Conselho Estadual do Meio Ambiente – CEMA do Instituto Ambiental do Paraná – IAP, estabelece um limite para esse parâmetro em 200 mg L⁻¹. Devido a necessidade de tratamento desse resíduo antes do seu despejo a maioria das cervejarias apresentam em suas próprias plantas um sistema de tratamento de águas residuárias.

Os sistemas de tratamento mais utilizados nas ETEs de cervejaria são compostos por métodos físicos e posteriormente os biológicos, que geralmente são realizados em reatores anaeróbios. A composição desse efluente faz dele um excelente substrato para a produção de biogás através da fermentação anaeróbia, podendo alcançar o objetivo do tratamento e a produção de energia, que pode ser utilizada para diminuir o uso dos combustíveis não renováveis pela queima do biogás gerado (TABATABAEI *et al.*, 2010).

Embora tenham ocorrido avanços significativos no tratamento do efluente de cervejaria, eles ainda são um problema crítico, do ponto de vista ambiental, pois é de difícil gerenciamento e encarado, com frequência, por muitas dessas indústrias como uma obrigação onerosa (CHAN *et al.*, 2009).

O tratamento anaeróbio aplicado ao efluente de cervejaria já foi utilizado em diversos estudos, normalmente utilizando três tipos de reator, os reatores anaeróbios de fluxo ascendente com manta de lodo (UASB), os reatores anaeróbios em bateladas sequenciais (ASBRs) e os reatores de mistura completa (CSDA). Os reatores do tipo UASB são conhecidos por promover um bom tratamento para o efluente de cervejaria, sendo um dos mais utilizados. Embora a alta carga orgânica e DQO dificultem a utilização do reator UASB para o tratamento de águas residuárias de cervejaria, muitas dessas industrias promovem a retirada dos sólidos antes da fração líquida ser inserida no reator. Cerca de 60% dos tratamentos anaeróbios realizados industrialmente aplicados a diversos tipos de resíduos são desenvolvidos utilizando esse reator (ANGENENT *et al.*, 2004).

Neste sentido, a alta carga orgânica presente no efluente de cervejaria possibilita sua utilização para a produção de metano, sendo assim, a sua utilização para a produção biológica de H₂ a partir da fermentação anaeróbia também se faz possível, conforme Tabela 7, desde que parâmetros como o pH, inóculo, temperatura e configuração do reator sejam ajustados.

Tabela 7. Estudos utilizando efluente de cervejaria como substrato para produção de H₂

Inóculo	Substrato	Produção de Hidrogênio	Referência
Lodo UASB	Efluente de cervejaria	Sim	Shi <i>et al.</i> , 2010
Lodo UASB	Efluente de cervejaria	Sim	Golub <i>et al.</i> , 2014
Lodo ETE	Efluente de cervejaria	Sim	Boboescu <i>et al.</i> , 2014
Líquos UASB	Efluente de cervejaria	Não	Sinboathong <i>et al.</i> , 2015

Nestes trabalhos (Tabela 6) nota-se como pontos comuns: a utilização de inóculo misto, proveniente de reatores metanogênicos ou de ETEs, os quais passaram por inativação de metanogênese por pré tratamentos térmico e químico e a realização dos ensaios em frascos, batelada e pequeno volume (até 1L), sendo que em um deles (Sinbuathong *et al.*, 2015) não foi possível a produção de H₂.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios de Microbiologia e de Catálise e Produção de Biocombustíveis da Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina e foi dividido em duas etapas:

1. Isolamento de microrganismos família *Enterobacteriaceae* e avaliação do potencial de produção de H₂ a partir de diferentes substratos, por meio de ensaios em frascos estáticos e batelada.
2. Seleção de uma cepa para avaliação da produção de H₂ em efluente de cervejaria por meio de ensaios em batelada, em reator com agitação mecânica.

4.1. Materiais e procedimentos referentes à 1ª etapa do trabalho

4.1.1. Isolamento e ativação dos micro-organismos

Os inóculos foram obtidos através do isolamento de micro-organismos coletados com suábies a partir de cama de aviário (UFPR – Setor Palotina) em dezembro de 2015. Os micro-organismos foram cultivados em placa de petri contendo ágar MacConkey, incubados a 35°C ± 1°C por 24h. Após a incubação, foram selecionadas colônias típicas de membros da família *Enterobacteriaceae*, dando preferência aos do grupo *Enterobacter-Klebsiella*. Nesse meio de cultura, estes gêneros bacterianos tendem a formar colônias grandes, brilhosas, com aspecto mucoide (Figura 2). Os isolados foram conservados a -18 °C em caldo nutriente com glicerol (1:1).

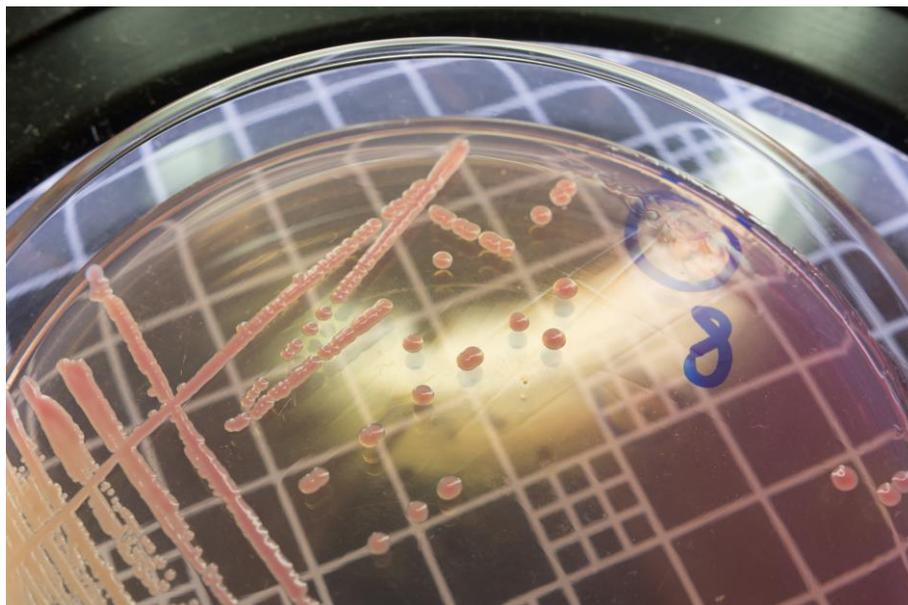


Figura 2. Ágar MacConkey contendo um isolado do grupo *Enterobacter-Klebsiella*

Para ativação dos micro-organismos previamente aos ensaios foram realizados pré-inóculos transferindo-se uma colônia para tubos de ensaio com 15 mL de meio de cultura correspondente ao ensaio que seria realizado (4.1.4), com incubação a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, sem agitação, por 24 horas.

4.1.2. Caracterização bioquímica dos isolados e seleção de cepas para ensaios de produção de H_2

Foram obtidos 11 isolados, cuja caracterização foi realizada empregando sete testes de rotina na triagem de membros da família *Enterobacteriaceae* (Holt, *et al.*, 2000), utilizando SIM Medium (Himedia - India), Caldo MR-VP (Acumedia Manufacturers – EUA, CITRATO SIMMONS AGAR (Himedia – India) e LIA (Himedia – India) para realizar os testes de produção de indol, produção de H_2S , motilidade, vermelho de metila, Voges-Proskauer, utilização de citrato e lisina descarboxilase. Os testes consistiram em inocular uma colônia em cada meio de cultura, incubá-los por 48 h a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e posteriormente fazer a leitura dos resultados, adicionando os reagentes necessários para a revelação.

Após a caracterização bioquímica, foram selecionadas aleatoriamente duas cepas dentre as isoladas para a realização dos experimentos produção de H_2 , buscando avaliar a capacidade destas cepas de consumir diferentes substratos e produzir biogás rico em H_2 .

4.1.3. Determinação da cinética de crescimento da cepa selecionada

Foi determinada a cinética de crescimento da cepa por meio do monitoramento do crescimento celular por plaqueamento e densidade óptica a 600 nm por 24 horas. Para tanto foi preparado um inóculo transferindo-se uma colônia para 15 mL de efluente de cervejaria para posterior incubação $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 30 horas. Nos intervalos de tempo determinados (4h) alíquotas da suspensão foram diluídas em água peptonada 0,1% e plaqueados em meio sólido PCA (*Plate Count Agar*).

4.1.4. Substratos avaliados nos testes iniciais de produção de H_2

As cepas selecionadas para avaliação do potencial de produção de H_2 , cepas 7 e 8 que a partir deste momento serão chamadas de 1 e 2 respectivamente, foram submetidas a ensaios de produção de H_2 com as diferentes fontes de carbono, preparadas a partir de: efluente sintético contendo glicerol como fonte de carbono (composição na Tabela 8), caldo nutriente, preparado conforme instruções do fabricante e efluente de cervejaria, coletado em uma cervejaria artesanal no município de Toledo-PR e caracterizado conforme descrito em 4.2. Este efluente foi diluído 20X com água destilada a fim de obter a concentração de Açúcares Redutores Totais (ART) desejada.

Tabela 8. Composição do efluente sintético contendo glicerol como fonte de carbono

Composto	Concentração (g/L)
Glicerol P.A	1,781
Ureia	0,0115
Fosfato de potássio monobásico	0,005
Fosfato de potássio dibásico	0,005
Fosfato de sódio dibásico 12H ₂ O	0,005
Cloreto de cálcio diidratado	0,001
Cloreto de níquel	0,001
Sulfato ferroso 7.H ₂ O	0,001
Cloreto férrico 6.H ₂ O	0,001
Cloreto de cobalto hexaidratado	0,0001

Fonte: adaptado de Fontes Lima e Zaiat (2012).

As composições utilizadas como substrato foram identificadas com as letras A a D e referem-se ao uso de um único substrato ou à combinação de dois deles, conforme Tabela 9.

Tabela 9. Identificação e composição dos substratos utilizados isoladamente ou em mistura

Identificação do substrato	Composição
A	Efluente Sintético
B	Efluente sintético + caldo nutriente (1:1)
C	Efluente sintético + efluente de cervejaria (1:1)
D	Efluente de cervejaria

O efluente de cervejaria foi coletado em uma cervejaria artesanal no município de Toledo-PR com as seguintes características: coleta apenas do tanque de mosturação, antes da adição de lúpulo, apresentando visualmente baixa presença de sólidos e elevada concentração de açúcares, devido à baixa diluição com água de lavagem. O armazenamento foi em refrigerador por poucos dias e em seguida congelados a -20°C em alíquotas, até o momento do uso. No preparo para os ensaios as alíquotas foram descongeladas e diluídas com água destilada até a concentração ART desejada.

O efluente foi caracterizado quanto ao teor de sólidos totais, totais fixos e totais voláteis (ST, STF e STV) por método gravimétrico, pH por método potenciométrico, DQO e teor de Fósforo inorgânico ($\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$) por espectrofotometria, alcalinidade por método titulométrico/conductimétrico e Nitrogênio Total por método de Kjeldahl, todos de acordo com *Standard Methods of Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2012). A análise do teor de açúcares redutores totais foi realizada por método espectrofotométrico (DNS, baseado em MILLER, 1959). A relação Carbono/Nitrogênio (C/N) foi determinada considerando-se a fração molar de Carbono na glicose, uma vez que na análise de ART os açúcares são hidrolisados a glicose, além da concentração de Nitrogênio no efluente.

4.1.5. Ensaios em frascos estáticos e batelada

Foram utilizados frascos *Schott* de vidro transparente em borossilicato (Duran®) com volume de 250 mL e tampa rosqueável contendo septo de silicone, adaptados

com um dispositivo para purga com gás N₂ e para coleta de amostra gasosa (Figura 3). Os volumes de fase líquida e de *headspace* foram 140 mL e 180 mL, respectivamente. Os substratos utilizados tiveram pH ajustado para 5,5 e foram inoculados utilizando 0,2 mL dos pré inóculos preparados conforme descrito em 4.1.1, em fase exponencial de crescimento (16-18 horas de cultivo). Após inoculados, os reatores foram incubados a 36°C ± 1 por 24 horas, tempo em que foi realizada a coleta de gás em ampolas gasométricas para avaliação da composição por cromatografia gasosa sendo esta a única variável avaliada.

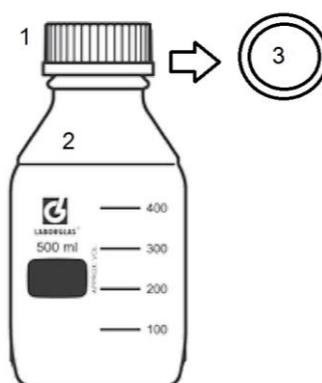


Figura 3. Frasco utilizado nos ensaios preliminares

Legenda: (1) Tampa rosqueável; (2) Frasco “reator”; (3) septo de silicone.

Para tanto, o biogás produzido foi coletado com o auxílio de uma seringa de vidro e transferido para ampolas gasométricas de 35 mL com o auxílio de um kit de transferência, onde permaneceu armazenado até o momento da análise por cromatografia gasosa. A ampola gasométrica é constituída por um recipiente de vidro e um pistão com válvula, o kit de transferência permite que o pistão seja manipulado e as válvulas sejam abertas e fechadas durante a transferência do gás.

A cromatografia gasosa (CG) foi realizada em dois equipamentos: cromatógrafo a gás *Trace Thermo Finnigan* com coluna de aço inox 3 m x 1/8” com Poropak N 80/100 mesh em série com uma peneira molecular 13X, com detector de condutividade térmica e Argônio na fase móvel, ou Micro GC modelo C2V-200, Thermo Scientific, com um nano detector TCD e colunas do tipo Plot - MS5A (Molecular Sieve 5A) e do tipo Bond -U (divinylbenzene type U), com Argônio como gás de arraste.

4.2. Materiais e procedimentos referentes à 2ª etapa do trabalho

Nesta etapa do trabalho foi selecionada apenas uma das cepas avaliadas na 1ª etapa (cepa8) bem como apenas o efluente de cervejaria, para realização de ensaios em maior volume, em reator anaeróbio com agitação mecânica e com monitoramento de diversas variáveis ao longo do tempo. Utilizou-se o mesmo efluente da Etapa 1, cuja coleta, armazenamento e caracterização foram descritos em 4.1.6.

4.2.1. Reator Anaeróbio de mistura mecânica

O reator utilizado foi construído a partir de um jarro de vidro com capacidade total de 5,5 L com tampa de aço inox 316 L adaptada com encaixe para um sistema de agitação mecânica (fixa - 20 rpm) com rotor acoplado a impeditores do tipo pás verticais (6 cm de diâmetro) e três tubos, um para coleta da fase gasosa, um para a fase líquida e outro que permaneceu conectado a um frasco Mariotte com oliva de vidro para monitorar o volume de biogás produzido, conforme a Figura 4.

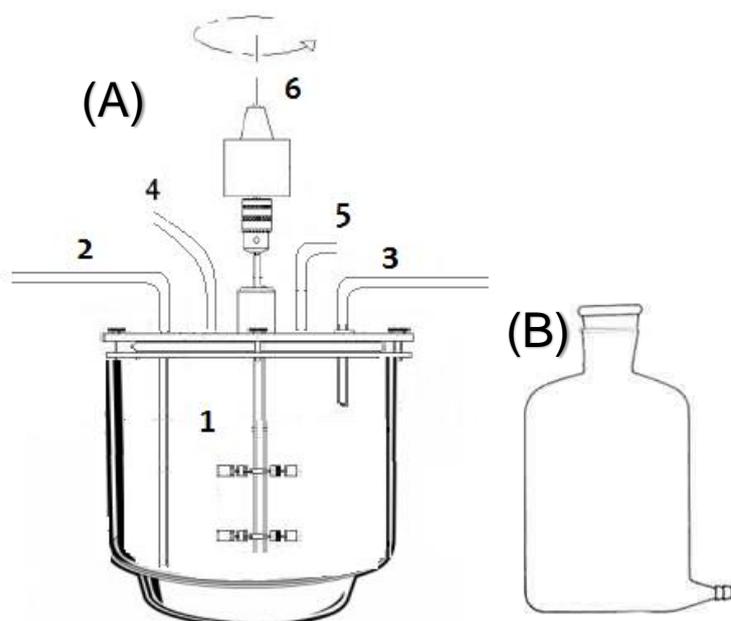


Figura 4. Reator anaeróbio de mistura mecânica e sistema de medição de volume de biogás.

Legenda: (A) Jarro de vidro (1), Ponto para alimentação (2), Ponto para descarga (3), Saída de gás para conexão ao frasco Mariotte (4); Ponto de amostragem de gás (5) Sistema de agitação (6) e (B) Frasco Mariotte.

4.2.2. Ensaio de produção de H₂ em reator

Foram realizados 07 ensaios em reator, dos quais apenas 5 foram utilizados para esse trabalho, seguindo as mesmas condições experimentais, com uma diferença principal entre eles:

- Ensaio 1 a 3 – a liberação do líquido no frasco Mariote, deslocado pela produção de biogás foi intermitente, ou seja, o biogás ficou confinado no reator e foi liberado a cada intervalo de tempo de amostragem;
- Ensaio 4 e 5 - a liberação do biogás e o deslocamento do líquido foi contínua.

As demais condições experimentais foram fixas para todos os ensaios e são descritas a seguir:

Pré-inóculo: A cepa 2 foi inoculada em 15 mL de efluente de cervejaria nas mesmas condições (diluição e pH) que seria utilizada em cada ensaio. Os tubos contendo pré-inóculo foram mantidos *overnight* a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ a fim de estarem em fase exponencial de crescimento no momento da inoculação em reator;

Preparo do efluente de cervejaria: alíquotas do efluente foram descongeladas e diluídas 20X com água destilada para em seguida realizar o ajuste do pH para 5,5.

Inoculação e experimento: os ensaios foram conduzidos em batelada com volume inicial de 3,5 L e volume de *headspace* de 2 L; o pH inicial foi sempre 5,5 e a inoculação de cada batelada foi feita pela transferência de 5 mL de pré inóculo em fase exponencial de crescimento nos experimentos 1 a 3 e de 50 mL nos experimentos 4 e 5. A duração dos experimentos foi de 72 horas, a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, com agitação mecânica de cerca de 20 rpm. A cada intervalo de tempo (entre 4, 6, 12 ou 24h) foram retiradas amostras da fração gasosa (5 mL) e da fração líquida para análises, sendo que o volume total de amostragem foi inferior a 5% do volume de trabalho.

Foram monitorados em intervalos de tempo estabelecidos para amostragem a composição do biogás por Cromatografia gasosa (4.1.5), o pH, a concentração de ART, o teor de sólidos (ST, STV, STF), a DQO, a alcalinidade e o teor de fósforo. Tais análises seguiram a mesma metodologia descrita para o efluente (4.1.6). Além destas análises já descritas, foram inseridas nesta etapa a avaliação dos metabólitos solúveis (ácidos orgânicos) por Cromatografia líquida (CLAE) em cromatógrafo Shimadzu®

equipado com detectores UV–Vis e detector de índice refrativo RID e coluna Aminex HPx - 87H. Para o monitoramento do volume de biogás produzido um frasco Mariote com saída de oliva foi conectado ao reator (Figura 4).

Caracterização microbiológica: um dos ensaios em reator foi selecionado para caracterização da cepa, lâminas de coloração de Gram foram preparadas e o resultado desta análise é apresentado no item 5.1.

A frequência com que as análises foram realizadas é apresentada na Tabela 10:

Tabela 10. Frequência das análises realizadas para os ensaios de produção de H₂

Análise	Frequência
Teor de sólidos (ST,) DQO, Nitrogênio Total, Fosforo Total e Inorgânico e Alcalinidade	Início e fim de cada batelada
ART e pH	Todos os pontos coletados durante a batelada
Ácidos orgânicos	Pontos selecionados de alguns ensaios
Microbiológica	1x ao final de uma batelada

4.2.3. Tratamentos e resultados

Após a realização dos experimentos de produção de bio-H₂ em reator anaeróbio o tratamento dos resultados foi realizado de acordo com as Equações 9-12:

Vazão de biogás (Q_g):

$$Q_g [mL h^{-1}] = \frac{V_g}{t} \quad (9)$$

Em que:

V_g é o volume de biogás medido durante o intervalo de tempo avaliado (t)

Quantidade de matéria de H₂ (n_{H2}):

$$n_{H_2} [mol] = \frac{P V}{R T} \quad (10)$$

Para calcular o volume de H₂ produzido em cada ensaio a vazão de água do frasco Mariotte foi monitorada e posteriormente o volume obtido foi aplicado na fórmula em que: R é a constante universal dos gases, T é a temperatura absoluta (neste trabalho 35°C ou 308 K) e P é a pressão de gás (1 atm).

Vazão molar de H₂ (ν_{H_2}):

$$\nu_{H_2} [mol\ h^{-1}] = \frac{n_{H_2}}{t} \quad (11)$$

Produtividade de H₂ (Y_{H_2}):

$$Y_{H_2} [mol\ H_2\ mol^{-1}\ substrato] = \frac{n_{H_2}}{n_{substrato}} \quad (12)$$

Em que:

$n_{substrato}$ é a quantidade de matéria que foi consumida da fonte de Carbono durante o intervalo de tempo avaliado. Neste trabalho trata-se do consumo de açúcares redutores totais, expressos em termos de glicose.

4.2.4. Modelagem cinética do processo de produção de hidrogênio

A descrição matemática da bioreação de formação do H₂ se baseou no modelos de Monod e Levenspiel (1999). O modelo para a taxa de formação da biomassa, utilizando o modelo de Monod pode ser visualizado a seguir na equação 13:

$$R_B = \frac{(R_{MAX} * C_S)}{(K_S + C_S)} \quad (13)$$

Na qual:

R_B =Taxa de formação de biomassa

R_{max} =Velocidade máxima de crescimento

K_s =Constante de saturação

C_s =Concentração do substrato

Na equação (14), por Levenspiel (1999) tem-se o fator de inibição pelo produto/substrato:

$$R_{obs} = k * \left(1 - \frac{C_R}{C_{R^*}}\right)^n \quad (14)$$

Em que R_{obs} representa o decréscimo observado na taxa de reação quando o composto R (substrato ou produto) está próximo à sua concentração limite de inibição C_{R^*}

Simplificando, na equação (15) tem-se a taxa de produção de biomassa considerando o crescimento celular e a inibição pelo substrato/produto:

$$R_B = k * \left(1 - \frac{C_R}{C_{R^*}}\right)^n * \frac{C_S}{(K_S + C_S)} \quad (15)$$

A equação (16) descreve a taxa de utilização do substrato:

$$-R_S = -R_B * \frac{Y_S}{B} \quad (16)$$

Na equação (17) tem-se a taxa de formação do produto:

$$-R_P = -R_B * \frac{Y_P}{P} \quad (17)$$

As taxas de consumo do substrato ou do produto estão relacionadas com a taxa de crescimento celular. Quanto maior a formação de biomassa (R_b) maior será o consumo de substrato (R_s) e maior a formação do produto (R_p).

Substituindo (13) nas equações (16) e (17):

$$-R_S = -k * \left(1 - \frac{C_R}{C_{R^*}}\right)^n * \frac{C_S}{(K_S + C_S)} * \frac{Y_S}{B} \quad (18)$$

$$-R_P = -k * \left(1 - \frac{C_R}{C_{R^*}}\right)^n * \frac{C_S}{(K_S + C_S)} * \frac{Y_P}{B} \quad (19)$$

As concentrações do produto e substrato podem ser descritas em termo das taxas de proporção, como em:

$$C_P = \frac{Y_P}{B} * C_B \quad (20)$$

$$C_P = \frac{Y_P}{S} * C_S \quad (21)$$

Substituindo (19) e (20) nas equações (14) e (17)

$$R_B = k * \left(1 - \frac{Y_P * C_B}{\bar{C}_P}\right)^n * \frac{C_S}{(K_S + C_S)} \quad (22)$$

$$-R_B = -k * \left(1 - \frac{Y_P * C_S}{\bar{C}_P}\right)^n * \frac{C_S}{(K_S + C_S)} * Y_{\frac{S}{B}} \quad (23)$$

A equação 23 descreve a taxa de morte celular:

$$R_D = K_D * C_x \quad (24)$$

4.2.5. Modelo para o reator batelada

Na equação 25 tem-se a quantidade de biomassa formada com o tempo:

$$\frac{dC_x}{dt} = R_B * C_x - R_D \quad (25)$$

A variação do substrato com o tempo dependerá da taxa de consumo de substrato para o crescimento celular, assim como da taxa de utilização do substrato para a manutenção celular, descrito na equação 27:

$$R_{SM} = M * C_x \quad (26)$$

Na qual:

R_{sm} = Taxa de uso de substrato para a manutenção celular.

M = Massa de substrato consumido para a manutenção/massa de substrato consumido para o crescimento.

Portanto, a quantidade de substrato utilizado com o tempo será conforme a equação 28:

$$\frac{dC_S}{dt} = R_S * C_x - R_{SM} \quad (27)$$

Para o produto, equação 29:

$$\frac{dC_P}{dt} = R_P * C_x \quad (28)$$

Sendo assim, ao substituir as respectivas equações das taxas na equação da biomassa, do substrato e do produto teremos:

$$\frac{dC_x}{dt} = k * \left(1 - \frac{Y_P * C_x}{\bar{C}_P}\right)^n * \frac{C_S}{(K_S + C_S)} * C_x - K_D * C_x \quad (29)$$

$$\frac{dC_S}{dt} = k * \left(1 - \frac{Y_P * C_S}{S * C_P *}\right)^n * \frac{C_S}{(K_S + C_S)} * Y_{S/B} * C_x - M * C_x \quad (30)$$

$$\frac{dC_P}{dt} = k * \left(1 - \frac{C_P}{C_P *}\right)^n * \frac{C_S}{(K_S + C_S)} * Y_P * C_x \quad (31)$$

As equações 21, 22 e 23 representam as equações do modelo cinético para a produção de hidrogênio.

4.2.6. Métodos numéricos

Os parâmetros k , $C_p *$, K_S , n , m e Kd , $Y_{p/b}$, $Y_{s/b}$ foram estimados pelo ajuste de dados experimentais ao modelo por meio da minimização da função objetivo definida como:

$$f = \sum_j^{N_{dad}} \sum_i^{N_c} (X_{ij}^{exp} - X_{ij}^{calc})^2 \quad (32)$$

Em que X_{ij}^{exp} e X_{ij}^{calc} referem se às concentrações experimentais e calculadas respectivamente da biomassa, do substrato e do produto. N_{dad} se refere ao número de dados experimentais utilizados no ajuste dos parâmetros e N_c o número de componentes considerados.

A estimativa dos parâmetros foi feita por meio de um algoritmo desenvolvido no programa MapleSoft Maple 14[®]. O sistema de equações diferenciais ordinárias foi resolvido numericamente pela sub-rotina “*rosenbrock_dae*” e a função objetivo foi minimizada por meio da sub-rotina de otimização “*nonlinearsimplex*”.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Isolamento e caracterização dos micro-organismos

Os ensaios preliminares foram realizados a fim de encontrar um isolado dentre os 11 obtidos que tivesse uma boa produção de H₂ em resíduo de cervejaria.

Os testes bioquímicos realizados (Tabela 11) permitiram a separação dos isolados em três grupos. O primeiro e o segundo grupos, respectivamente formados pelos isolados 1, 3, 5, 6, 7 e 8 e isolados 2 e 4, incluem bactérias do gênero *Klebsiella*. Os micro-organismos destes dois grupos diferiram apenas em relação à utilização do citrato. O terceiro grupo é formado pelos isolados 9, 10 e 11 e apresentou perfil bioquímico característico de *Escherichia coli*. As cepas isoladas pertencem a família *Enterobacteriaceae*, a produção de H₂ a partir desses micro-organismos tem se destacado nos últimos anos e estes têm se mostrado cada vez mais importantes nesse processo. A confirmação da identificação do isolado utilizado até o nível de espécie requer análises complementares como a extração de DNA, PCR e sequenciamento genético.

Para avaliação da cinética de crescimento microbiano dos isolados, algumas cepas tiveram a curva de crescimento determinada por 30 horas. Na Figura 5 é apresentada a densidade de células (expressa em Unidades Formadoras de Colônias, log UFC mL⁻¹) em função do tempo para a cepa utilizada nos ensaios seguintes (Cepa 2).

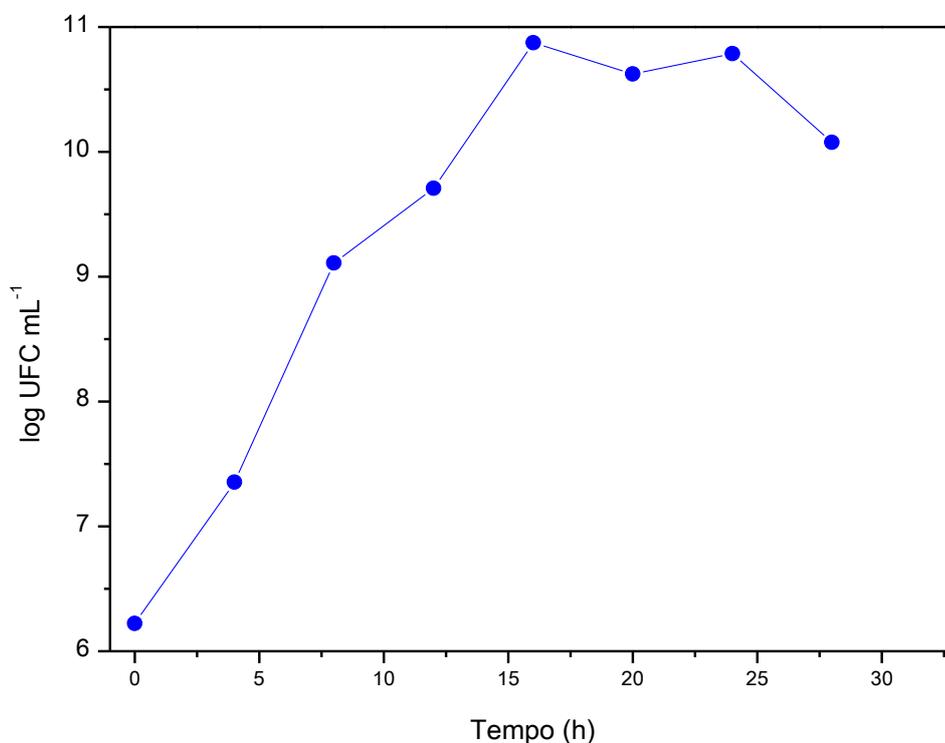


Figura 5. Curva de crescimento referente a cepa 2.

O perfil de crescimento celular mostra que com intervalos de 4 horas não é possível identificar fase lag, pois o comportamento observado é de fase exponencial,

com duração de cerca de 15 horas. Embora ocorra morte celular a partir deste tempo (15h) ainda é notado alta densidade de células até 30 horas, momento em que foi interrompido o monitoramento.

Tabela 11. Caracterização bioquímica para os isolados

Isolado	Origem	A	B	C	D	E	F	G	Identificação preliminar
1	FS	-	-	+	+	-	-	+	<i>Klebsiella</i> sp.
2	FS	-	-	+	-	-	-	+	<i>Klebsiella</i> sp.
3	FS	-	-	+	+	-	-	+	<i>Klebsiella</i> sp.
4	FS	-	-	+	-	-	-	+	<i>Klebsiella</i> sp.
5	FS	-	-	+	+	-	-	+	<i>Klebsiella</i> sp.
6	CA	-	-	+	+	-	-	+	<i>Klebsiella</i> sp.
7	CA	-	-	+	+	-	-	+	<i>Klebsiella</i> sp.
8	CA	-	-	+	+	-	-	+	<i>Klebsiella</i> sp.
9	CA	+	+	-	-	-	+	+	<i>Escherichia coli</i>
10	CA	+	+	-	-	-	+	+	<i>Escherichia coli</i>
11	CA	+	+	-	-	-	+	+	<i>Escherichia coli</i>

Legenda: Fezes de suínos (FS); Cama de aviário (CA)

Produção de Indol (A); Vermelho de metila (B); Voges-Proskauer (C); Citrato (D); Produção de H₂S (E); Motilidade (F); Lisina descarboxilase (G)

A análise de coloração de Gram confirmou os resultados bioquímicos que tendiam para Enterobactérias Gram negativas, na Figura 6 pode-se observar as células com a coloração rósea em forma de bacilos.

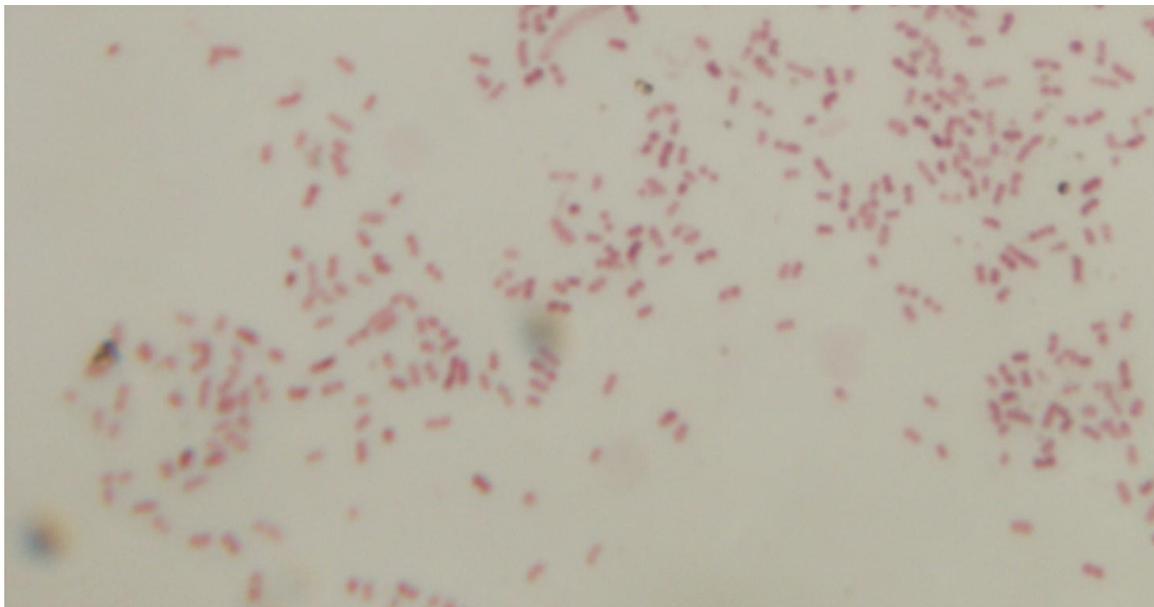


Figura 6. Lâmina de colocação de Gram referente a cepa 2.

5.2. Avaliação das cepas produtoras de H₂ em diferentes substratos

As cepas 1 (isolado 7) e 2 (isolado 8) foram testadas quanto a capacidade de produção de H₂ em substratos diferentes, puros ou combinados (4.1.4): efluente sintético contendo glicerol como fonte de carbono; efluente sintético + caldo nutriente; efluente de cervejaria e efluente de cervejaria + caldo nutriente.

A avaliação do potencial de produção de H₂ foi a composição do biogás, determinada por cromatografia gasosa. Os resultados apresentados na Figura 7, evidenciaram que as cepas testadas são capazes de produzir H₂ e em nenhum dos ensaios realizados houve a produção de metano (CH₄); na maioria dos ensaios a produção de CO₂ foi superior à produção de H₂.

Estudos realizados por Kapdan e Kargi, (2006), mostraram que a família *Enterobacteriaceae* tem como característica e a produção de H₂ associada a produção de CO₂ na fase gasosa, mas tal como observado no presente trabalho a composição percentual apresentou variação.

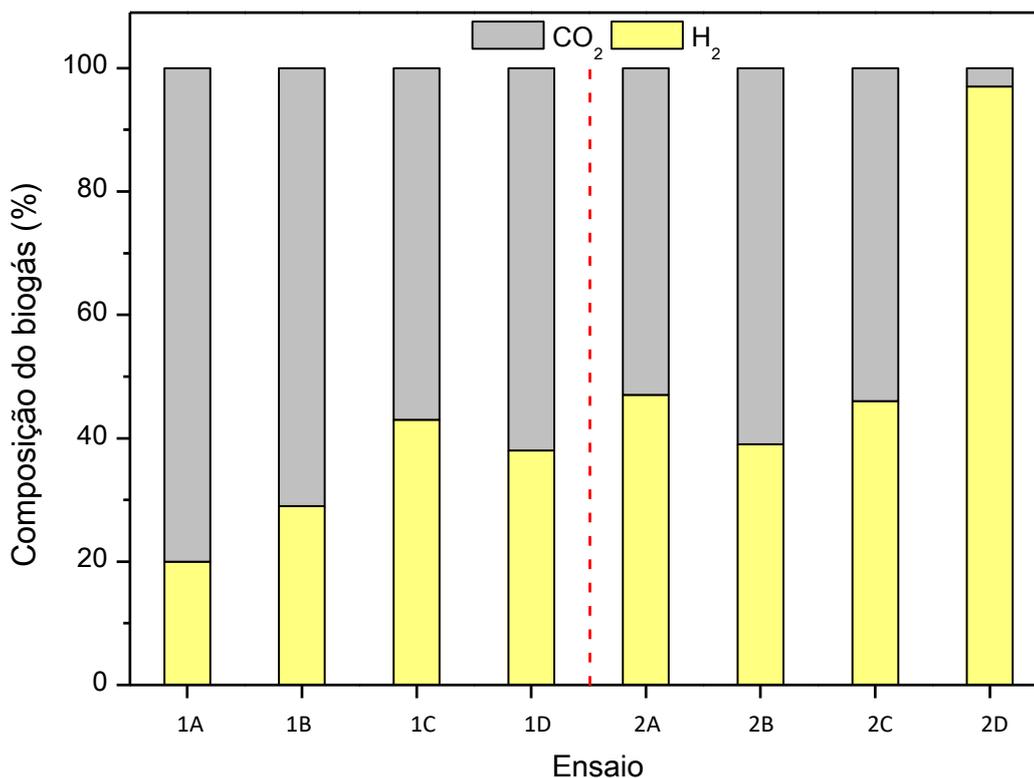


Figura 7. Composição do biogás para duas cepas (1 e 2) e quatro tipos de substrato
Legenda: A) efluente sintético contendo glicerol + caldo nutriente; (B) efluente sintético; (c) efluente de cervejaria + caldo nutriente; (d) efluente de cervejaria.

Na figura 7, observou-se a quantidade de H₂ o produzido pelas cepas em relação aos ensaios realizados. As cepas 1 e 2, quando submetidas aos diferentes substratos responderam de forma diferente, mas em todos os casos houve produção de H₂, com composições que variaram entre 20 e 97% de H₂ e entre 80 a 3% de CO₂. Nota-se que o isolado 2 reagiu melhor a mistura de efluentes, em termos de teor de H₂ no biogás.

O uso de efluente sintético contendo glicerol como fonte de carbono nesta etapa inicial do trabalho teve a finalidade de avaliar mais de uma opção de efluente agroindustrial como substrato, tendo em vista que não se conhecia a habilidade das cepas isoladas em metabolizar diferentes substratos e produzir H₂. Com estes testes foi possível observar que um estudo da aplicação destas cepas neste efluente contendo glicerol poderia ser conduzido; no entanto devido à baixa disponibilidade de estudos com efluente de cervejaria e também ao resultado observado para a cepa 2 neste efluente optou-se por dar continuidade aos trabalhos nesta linha e interromper testes com o glicerol.

Na Tabela 12 são apresentados os resultados da caracterização físico química desse lote do efluente cervejaria, utilizado nos ensaios descritos nesta seção. Nota-se uma alta disponibilidade de açúcares ($12-15 \text{ g L}^{-1}$), que se reflete na elevada DQO; a presença de açúcares neste resíduo propicia a atividade microbiana para produção de H_2 , o que foi notado nos ensaios de produção de H_2 (Figura 7 – ensaios 1D e 2D). A escolha do fator de diluição para este resíduo para uso nas reações de produção de H_2 , que foi de 4x, levou em conta trabalhos com efluente sintético (água residuária contendo sacarose como fonte de carbono) no qual a concentração de sacarose é de cerca de $1,8 \text{ g L}^{-1}$ (Del Nery (1987), utilizando-se diluição de 2,5 – 4 x para o efluente de cervejaria a concentração de açúcares foi padronizada em cerca de 3 - 6 g L^{-1} .

Tabela 12. Caracterização físico química do Lote 1 de efluente de cervejaria

Parâmetro	Valor
pH	4,2
ART (g L^{-1})	12 – 15
DQO ($\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1}$)	9000
ST (mg m L^{-1})	55,7
STF (mg m L^{-1})	3,1
STV (mg m L^{-1})	52,6

Com relação ao desempenho das cepas nas misturas entre efluente de caldo nutriente e considerando-se que além de fonte de Carbono este meio é também fonte de nitrogênio deve-se levar em conta estudos que relatam que a relação carbono/nitrogênio é determinante para a produção de H_2 , baixas ou elevadas concentrações desses nutrientes podem levar a um baixo rendimento e reduzidas velocidades de produção, porque podem atuar como fatores limitantes a rotas metabólicas, reduzir a atividade biológica, entre outros fatores (OZTEKIN *et al.*, 2008). A adição do caldo nutriente no ensaio contribui para modificar a relação C/N mas observando-se os resultados similares para adição ou não de caldo nutriente (exceto para o ensaio 2D) este parâmetro não se mostrou essencial.

O ensaio 2D, utilizando a cepa 2 e efluente de cervejaria puro apresentou maior teor de H₂ no biogás, motivo pelo qual esta cepa foi selecionada para os ensaios posteriores. Uma vez que não foi avaliado o volume de biogás produzido (ou pressão interna no frasco) bem como o consumo de açúcares, não foi possível comparar estes resultados com a literatura em termos de produtividade de H₂ (mol de H₂/mol de substrato). Esta avaliação foi realizada na etapa posterior, para ensaios em reator e com variáveis controladas.

5.3. Ensaio de produção de H₂ em reator anaeróbio

De acordo com os resultados obtidos na etapa inicial do trabalho foram selecionados a cepa 2 e o efluente de cervejaria para avaliação da produção de H₂ em reator anaeróbio com agitação mecânica.

5.3.1. Ensaios com liberação do biogás de forma intermitente

Para esta etapa do trabalho foi realizada uma caracterização completa do efluente de cervejaria, apresentado na Tabela 13. Este lote apresentou maior concentração de açúcares do que o lote 1 uma vez que foi coletado de forma diferente, com menor quantidade de água de lavagem do tanque de mosturação. O menor teor de sólidos é reflexo da coleta antes da adição de lúpulo.

Tabela 13. Caracterização físico química do Lote 2 de efluente de cervejaria

Parâmetro	Valor
pH	5,7
ART (g L ⁻¹)	80
DQO (mg O ₂ L ⁻¹)	80000 - 86000
ST (mg mL ⁻¹)	5,12
STF (mg mL ⁻¹)	0,28
STV (mg mL ⁻¹)	4,8
PO ₄ ³⁻ P (g L ⁻¹)	9,25
Nitrogênio Total (g L ⁻¹)	0,044
Alcalinidade (mg CaCO ₃ L ⁻¹)	131,6

O ensaio 1 foi realizado utilizando o 1º lote de resíduo (Tabela 12), com características diferentes do 2º lote (Tabela 13), que foi utilizado para os ensaios de 2 a 5. No entanto foi adotado o fator de diluição de cada lote de resíduo de modo a

padronizar o teor de ART em cerca de 3 - 6 g L⁻¹, ou seja, diluição de 2,5 - 4x para o lote 1 e de 20x para o lote 2.

Observou-se uma baixa produção volumétrica de H₂ nos ensaios 1, 2 e 3 (Figura 8) que pode estar relacionado ao fato do biogás estar confinado, o que aumentaria a concentração de H₂ presente na fase gasosa. A elevada pressão parcial de H₂ no meio reacional pode levar a ocorrência da solventogênese, fase na qual a formação de ácido láctico e alguns solventes orgânicos como o etanol, butanol e acetona pode ser observada (LEVIN *et al.*, 2004).

Nesses ensaios o frasco Mariotte foi mantido fechado durante todo o período do experimento, sendo liberado apenas nos intervalos de tempo de amostragem para aliviar a pressão interna e medir o volume de biogás gerado entre uma coleta e outra. De modo geral a produção volumétrica se manteve próxima nos ensaios 1 e 2, tendo um volume de 0,179 L e 0,173 L de hidrogênio respectivamente, enquanto no ensaio 3 apenas 0,041 L de hidrogênio foi produzido; estes valores de produção são extremamente baixos para ensaios com duração de 50-70h de duração. Observou-se também que o consumo de açúcar foi baixo no ensaio 1, uma vez que o ensaio iniciou com cerca de 6 g L⁻¹ de ART e terminou com cerca de 5 g L⁻¹, o que pode indicar uma certa ineficiência do processo.

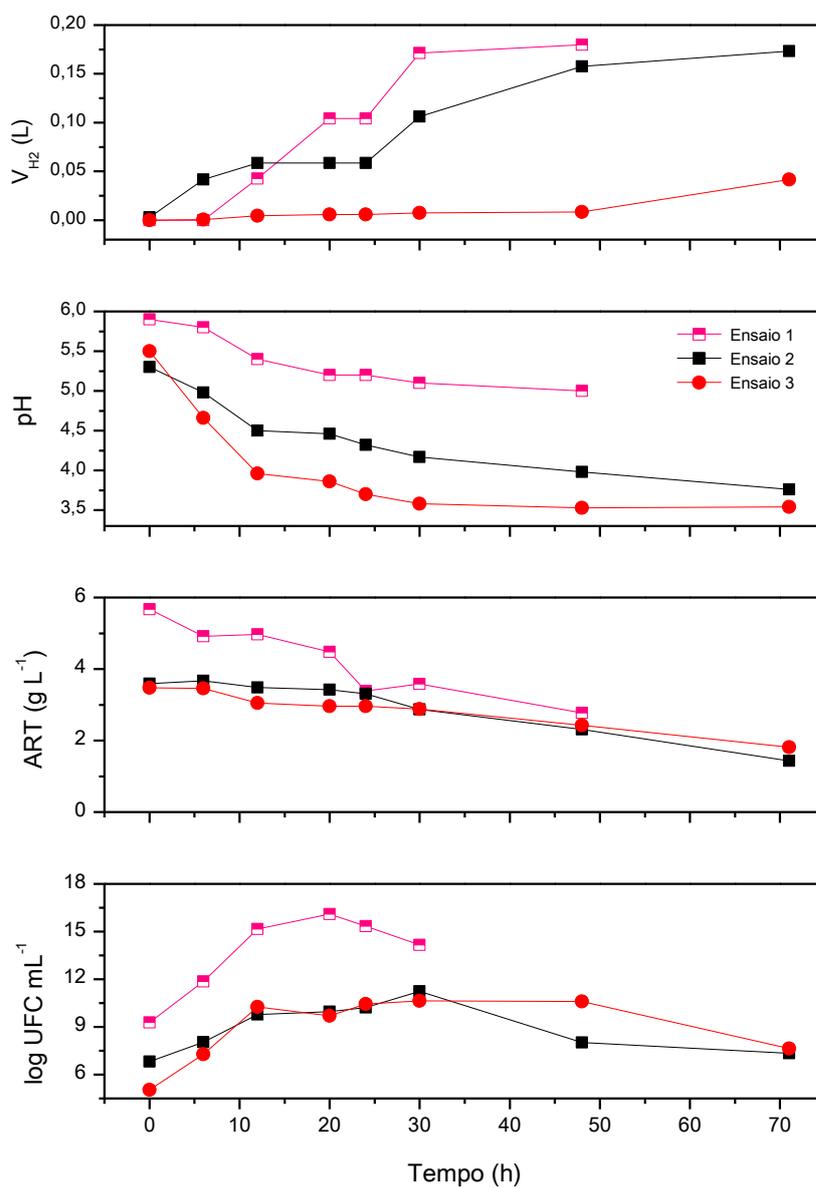


Figura 8. Resultados obtidos para os ensaios 1, 2 e 3 referentes a: Volume de H₂, variação do pH, concentração de açúcares (ART) e concentração celular,

Em contrapartida a composição do biogás nesses ensaios, em termos de quantidade de H₂, não diferiram muito entre si, como pode ser observado na Figura 9.

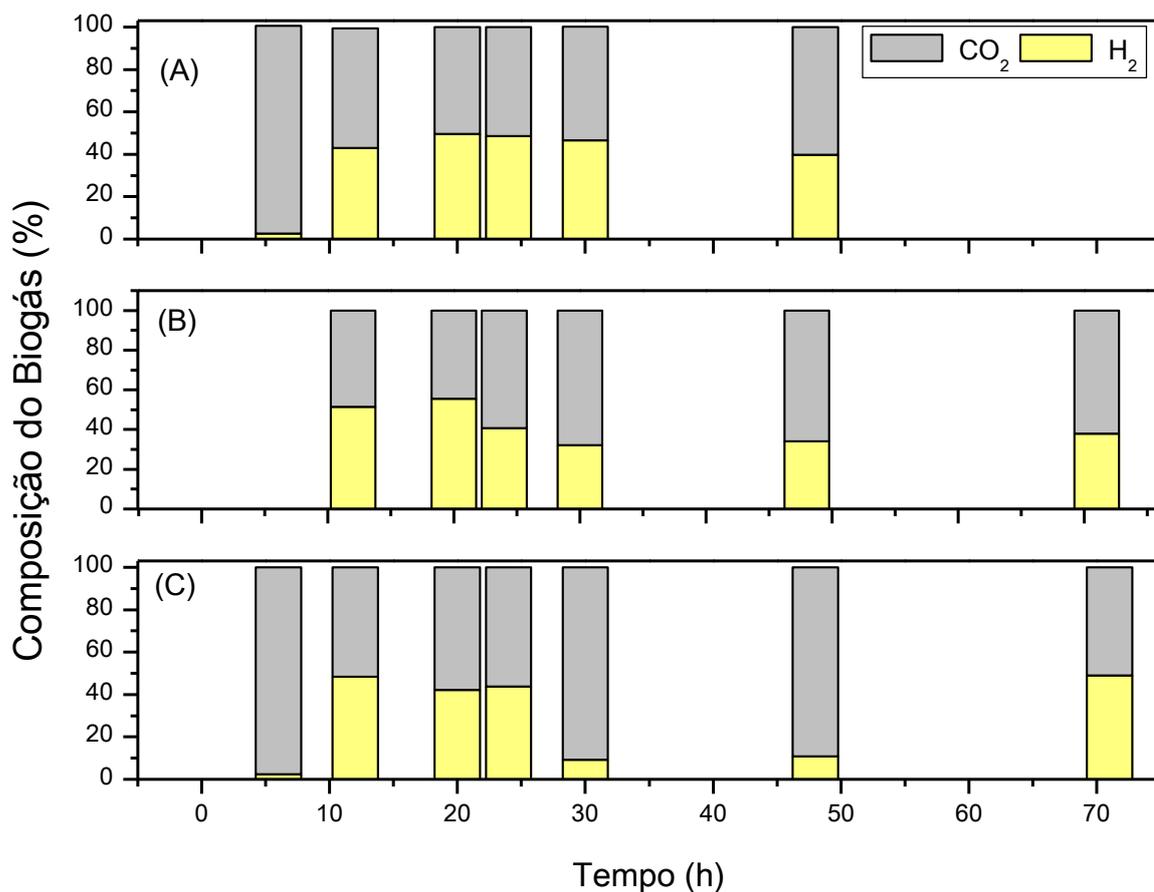


Figura 9. Composição do Biogás para os ensaios 1 (A), 2 (B) e 3 (C).

5.3.2. Ensaios com liberação do biogás de forma contínua

Os ensaios 4 e 5 foram realizados mantendo o frasco Mariotte aberto do início ao fim dos ensaios; a produção volumétrica dos ensaios é apresentada na Figura 10, juntamente com os ensaios 2 e 3 para fins de comparação. A produção volumétrica de biogás desses dois ensaios foi melhor que nos anteriores.

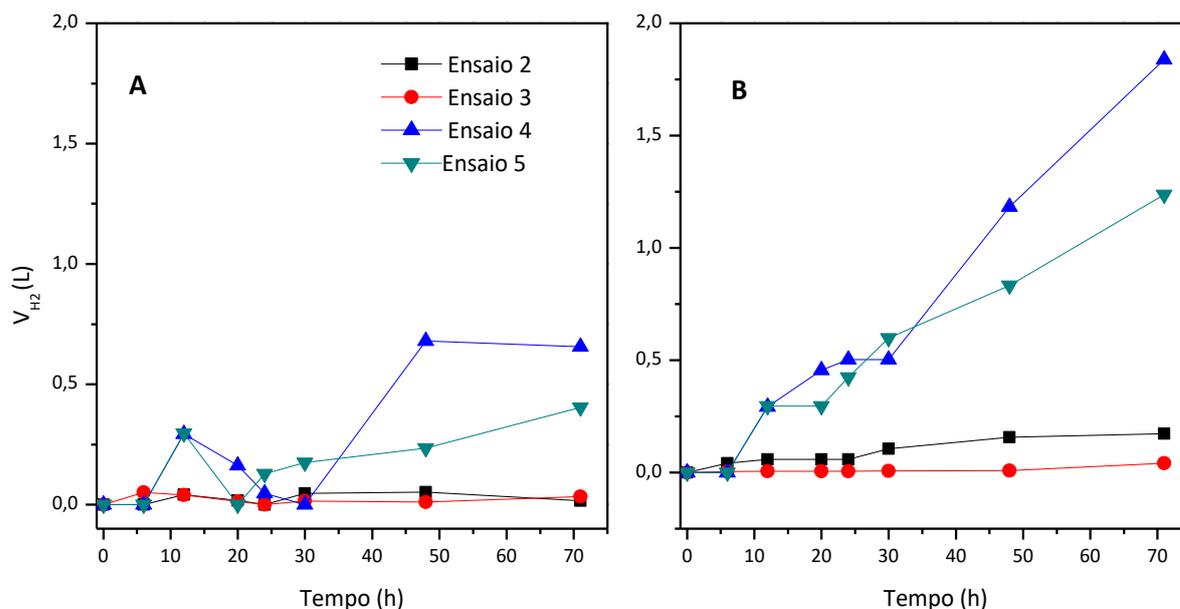


Figura 10. Produção volumétrica de H₂ dos ensaios 2 a 5 em que: (A) produção diária e (B) produção acumulada.

Ao observar a produção diária (Fig. 10 A) notou-se uma instabilidade na produção mesmo para os ensaios cuja liberação do biogás foi contínua. Pode-se destacar que a produção descontínua nas primeiras horas de ensaio pode estar relacionada a adaptação do inóculo no meio, além disso, nas horas iniciais as rotas metabólicas presentes, cuja explanação segue mais adiante, também foram fatores decisivos para aumentar a produção diária/acumulada nas horas finais dos ensaios 4 e 5.

Comparando-se os ensaios 2 e 3, realizados com liberação intermitente do biogás, com os ensaios 4 e 5 cuja liberação foi contínua, nota-se a maior produção volumétrica acumulada de H₂ com um aumento no volume final de cerca de 10 vezes (Fig. 10 B).

Diversos estudos têm focado na diminuição da pressão parcial de H₂ nos reatores para favorecer a síntese de H₂. Nesse sentido se destacam as purgas com gás inerte no sistema ou as coletas periódicas e regulares dos gases (VALDEZ-VAZQUEZ e POGGI-VARALDO, 2009; NGO *et al.*, 2011). Pesquisas apontam que as vias metabólicas para a produção de H₂ são influenciadas por elevadas concentrações de H₂ no meio e ficam susceptíveis à inibição pelo produto, dessa forma, o aumento na pressão parcial de H₂ reduz a sua síntese, direcionando as vias metabólicas para a produção de metabólitos como o ácido lático, etanol, acetona e butanol (LEVIN *et al.*, 2004).

Embora a produção acumulada, apresentada na Figura 10, demonstra não ter ocorrido de forma associada ao crescimento celular na Figura 11 essa associação

Os melhores rendimentos de H_2 foram observados entre a 24^a e a 72^a hora de ensaio, tendo uma relação muito próxima com os pontos onde houve maior consumo de ART e maior concentração celular.

Especialmente, nos ensaios 4 e 5 houve um aumento expressivo na produção de H_2 entre a 30^a e a 72^a hora a concentração celular já estava fora de sua melhor fase e o ART já estava em concentrações muito baixas no meio reacional chegando quase ao consumo total nas últimas horas de ensaio, como pode ser observado na Figura 11.

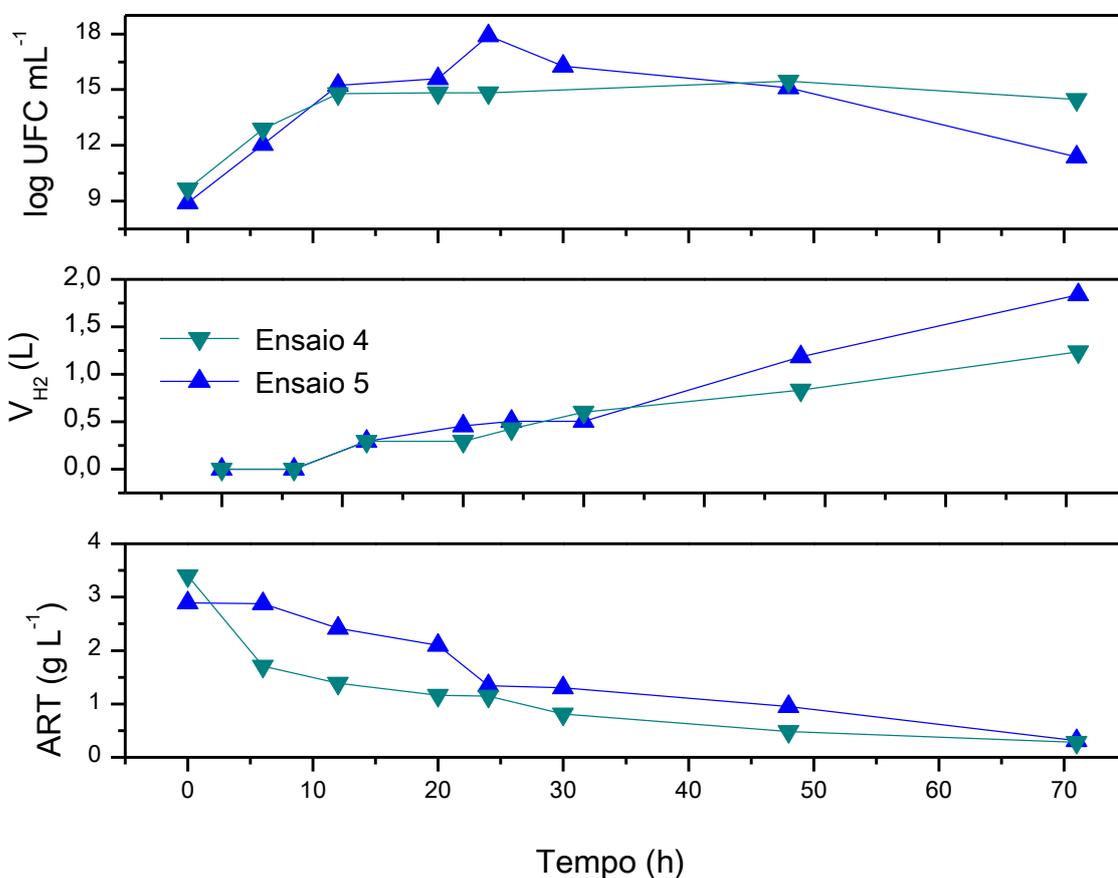


Figura 11. Comparativo entre Produção volumétrica, consumo de ART e concentração celular nos ensaios 4 e 5.

Notou-se que a taxa de consumo de ART pelos micro-organismos se manteve parecida nos ensaios 2, 3 e 5, enquanto no ensaio 4 o consumo aconteceu rapidamente logo nas primeiras horas.

A relação consumo/produção nos ensaios 4 e 5 foram diferentes dos ensaios anteriores por apresentarem uma quantidade maior de biogás, assim como de hidrogênio, além disso o consumo de ART nesses ensaios foi maior que nos ensaios anteriores. É sabido que o efluente de cervejaria possui maltose e maltotriose além de outros açúcares que podem ser usados como aditivos na produção de cerveja (glicose, frutose, sacarose). Os açúcares complexos são hidrolisados a carboidratos mais simples na fermentação para então serem metabolizados pelos micro-organismos.

Esse consumo pode ser relacionado a taxa de crescimento dos micro-organismos presentes no meio, uma vez que o substrato é convertido em produto pela ação dos micro-organismos. Os ensaios de 2 a 5 foram semelhantes entre si, em relação ao crescimento celular. Conforme pôde ser observado na Figura 11 que destaca o consumo de ART e a concentração celular, inicialmente as bactérias utilizaram o açúcar disponível para crescer e manter suas atividades celulares, como uma fase de adaptação ao ambiente e só após a 20^a hora de ensaio é que a produção volumétrica de H₂ foi aumentar expressivamente, assim como a concentração celular no meio.

O pH teve um comportamento muito parecido em todos os ensaios, observou-se que com o passar do tempo e aumento na produção de H₂ o pH teve uma diminuição considerável, variando de 5,5 no início até 3,5 no final de alguns desses ensaios, por exemplo. Essa diminuição se deve principalmente a acidificação do meio pelos ácidos orgânicos produzidos, observando-se que a tendência era a mesma para todos os ensaios: diminuição do pH com o passar das horas, aumento na quantidade de hidrogênio no biogás e aumento na concentração de ácidos orgânicos.

Embora a maioria dos micro-organismos produtores de H₂ tenha uma faixa de pH preferencial, entre 5,0 e 6,5, a Enterobactéria utilizada como inóculo neste trabalho se adaptou e deu continuidade na produção mesmo em uma faixa de pH abaixo do que a observada em outros trabalhos. Perna *et al.*, (2013) identificaram uma *Klebsiella* em seus reatores de produção de H₂ que se adaptou a uma queda no pH logo nos estágios iniciais dos ensaios, que posteriormente produziu 1,1 mol H₂ mol lactose⁻¹.

5.3.3. Identificação das rotas metabólicas seguidas no bioprocesso

A análise da fração líquida dos diferentes ensaios por HPLC permitiu a identificação dos ácidos orgânicos formados durante o bioprocessamento de produção de H₂: foram detectados os ácidos propiônico, láctico, fórmico, acético e butírico em diferentes concentrações.

A observação da proporção entre os ácidos produzidos ao longo do tempo permite visualizar com maior clareza o perfil de composição visando identificar se há uma tendência que se mantém entre os ensaios. Neste sentido a observação da Figura 12 permite notar que o perfil de ácidos orgânicos produzidos muda ao longo do tempo: na avaliação em 12 ou 30 horas, a presença dos ácidos láctico, fórmico ou propiônico predominaram e estes ácidos deram lugar ao acético e butírico justamente quando a produção de H₂ se intensificou (após cerca de 30 - 40 horas) foram detectados os ácidos acético (22 e 31%). Considerando-se as reações de produção de H₂ pela via do butirato e do acetato (Equações 5 – 7 item 3.2), onde, teoricamente, os maiores rendimentos de hidrogênio estão associados ao acetato como produto final da fermentação, a maior concentração de ácido butírico ao mesmo tempo em que a produção de H₂ aumenta é um resultado coerente. Além disso, a presença do butirato é esperada, já que não se consegue uma via metabólica exclusiva e corrobora com a afirmação de que na prática, os maiores rendimentos de hidrogênio estão associados a mistura do acetato e butirato como produtos finais (LEVIN *et al.*, 2004).

Quando se trata de micro-organismos anaeróbios facultativos a fermentação pode assumir duas rotas possíveis; a primeira está relacionada à produção de ácidos orgânicos (acético, láctico, e fórmico) e etanol e a segunda também leva à produção dos ácidos acima citados, porém em menor concentração e o etanol. Sabe-se que a formação desses compostos limita a liberação do H₂ produzido e o rendimento geralmente é inferior a 2 mol H₂ mol glicose⁻¹.

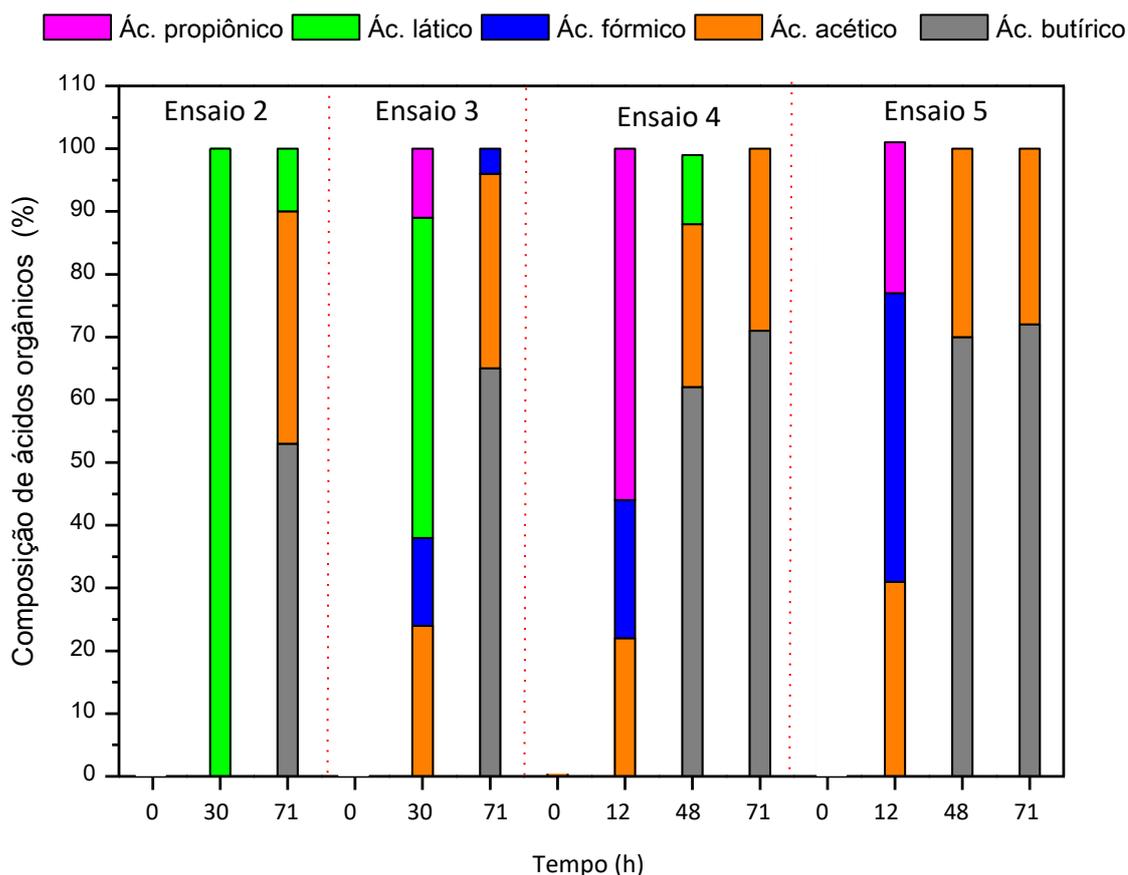
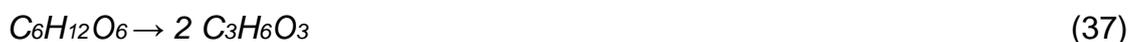
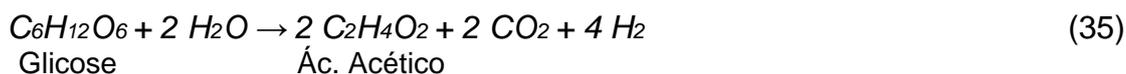
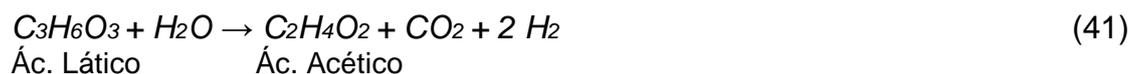
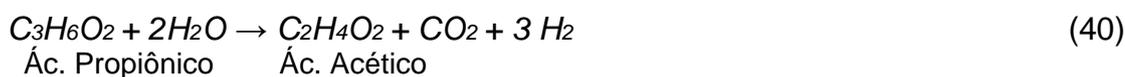


Figura 12. Composição dos ácidos orgânicos para os ensaios 2 a 5 ao longo do tempo.

As rotas metabólicas para a produção de H_2 a partir da glicose, onde é possível observar os pontos onde há consumo do H_2 são descritas nas equações 34 - 41. Nos ensaios analisados a maior concentração de ácido fórmico foi observada no ensaio 5, o que pode explicar o fato desse ensaio ter um rendimento inferior ao ensaio 4, onde também houve produção de ácido fórmico. Como pode ser observado nas equações a seguir, os maiores rendimentos de H_2 estão relacionados às rotas do ácido acético seguido do ácido butírico, o que explica a maior produção de H_2 quando há a maior proporção desses ácidos.



Glicose Ác. Lático



A produção de ácidos orgânicos voláteis também interfere nos resultados obtidos na análise de DQO, uma vez que a presença desses ácidos contribui para que a DQO do meio reacional permaneça próxima ao valor inicial da DQO, mesmo que a matéria orgânica presente no meio reacional tenha sido consumida. A DQO presente inicialmente no meio reacional na forma de matéria orgânica fermentescível é consumida para a geração de H₂ e conseqüentemente de ácidos orgânicos. Deste modo a redução de DQO por fermentação ocorre simultaneamente ao acréscimo de DQO devido aos ácidos gerados e este balanço pode resultar em valores de DQO inicial e final praticamente iguais (Tabela 14).

Tabela 14. Variação de DQO entre os ensaios 2 a 5

Ensaio	DQO Inicial (mg O ₂ L ⁻¹)	DQO Final (mg O ₂ L ⁻¹)
2	4190	4370
3	3115	2906
4	2549	2731
5	3931	3040

A relação consumo de DQO/aumento de DQO no processo acidogênico de formação de H₂ é relatada como um fator negativo quando se pretende neste processo tratar o efluente agroindustrial. Para resolver esta questão em diversos estudos esse processo tem se dividido em dois estágios para produção sequencial de H₂ e CH₄ a fim de melhorar a viabilidade econômica do tratamento de resíduos. Peixoto *et al.*, (2012) fizeram uso do processo combinado e verificaram redução da DQO de alguns efluentes em comparação aos processos individuais.

5.3.4. Avaliação de parâmetros físico químicos

Além dos parâmetros monitorados ao longo do tempo e apresentados nas discussões acima (DQO, ART, pH, ácidos orgânicos) foi realizada a avaliação dos parâmetros alcalinidade, relação C/N, concentração de fósforo inorgânico e de sólidos totais. A Tabela 15 apresenta a variação destes parâmetros no início e fim de cada experimento referentes aos ensaios 2, 3, 4 e 5.

Tabela 15. Variação de alcalinidade, concentração de sólidos totais, fósforo inorgânico e relação C/N para os ensaios 2 a 5.

Ensaio	Alcalinidade (mg CaCO ₃ L ⁻¹)		ST (g L ⁻¹)		Fósforo (PO ₄ ³⁻ -P g L ⁻¹)		C/N (g L ⁻¹)
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial
2	86,1	nd	5,7	3,4	0,43	0,49	32,6
3	90,3	56,4	5,2	3,3	0,39	0,39	31,6
4	85,3	54,8	5,1	1,8	0,411	0,39	25,5
5	47,9	47,9	2,9	0,76	0,17	0,15	30,9

Legenda: (nd) não determinado.

Sabe-se que tanto as baixas quanto as elevadas concentrações de certos nutrientes, como o carbono e o nitrogênio, podem influenciar no rendimento da produção de H₂. Diversas pesquisas foram realizadas a fim de determinar a melhor relação C/N para a produção de H₂: Argun *et al.* (2008) variaram as relações C/N de 20 a 200 e C/P de 50 a 1000 ajustando a concentração de N adicionando ureia ao substrato e a concentração de P adicionando KH₂PO₄ e concluíram que para concentrações de nitrogênio maior que 46 e com o aumento da relação C/P a velocidade específica de formação do H₂ diminuiu devido as limitações causadas pela baixa concentração de fósforo quando o nitrogênio é o nutriente em excesso. Neste mesmo estudo também foi verificado que quando o nitrogênio foi o elemento limitante a velocidade específica de produção de H₂ aumentava conforme a relação C/P aumentava, o que indicou baixo requerimento de fósforo quando a concentração de nitrogênio é baixa. No presente trabalho a relação C/N dos ensaios realizados é baixa

em comparação as relações encontradas em outros estudos, entretanto, este não foi um fator variado no processo de modo que não pode-se afirmar se foi um fator limitante.

A alcalinidade do resíduo no tempo inicial dos ensaios pode ser considerada baixa em relação ao que foi observado em outros trabalhos, por isso a queda rápida de pH durante o processo. A diminuição da alcalinidade do tempo inicial para o tempo final da reação indica a presença de ácidos orgânicos, cujos prótons consomem aníons para tamponamento do pH. Devido à quantidade de anions ser baixa no resíduo o tamponamento foi insuficiente, porém, mesmo em pH abaixo da faixa apresentada como ótima na maioria das pesquisas sobre H_2 , a produção se intensificou mesmo nas últimas horas, onde o pH chegou a valores de até 3,5. Para fins de tamponamento do pH é usual a adição de $NaHCO_3$ ao meio e o monitoramento da alcalinidade em termos de HCO_3^- é utilizado como indicativo de produção de ácidos e conseqüentemente de H_2 . Deste modo, uma vez que se conhece a baixa alcalinidade natural do resíduo, seria importante a realização de ensaios com ajuste deste parâmetro no tempo inicial.

Como pode ser observado na Tabela 15, a alcalinidade dos ensaios 2 e 3 teve um comportamento parecido com o relatado por Amorim (2008), onde o autor afirma que a produção de ácidos orgânicos provoca o consumo da alcalinidade, e o acúmulo desses ácidos no meio contribui para que o pH diminua.

Cabe destacar que o objetivo dessas análises foi caracterizar os ensaios para que, em trabalhos futuros essas condições sejam aprimoradas de modo a atingir o melhor rendimento para a produção de H_2 utilizando condições parecidas com as utilizadas neste trabalho.

5.3.5. Comparação da produção de H_2 entre este trabalho e a literatura

Para fins de comparação entre os resultados de produtividade de H_2 , teor de H_2 no biogás, vazão de biogás e vazão molar de H_2 utilizou-se resultados de trabalhos com inóculos mistos e efluentes diversos, sejam residuais ou sintético que tem boa disponibilidade na literatura. Ocorre que para culturas puras e especificamente efluente de cervejaria a literatura é escassa. Sendo assim, na Tabela 16 podem ser comparados os resultados deste trabalho com trabalhos que utilizaram efluente

sintético (Gomes *et al.*,(2015); Anzola-Rojas *et al.*, (2015)) e soro de queijo (Perna *et al* (2013)).

Tabela 16. Comparação dos resultados obtidos neste trabalho e resultados da literatura para os parâmetros: Produtividade, Vazão de biogás, teor de hidrogênio e vazão molar

Referência	Y_{H_2}	$Q_{\text{biogás}}$ (mL h ⁻¹)	Teor de H ₂ no biogás (%)	U_{H_2} (mmol H ₂ h ⁻¹)
Este trabalho ($T_{\text{batelada}} = 72$ h)	0,80 - 1,67 mol H ₂ mol glicose ⁻¹	19-125 Média 72	30-40	0,2 – 2,2 Média 1,2
Perna <i>et al.</i> (2013)*	0,67 mol H ₂ mol lactose ⁻¹	–	5 – 10	–
Gomes <i>et al.</i> (2015)*	0,60 mol H ₂ mol sacarose ⁻¹	35 – 78	60 – 72	1,87
Anzola-Rojas <i>et al.</i> (2015)*	0,60 mol H ₂ mol sacarose ⁻¹	131 – 423	49 – 61	16,2

* tempos de batelada de poucas horas

Comparando-se os resultados do presente trabalho com os da Tabela 16 pode-se dizer que com os trabalhos abaixo citados, em termos de produtividade, os ensaios realizados não foram satisfatórios, atingindo de 0,80 a 1,67 mol H₂ mol_{glicose}⁻¹, uma vez no presente trabalho o tempo de batelada foi de 72 horas enquanto nos demais os tempos de ciclo foram de algumas horas.

Observa-se uma baixa vazão de biogás, 19-125 mL h⁻¹, em comparação com a vazão relatada por Gomes *et al.*, (2015) e Anzola - Rojas *et al.*, (2015). A vazão (Q) diz respeito ao volume de biogás medido ao longo do tempo de ensaio, que para este trabalho foi de 72 h, enquanto que para os trabalhos acima citados esse intervalo é de poucas horas, indicando que são necessários ajustes de parâmetros de modo a otimizar a vazão.

Em relação ao teor de hidrogênio encontrado no biogás, para este ensaio tendo em vista o que foi determinado nos ensaios comparados este resultado está abaixo do que vem sendo encontrado na literatura, exceto quando comparado com o resultado de Perna *et al.*, (2013) que encontrou um teor de H₂ muito baixo no biogás.

A vazão molar, que relaciona a quantidade de matéria de H₂ com o tempo de ensaio, foi o único parâmetro cujo valor se aproximou dos valores obtidos nos ensaios comparados. Rojas *et al.*, (2015) obteve uma vazão molar superior a encontrada neste trabalho, entretanto, nos ensaios de Gomes *et al.*, (2015) a vazão molar foi próxima a encontrada neste estudo, mesmo sendo um valor inferior ao máximo encontrado.

Além das bateladas serem conduzidas em poucas horas, outra diferença entre os trabalhos comparados e o presente estudo é o tipo de inóculo utilizado. Todos os trabalhos citados na tabela acima utilizaram culturas mistas como inóculo para a produção de H₂, enquanto que neste trabalho a cultura utilizada além de pura, foi isolada do ambiente e submetida a um meio totalmente diferente de seu habitat.

Para culturas puras isoladas para produção de H₂ é possível estabelecer uma comparação com o trabalho de Poletto *et al.* (2016), que isolou Enterobactérias e utilizou em fermentação de meio sintético com glicerol; entretanto o parâmetro adotado por tal estudo é a produção de H₂ em termos de volume reacional (Tabela 17).

Tabela 17. Comparação dos resultados obtidos neste trabalho e resultados da literatura para Produção de H₂ utilizando culturas puras

Referência	Produção de H ₂ (mmol H ₂ L ⁻¹)
Este trabalho (Ensaio 4)	24
Este trabalho (Ensaio 5)	15,78
Poleto <i>et al.</i> , 2016 (<i>E. aerogenes</i>)*	18,56 – 20,49
Poleto <i>et al.</i> , 2016 (<i>E. ludwigii</i>)*	18,62 – 31,66
Poleto <i>et al.</i> , 2016 (<i>B. amyloliquefaciens</i>)*	18,62 – 18,62

* Bateladas de 48 horas.

Os ensaios utilizados na tabela 17 foram conduzidos com tempos de 48 horas para cada batelada, se assemelhando mais com os ensaios 4 e 5, realizados neste trabalho. Poleto *et al.*, (2016) obtiveram uma faixa de produção que variou de 18,56 – 31,66 mmol H₂ L⁻¹ de meio reacional. Comparando esses ensaios com os ensaios 4 e 5 observa-se uma tendência positiva em relação ao micro-organismo isolado neste trabalho. Ainda assim, os resultados obtidos nos ensaios de Poleto *et al.*, (2016) são comparativamente melhores pois foram realizados em menos tempo (48h), porém os presentes ensaios já demonstram que a utilização de culturas puras a longo prazo pode ser vantajosa, já que são mais resistentes a mudanças nas condições operacionais, em relação às culturas mistas já relatadas.

A comparação entre trabalhos que produziram H₂ e este trabalho se torna complexa devido as diferenças entre os substratos e os micro-organismos são utilizados, e esses fatores interferem diretamente nas rotas metabólicas e, conseqüentemente, na quantidade de H₂ que é produzido em cada ensaio. Um exemplo são os resultados demonstrados na tabela 17 para os ensaios de Poleto *et al.*, (2016) cujo principal fonte de carbono foi o glicerol PA e o glicerol residual, enquanto que a fonte de carbono do presente trabalho foi a glicose.

O isolamento e utilização de uma nova cultura contribui para novas perspectivas em relação aos trabalhos envolvendo a produção de Bio-H₂, entretanto, ainda são necessárias investigações mais detalhadas acerca do rendimento da produção envolvendo os diferentes processos de fermentação.

5.3.6. Modelagem cinética da biorreação

Como os dados experimentais são de ordem de grandeza muito diferentes, eles foram normalizados em relação ao maior valor de cada variável, para garantir que todos os valores estivessem na faixa entre zero e um.

Na tabela 17, são apresentados os valores dos parâmetros cinéticos estimados obtidos com a modelagem dos dados experimentais.

Tabela 18. Parâmetros cinéticos relacionados à modelagem cinética realizada

Constante	Valor estimado
K	15738,64
C_p *	1,56402
K_s	13340,11
N	0,59823
M	0,231531
K_d	0,141354
$Y_{s/b}$	0,119189
$Y_{p/b}$	0,063392

Os ensaios cinéticos realizados, bem como os ajustes matemáticos são apresentados nas figuras 13 e 14, onde podem ser observados os valores obtidos experimentalmente (marcadores) e os valores obtidos pelo modelo cinético ajustado (linhas), ambos em função do tempo. Na figura 13 estão normalizados a concentração de açúcares (ART) e a produção volumétrica de H_2 (VH_2).

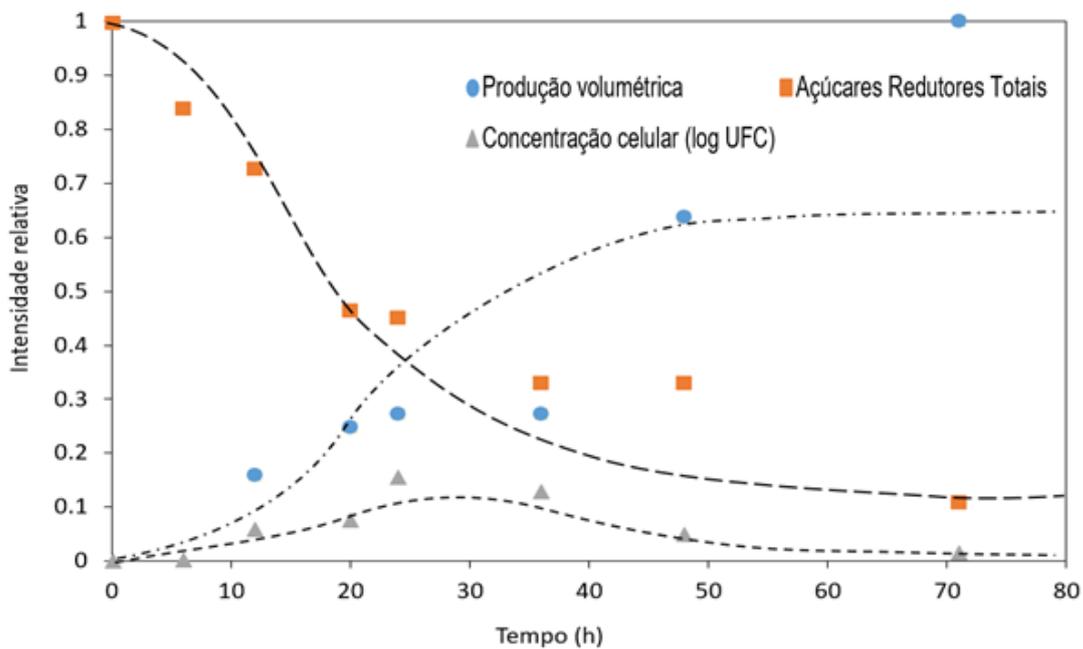


Figura 13. Modelagem cinética normalizada para o ensaio 4.

Enquanto na Figura 14 estão normalizados ART e concentração de células (log UFC mL⁻¹).

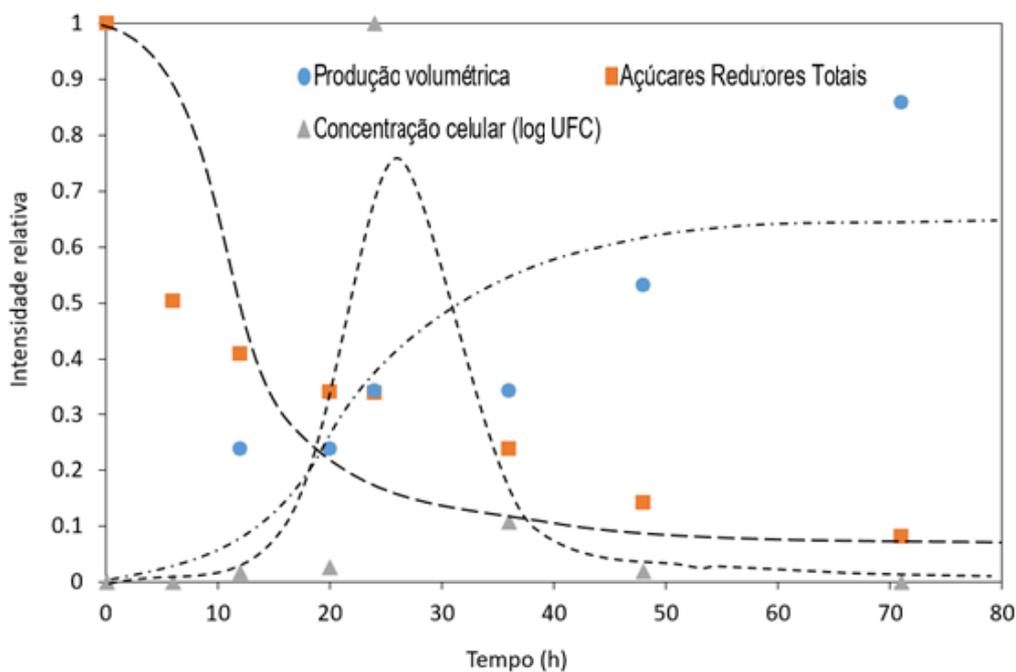


Figura 14. Modelagem cinética normalizada para o ensaio 5.

O ajuste dos modelos aos dados experimentais foi feito por meio da análise do coeficiente de correlação entre os dados experimentais e os dados estimados sendo $R^2=0,8723$, que sugere um bom ajuste frente a complexidade do sistema estudado e a relativa simplicidade do modelo matemático.

O modelo adotado levou a um bom ajuste para o consumo de substrato e a produção de biomassa no Ensaio 4 (Figura 13); a maior falta de ajuste se deu para os dados de produção volumétrica de H_2 em tempos superiores a 40h, quando a morte celular supera o crescimento dos micro-organismos, mantendo a concentração de micro-organismos menor que os valores máximos observados. Nesse período, ainda há um elevado consumo de substrato, bem como geração de produto, o que diverge da hipótese inicial, de que o consumo do substrato e a geração de produto estão associadas com o crescimento celular, implicando em falta de ajuste. Além disso é possível que a geração do produto possa existir por outras rotas que não sejam associadas ao crescimento celular.

Uma possibilidade de explicação para a falta de ajuste da produção volumétrica de H_2 neste modelo é o fato de não terem sido consideradas as rotas metabólicas seguidas, que podem variar ao longo do tempo, o que de fato foi notado na avaliação de ácidos orgânicos ao longo dos ensaios; observando-se a Figura 25 nota-se que o perfil de ácidos orgânicos produzidos muda ao longo do tempo: na avaliação de $t= 12$ horas foram detectados os ácidos acético (22 e 31%), fórmico (22 e 46%) e propiônico (56 e 23%) para os ensaios 4 e 5, respectivamente; já na avaliação de $t = 48$ horas e $t = 72$ horas, tempo que coincide com o a maior produção de H_2 , o perfil de ácidos resume-se a 60-72% de ácido acético e 28-40% de ácido butírico.

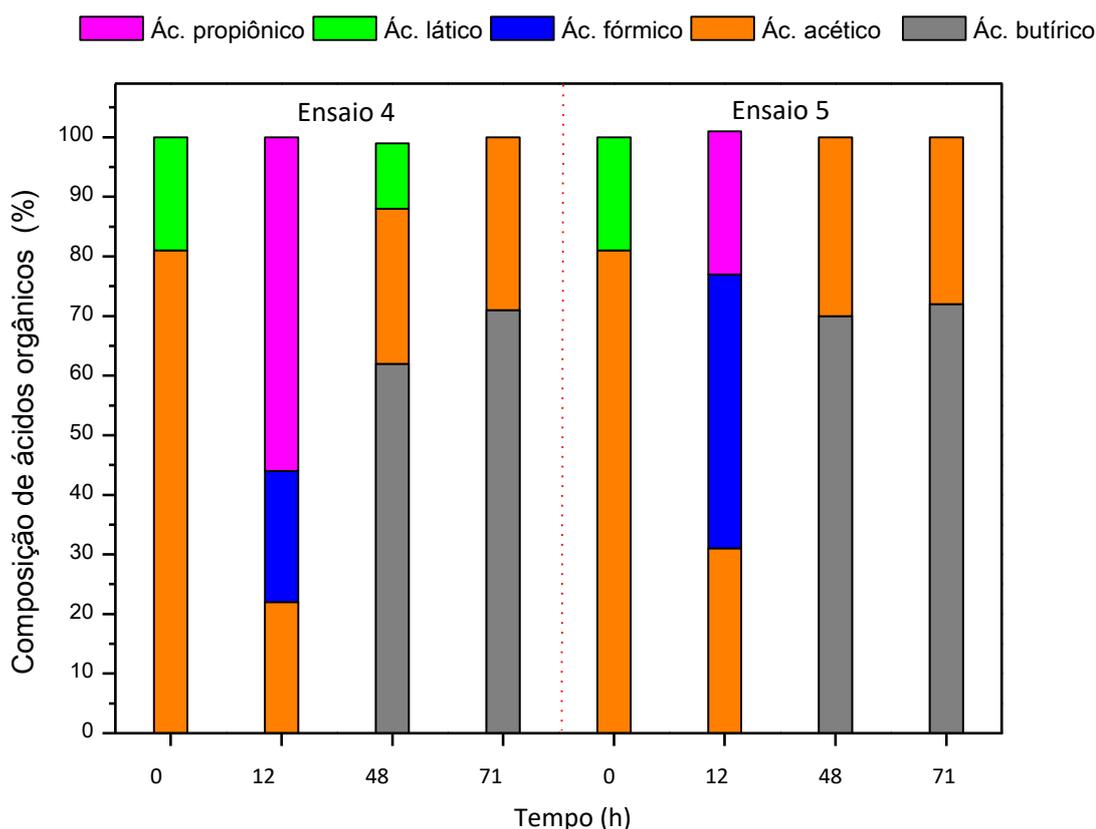


Figura 15. Composição % dos para os ácidos orgânicos produzidos nos ensaios 4 e 5.

Considerando-se que as diferentes rotas metabólicas podem levar a diferentes rendimentos de H_2 , fica notório a importância de se desenvolver um modelo cinético que considere estas variáveis. Neste sentido, em trabalho de modelagem matemática da produção de H_2 por degradação de glicose, Tavares (2008) modelou a produção de H_2 ao longo de um reator tubular vertical (fluxo ascendente) em função do perfil de ácidos orgânicos nos sete pontos de amostragem do reator, distantes da base em 3,5 a 65,5 cm. Adotou-se concentração de células constante ($C_x = C_{x_{inicial}}$) e tendo como variáveis a concentração de ácidos e como resposta a produção de H_2 foi possível identificar por meio do modelo quais as rotas favoráveis para a produção de H_2 neste tipo de reator biológico.

Na literatura são encontrados também trabalhos de modelagem cinética da produção de Bio- H_2 para experimentos utilizando inóculos mistos e tendo como ponto comum a não utilização da hipótese de produção de H_2 associada ao crescimento celular, provavelmente devido à dificuldade de monitoramento da concentração celular para inóculos mistos: Fernandes *et al.*, (2010) utilizando inóculo de fermentação natural de efluente sintético (sacarose) modelaram a cinética da produção de H_2 em

função do substrato (sacarose ou águas residuárias de vinhaça, esgoto doméstico e glicerina) e do tempo; Lucas *et al.*, (2015) utilizando inóculo de reator metanogênico UASB pré tratado, apresentaram a modelagem da produção de H₂ em função do substrato (sacarose ou águas residuárias de fecularia, indústria cítrica e laticínios) e do tempo.

Pode-se dizer que a modelagem cinética foi eficiente para descrever o consumo de açúcares e a cinética de crescimento celular mas é necessário inserir as rotas metabólicas, expressas pelos ácidos orgânicos produzidos a fim de obter ajuste entre o modelo e os dados experimentais para a produção e H₂ após 30 – 40 horas de reação.

6. CONCLUSÕES

Foi possível o isolamento de uma Enterobactéria produtora de H₂ a partir de cama de aviário, e esta foi capaz de utilizar como substrato os açúcares presentes no efluente de cervejaria de forma eficiente para se multiplicar e gerar produto.

O efluente de cervejaria se mostrou um substrato com bastante potencial para ser utilizado na produção de H₂ e o inóculo utilizado apresentou uma boa adaptação ao efluente, mantendo-se viável até as 72 horas de avaliação empregadas nos ensaios, além disso, a bactéria também apresentou adaptação aos baixos valores de pH e C/N ao longo dos ensaios. Os baixos rendimentos observados, em relação aos rendimentos relatados na literatura, se devem principalmente as diferenças nas condições operacionais entre os ensaios realizados neste trabalho e os ensaios da literatura.

A melhor produção de H₂ ocorreu após cerca de 30 horas, coincidindo com a formação dos ácidos butírico e acético, cujas rotas metabólicas levam a produção de H₂, enquanto os menores rendimentos coincidem com a formação dos ácidos láctico e propiônico, cujas rotas estão relacionadas ao consumo de H₂.

A pressão parcial de H₂ no reator anaeróbio mostrou-se prejudicial para a produção e os melhores resultados foram obtidos quando a liberação do biogás ocorreu de forma contínua.

A redução de matéria orgânica no efluente não ocorreu em termos de redução de DQO, a única remoção de matéria orgânica foi observada em relação aos açúcares que foram consumidos durante os ensaios.

Para a obtenção de um modelo cinético que descreva eficientemente a produção de H₂ será necessária a introdução da dependência das rotas metabólicas seguidas.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Otimizar a produção biológica de hidrogênio através da fermentação anaeróbia de resíduos agroindustriais inoculados com uma cultura pura de bactérias, assim como isolar e testar novas bactérias;
- Utilizar técnicas de biologia molecular para otimizar o processo produtivo;
- Avaliar a utilização da biomassa suportada no processo produtivo;
- Utilizar diferentes efluentes agroindustriais como fonte de substrato para a produção de hidrogênio;
- Determinar as melhores condições operacionais para a produção biológica de hidrogênio.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBANEZ, R. **Codigestão de vinhaça e melão em biorreator anaeróbio operado em bateladas sequenciais com biomassa imobilizada visando a produção de hidrogênio**. Tese de Doutorado. EECS – USP, Brasil. (2015).

ALVES, M. M.; ABREU, A. A. Produção de Hidrogênio a partir de resíduos. **Valorização de resíduos**. v. 10. p. 16-17, 2006.

ANDREANI, C. L.; TORRES, D. G. B.; SCHULTZ, L.; CARVALHO, K. P. de.; GOMES, S. D. Produção de hidrogênio a partir de efluentes de processamento de mandioca em um reator de leito fixo anaeróbio com bambu como material de suporte. **Engenharia Agrícola**, 35 (3), 578-587, 2015.

ANTONOPOULOU, G.; GAVALA, H. N.; SKIADAS, I. V.; LYBERATOS, G. Effect of substrate concentration on fermentative hydrogen production from sweet sorghum extract. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, n. 8, p. 4843-4851, 2011.

ANGENENT, L.T.; SUNG, S.; RASKIN, L. Methanogenic population dynamics during startup of a full-scale anaerobic sequencing batch reactor treating swine waste. **Water Research**, v. 36, n. 18, p. 4648-4654, 2002.

AMORIM, E. L. C.; BARROS, A. R.; DAMIANOVIC, M. H. R. Z.; SILVA, E. L. Anaerobic fluidized bed reactor bed with expanded clay as support for hydrogen production through dark fermentation of glucose. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, n. 9, p. 783-790, 2008.

ANTONOPOULOU, G.; STAMATELATOU, K.; VENETSANEAS, N.; KORNAROS, M.; LYBERATOS, G. Biohydrogen and methane production from cheese whey in a two-stage anaerobic process. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 47, n. 15, p. 5227-5233, 2008.

AROOJ, M. F.; HAN, S. K.; KIM, S. H.; KIM, D. H.; SHIN, H. S. Effect of HRT on ASBR converting starch into biological hydrogen. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, n. 22, p. 6509-6514, 2008.

BADIEI, M., JAHIM, J. M., ANUAR, N., ABDULLAH, S. R. S., SU, L. S., & KAMARUZZAMAN, M. A. Microbial community analysis of mixed anaerobic microflora in suspended sludge of ASBR producing hydrogen from palm oil mill effluent. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 4, p. 3169-3176, 2012.

BAI-GANG, S.; HUA-YU, T.; FU-SHUI, L. The distinctive characteristics of combustion duration in hydrogen internal combustion engine. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, p. 14472-14472, 2014.

BARROS, A. R.; ADORNO, M. A. T.; SAKAMOTO, I. K.; MAINTINGUER, S. I.; VARESCHE, M. B. A.; SILVA, E. L. Performance evaluation and phylogenetic characterization of anaerobic fluidized bed reactors using ground tire and pet as support materials for biohydrogen production. **Bioresource technology**, v. 102, n. 4, p. 3840-3847, 2011.

BOBOESCU, I.Z.; ILIE, M.; GHERMAN, V. D.; MIREL, I. PAP, B.; NEGREA, A. KONDOROSI, E.; BÍRÓ, T.; MARÓTI, G. Revealing the factors influencing a fermentative biohydrogen production process using industrial wastewater as fermentation substrate. **Biotechnol. Biofuels**, V. 7, 139, p. 1-15, 2014.

BORMAN, E. K.; STUART, C. A.; WHEELER, K. M. Taxonomy of the family *Enterobacteriaceae*. **Journal of bacteriology**, v. 48, n. 3, p. 351, 1944.

BUNDHOO, M. Z.; MOHEE, R. Inhibition of dark fermentative bio-hydrogen production: A review. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, n. 16, p. 6713-6733, 2016.

CAI, M.; LIU, J.; WEI, Y. Enhanced biohydrogen production from sewage sludge with alkaline pretreatment. **Environmental Science & Technology**, v. 38, n. 11, p. 3195-3202, 2004.

CAMPOS, J. R.; Tratamento de esgotos sanitários por processo anaeróbico e disposição controlada no solo. In: **Tratamento de esgotos sanitários por processo anaeróbico e disposição controlada no solo**. ABES, 1999.

CEMA – Conselho Estadual do Meio Ambiente. Resolução n.º 070 de 11 agosto de 2009. Disponível em: http://www.iap.pr.gov.br/arquivos/File/Legislacao_ambiental/Legislacao_estadual/RESOLUCOES/resolucao_cema_70_2009.pdf. Acesso em: 13/06/16.

CHAN, Y.J.; CHONG, M.F.; LAW, C.L.; HASSELL, D.G. A review on anaerobic–aerobic treatment of industrial and municipal wastewater. **Chemical Engineering Journal**, v. 155, n. 1, p. 1-18, 2009.

CHANG, S.; LI, J. Z.; LIU, F. Evaluation of different pretreatment methods for preparing hydrogen-producing seed inocula from waste activated sludge. **Renewable Energy**, v. 36, n. 5, p. 1517-1522, 2011.

CHAIRATTANAMANOKORN, P.; PENTHAMKEERATI, P.; REUNGSANG, A.; LO, Y. C.; LU, W. B.; CHANG, J. S. Production of biohydrogen from hydrolyzed bagasse with thermally preheated sludge. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, n. 18, p. 7612-7617, 2009.

CHIN, H. L., CHEN, Z. S., CHOU, C. P. Fedbatch operation using *Clostridium acetobutylicum* suspension culture as biocatalyst for enhancing hydrogen production. **Biotechnology progress**, v. 19, n. 2, p. 383-388, 2003.

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução n.º 357, de 17 de março de 2005. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>. Acesso em: 13/06/2016.

CORTEZ, L.; MAGALHÃES, P.; HAPPI, J. Principais subprodutos da agroindústria canvieira e sua valorização. **Revista Brasileira de Energia**, v. 2, p. 111-146, 1992.

DAS, D.; VEZIROGLU, T. N. Advances in biological hydrogen production processes. **International Journal of Hydrogen Energy**, p. 6046-6057, 2008.

DE GIOANNIS, G., MUNTONI, A., POLETTINI, A., & POMI, R. A review of dark fermentative hydrogen production from biodegradable municipal waste fractions. **Waste management**, v. 33, n. 6, p. 1345-1361, 2013.

DE SÁ, V.; CAMAROTAN, M. C.; FERREIRA-LEITÃO, V. S. Produção de hidrogênio via fermentação anaeróbia–aspectos gerais e possibilidade de utilização de resíduos agroindustriais brasileiros. **Química Nova**, v. 37, n. 5, p. 857-867, 2014.

DEMIRBAS, A. Green energy and technology. **Biohydrogen. For Future Engine Fuel Demands. Turkey**, 2009.

EDWARDS, P. P.; KUZNETSOV, V. L.; DAVID, W. I.; BRANDON, N. P. Hydrogen and fuel cells: towards a sustainable energy future. **Energy Policy**, v. 36, n. 12, p. 4356-4362, 2008.

ELSHARNOUBY, O., HAFEZ, H., NAKHLA, G., & EL NAGGAR, M. H. A critical literature review on biohydrogen production by pure cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 12, p. 4945-4966, 2013.

FANG, H. H. Environmental Anaerobic Technology: applications and new developments. **World Scientific**, 2010.

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.

FANGKUM A, REUNGSANG A. Biohydrogen production from sugarcane bagasse hydrolysate by elephant dung: effects of initial pH and substrate concentration. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, n. 14, p. 8687-8696, 2011.

FERCHICHI, M.; CRABBE, E.; GIL, G. H.; HINTZ, W.; ALMADIDY, A. Influence of initial pH on hydrogen production from cheese whey. **Journal of Biotechnology**, v. 120, p. 402-409, 2005.

FERNANDES, B. S.; PEIXOTO, G.; ALBRECHT, F. R.; DEL AGUILA, N. K. S.; ZAIAT, M. Potential to produce biohydrogen from various wastewaters. **Energy for Sustainable Development**, v. 14, n. 2, p. 143-148, 2010.

FILLAUDEAU, L.; BLANPAIN-AVET, P.; DAUFIN, G. Water, wastewater and waste management in brewing industries. **Journal of Cleaner Production**, v. 14, n. 5, p. 463-471, 2006.

FUESS, L.T.; KIYUNA, L.S.M.; GARCIA, M.L.; ZAIAT, M. (2014) Avaliação da produção de H₂ em reator de Leito Fixo empacotado sob condições termofílicas. **Anais do IV Seminário de Projeto Temático [on- line]**. Escola de Engenharia de São Carlos – USP. São Carlos/SP.

GUERREIRO. L. **Efluente em cervejaria**. Resposta técnica. Rede de Tecnologia do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro. 2006.

GOLDAMMER, T. The Brewer's Handbook, 2nd edition. Apex Publishers, Clifton, 2008.

GOLUB, N. B.; SHCHURSKAYA, E. A.; TROTSSENKO, M. V. **Anaerobic Treatment of Brewery Wastewater with Simultaneous Hydrogen Production**. J. Water Chem. Technol. v. 36, 2, p. 90–96, 2014.

GOMES, S. D.; FUESS, L. T.; PENTEADO, E. D.; LUCAS, S. D.; GOTARDO, J. T.; ZAIAT, M. The application of an innovative continuous multiple tube reactor as a strategy to control the specific organic loading rate for biohydrogen production by dark fermentation. **Bioresource technology**, v. 197, p. 201-207, 2015.

GONZALEZ, A. C.; SEBASTIEN, N. Y.; MANGOLIN, L. P.; DA COSTA, D. R. D. F. UTILIZAÇÃO DE MACRÓFITAS AQUÁTICAS NA PURIFICAÇÃO DE EFLUENTE INDUSTRIAL. In: XII Congresso Nacional do Meio ambiente de Poços de Caldas. Poços de Caldas, 2015.

HAN, S.; SHIN, H. S. Biohydrogen production by anaerobic fermentation of food waste. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 29, n. 6, p. 569-577, 2004.

HERNÁNDEZ, M. A.; RODRÍGUEZ SUSANA, M.; ANDRES, Y. Use of coffee mucilage as a new substrate for hydrogen production in anaerobic co-digestion with swine manure. **Bioresource technology**, v. 168, p. 112-118, 2014.

HOLT, J.G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**, 9thed., p. 203-222, 2000.

HUNG, C. H.; CHENG, C. H.; GUAN, D. W.; WANG, S. T.; HSU, S. C.; LIANG, C. M.; LIN, C. Y Interactions between *Clostridium* sp. and other facultative anaerobes in a self-formed granular sludge hydrogen-producing bioreactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, n. 14, p. 8704-8711, 2011.

INTANOO, P., SUTTIKUL, T., LEETHOCHAWALIT, M., GULARI, E., &CHAVADEJ, S. Hydrogen production from alcohol wastewater with added fermentation residue by an anaerobic sequencing batch reactor (ASBR) under thermophilic operation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 18, p. 9611-9620, 2014.

JAIN, I.P. Hydrogen the fuel for 21st century. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.34, p.7368-7378, 2009.

JANHOM, T., WATTANACHIRA, S., PAVASANT, P. Characterization of brewery wastewater with spectrofluorometry analysis. **Journal of Environmental Management**, v. 90, n. 2, p. 1184-1190, 2009.

JI, C.; LIU, X.; WANG, S.; GAO, B.; YANG, J. A laminar burning velocity correlation for combustion simulation of hydrogen-enriched ethanol engines. **Fuel**, v. 133, p. 139-142, 2014.

JITRWUNG, R.; VERRETT, J.; YARGEAU, V. Optimization of selected salts concentration for improved biohydrogen production from biodiesel-based glycerol using *Enterobacter aerogenes*. **Renewable Energy**, v. 50, p. 222-226, 2013.

JITRWUNG, R.; YARGEAU, V. Optimization of media composition for the production of biohydrogen from waste glycerol. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, n. 16, p. 9602-9611, 2011.

KAPDAN, I. K.; KARGI, F. Bio-hydrogen production from waste materials. **Enzyme and microbial technology**, v. 38, n. 5, p. 569-582, 2006.

KARADAG, D.; PUHAKKA, J. A. Effect of changing temperature on anaerobic hydrogen production and microbial community composition in an open-mixed culture bioreactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, n. 20, p. 10954-10959, 2010.

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, n. 2, p. 2021-2027, 2012.

KIM, D. H.; KIM, S. H.; KIM, K. Y.; SHIN, H. S. Experience of a pilot-scale hydrogen-producing anaerobic sequencing batch reactor (ASBR) treating food waste. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, n. 4, p. 1590-1594, 2010.

KIVISTÖ, A.; SANTALA, V.; KARP, M. Non-sterile process for biohydrogen and 1, 3-propanediol production from raw glycerol. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 27, p. 11749-11755, 2013.

KAWAGOSHI, Y.; HINO, N.; FUJIMOTO, A.; NAKAO, M.; FUJITA, Y.; SUGIMURA, S.; FURUKAWA, K. Effect of inoculum conditioning on hydrogen fermentation and pH effect on bacterial community relevant to hydrogen production. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 100, p. 524-530, 2005.

LAMAISON, F.C. (2009) Aplicação da água residuária do processamento da mandioca como substrato para a produção de hidrogênio por processo fermentativo. **Dissertação do curso de pós-graduação (Mestrado em Engenharia de Alimentos)**. Departamento de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis – SC, Brasil.

LAY, J.; YOUNG, J. L.; TATSUYA, N. Feasibility of biological hydrogen production from organic fraction of municipal solid waste. **Water Research**, v. 33, p. 2579-2586, 1999.

LEE, D. J.; SHOW, K. Y.; SU, A. Dark fermentation on biohydrogen production: pure culture. **Bioresource technology**, v. 102, n. 18, p. 8393-8402, 2011.

LEE, K. S.; LIN, P. J.; CHANG, J. S. Temperature effects on biohydrogen production in a granular sludge bed induced by activated carbon carriers. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 31, n. 4, p. 465-472, 2006.

LEVIN, D. B.; PITT, L.; LOVE, M. Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. **International journal of hydrogen energy**, v. 29, n. 2, p. 173-185, 2004.

LI, C.; FANG, H. HP. Fermentative hydrogen production from wastewater and solid wastes by mixed cultures. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 37, n. 1, p. 1-39, 2007.

LIMA, D. M. F.; ZAIAT, M. The influence of the degree of back-mixing on hydrogen production in an anaerobic fixed-bed reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 12, p. 9630-9635, 2012.

LIN, C. Y.; WU, C. C.; HUNG, C. H. Temperature effects on fermentative hydrogen production from xylose using mixed anaerobic cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, n. 1, p. 43-50, 2008.

LIN, C. Y.; C. H. LAY. Carbon/nitrogen-ratio effect on fermentative hydrogen production by mixed microflora. **International Journal of Hydrogen Energy**, 29, 41-45, 2004.

LIU, F.; FANG, B. Optimization of bio-hydrogen production from biodiesel wastes by *Klebsiella pneumoniae*. **Biotechnology journal**, v. 2, n. 3, p. 374-380, 2007.

LO, Y. C.; CHEN, X. J.; HUANG, C. Y.; YUAN, Y. J.; CHANG, J. S. Dark fermentative hydrogen production with crude glycerol from biodiesel industry using indigenous hydrogen-producing bacteria. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 35, p. 15815-15822, 2013.

LO, Y. C., CHEN, X. J., HUANG, C. Y., YUAN, Y. J., CHANG, J. S. Dark fermentative hydrogen production with crude glycerol from biodiesel industry using indigenous hydrogen-producing bacteria. **International Journal of hydrogen energy**, v. 38, n. 35, p. 15815-15822, 2013.

LONG, H., LI, X., WANG, H., & JIA, J. Biomass resources and their bioenergy potential estimation: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 26, p. 344-352, 2013.

LOVATO, G. (2014) Produção de Biohidrogênio em AnSBBR Tratando Efluente do Processo de Produção de Biodiesel – Efeito da Carga Orgânica e do Tempo de Enchimento. **Dissertação do curso de Pós-Graduação (Mestrado em Ciências: Engenharia Hidráulica e Saneamento)**. Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo. São Carlos – SP, Brasil.

LUCAS, S. D. M.; PEIXOTO, G.; MOCKAITIS, G.; ZAIAT, M.; GOMES, S. D. Energy recovery from agro-industrial wastewaters through biohydrogen production: Kinetic evaluation and technological feasibility. **Renewable Energy**, v. 75, p. 496-504, 2015.

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

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

MAO, S. S.; SHEN, S.; GUO, I. Nanomaterials for renewable hydrogen production, storage and utilization. **Progress in Natural Sciences: Materials International**, v. 22, p. 522-534, 2012.

MARKOV, S. A.; AVERITT, J.; WALDRON, B. Bioreactor for glycerol conversion into H₂ by bacterium *Enterobacter aerogenes*. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, n. 1, p. 262-266, 2011.

MARQUES, P. A.; BARTOLOMEU, M. L.; TOMÉ, M. M.; NEVES, L. M. Bio-hydrogen production from glycerol by a strain of *Enterobacter aerogenes*. **HYPOTHESIS VIII**, 2009, April 1-3; Lisbon, Portugal.

MATHEWS, J.; WANG, G. Metabolic pathway engineering for enhanced biohydrogen production. **International journal of hydrogen energy**, v. 34, n. 17, p. 7404-7416, 2009.

MISHRA, P.; DAS, D. Biohydrogen production from *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08 using distillery effluent. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 14, p. 7496-7507, 2014.

MOHAN, S. V.; BABU, V. L.; SARMA, P. N. Anaerobic biohydrogen production from dairy wastewater treatment in sequencing batch reactor (AnSBR): Effect of organic loading rate. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 41, n. 4, p. 506-515, 2007.

MONLAU, F.; BARAKAT, A.; TRABLY, E.; DUMAS, C.; STEYER, J. P.; CARRÈRE, H. Lignocellulosic materials into biohydrogen and biomethane: impact of structural features and pretreatment. **Critical reviews in environmental science and technology**, v. 43, n. 3, p. 260-322, 2013.

MU, Y.; ZHENG, X. J.; YU, H. Q.; ZHU, R. F. Biological hydrogen production by anaerobic sludge at various temperatures. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 31, n. 6, p. 780-785, 2006.

NGO, T. A.; SIM, S. J. Dark fermentation of hydrogen from waste glycerol using hyperthermophilic *eubacterium Thermotoga neapolitana*. **Environmental Progress & Sustainable Energy**, v. 31, n. 3, p. 466-473, 2012.

NGO, T. A.; KIM, M. S.; SIM, S. J. High-yield biohydrogen production from biodiesel manufacturing waste by *Thermotoga neapolitana*. **International journal of hydrogen energy**, v. 36, n. 10, p. 5836-5842, 2011.

NAKASHIMADA, Y.; RACHMAN, M. A.; KAKIZONO, T.; NISHIO, N. Hydrogen production of *Enterobacter aerogenes* altered by extracellular and intracellular redox states. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 27, n. 11, p. 1399-1405, 2002.

NTAIKOU, I.; ANTONOPOULOU, G.; LYBERATOS, G. Biohydrogen production from biomass and wastes via dark fermentation: a review. **Waste and Biomass Valorization**, v. 1, n. 1, p. 21-39, 2010.

OLALEYE, A. K., ADEDAYO, K. J., WU, C., NAHIL, M. A., WANG, M., WILLIAMS, P. T. Experimental study, dynamic modelling, validation and analysis of hydrogen production from biomass pyrolysis/gasification of biomass in a two-stage fixed bed reaction system. **Fuel**, v. 137, p. 364-367, 2014.

OZMIHCI, S.; KARGI, F.; CAKIR, A. Thermophilic dark fermentation of acid hydrolyzed waste ground wheat for hydrogen gas production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, p. 2111-2117, 2011.

PARK, S.; KIM, U.; LEE, M.; KIM, S.; CHA, D. The effects and characteristics of hydrogen in SNG on gas turbine combustion using a diffusion type combustor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, p. 12847-12855, 2013.

PEIXOTO, G.; SAAVEDRA, N.K.; VARESCHE, M.B.A.; ZAIAT, M. Hydrogen production from soft-drink wastewater in an upflow anaerobic packed-bed reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, n. 15, p. 8953-8966, 2011.

PENTEADO, E. D. **Influência da origem e do pré-tratamento do inóculo na produção de hidrogênio a partir de águas residuárias em biorreatores anaeróbios**. 2012. Dissertação (Engenharia hidráulica e Saneamento), UFSCar, Universidade de São Paulo, 2012.

PERNA, V.; CASTELLÓ, E.; WENZEL, J.; ZAMPOL, C.; LIMA, D. F.; BORZACCONI, L.; AMP; ETCHEBEHERE, C. Hydrogen production in an upflow anaerobic packed bed reactor used to treat cheese whey. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 1, p. 54-62, 2013.

POLETO, L. **Isolamento e identificação de microrganismos produtores de hidrogênio a partir do glicerol residual**. 2015. Tese de Doutorado.

POLETO, L.; SOUZA, P.; MAGRINI, F. E.; BEAL, L. L.; TORRES, A. P. R.; DE SOUSA, M. P.; PAESI, S. Selection and identification of microorganisms present in the treatment of wastewater and activated sludge to produce biohydrogen from glycerol. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, n. 7, p. 4374-4381, 2016.

REN, N. Q.; GUO, W. Q.; WANG, X. J.; XIANG, W. S.; LIU, B. F.; WANG, X. Z.; DING, J.; CHEN, Z. B. Effects of different pretreatment methods on fermentation types and dominant bacteria for hydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, p. 4318-4324, 2008.

SHAH, A. T., FAVARO, L., ALIBARDI, L., CAGNIN, L., SANDON, A., COSSU, R., BASAGLIA, M. Bacillus sp. strains to produce bio-hydrogen from the organic fraction of municipal solid waste. **Applied Energy**, v. 176, p. 116-124, 2016.

SEIFERT, K.; WALIGORSKA, M.; WOJITOWSKI, M.; LANIECKI, M. Hydrogen generation from glycerol in batch fermentation process. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, p. 3671-3678, 2009.

SHAH, A. T., FAVARO, L., ALIBARDI, L., CAGNIN, L., SANDON, A., COSSU, R., BASAGLIA, M. Bacillus sp. strains to produce bio-hydrogen from the organic fraction of municipal solid waste. **Applied Energy**, v. 176, p. 116-124, 2016.

SHAO, X.; PENG, D.; TENG, Z.; JU, X. Treatment of brewery wastewater using anaerobic sequencing batch reactor (ASBR). **Bioresource Technology**, v. 99, n. 8, p. 3182-3186, 2008.

SHIDA, G. M. **Produção de hidrogênio e ácidos orgânicos por fermentação acidogênica em reator anaeróbico de leito fluidificado**. 2008. Dissertação (Mestrado em Engenharia Hidráulica e Saneamento), UFSCar, São Carlos, 2008.

SHI, X. Y.; JIN, D.; SUN, Q.; LI, W. **Optimization of conditions for hydrogen production from brewery wastewater by anaerobic sludge using desirability function approach**. *Renew. Energy*, 35, p. 1493–1498, 2010.

SINBUATHONG, N.; SOMJIT, C.; LEUNGPRASERT, S. Feasibility study for biohydrogen production from raw brewery wastewater. **International Journal of Energy Research**, 39, p. 1769–1777, 2015.

SINGH, R. Fermentative Biohydrogen Production Using Microbial Consortia. In: **Biofuel Technologies**. Springer Berlin Heidelberg. p. 273-299, 2013.

SOARES, A. B.; SILVA, P. R. N da; STUMBO, A. L.; FREITAS, J. C. C. Emprego de catalisadores heterogêneos de CaO e SnO₂ suportados em cinza de casca de arroz na obtenção de biodiesel. **Química Nova**, v. 35, p. 268-273, 2012.

STERLING, M. C.; LACEY, R. E.; ENGLER, C. R.; RICKE, S. C. Effects of ammonia nitrogen on H₂ and CH₄ production during anaerobic digestion of dairy cattle manure. **Bioresource technology**, v. 77, n. 1, p. 9-18, 2001.

SU, H.; CHENG, J.; ZHOU, J.; SONG, W.; CEN, K. Hydrogen production from water hyacinth through dark-and photo-fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, p. 8929-8937, 2010.

SUN, L., HUANG, A., GU, W., MA, Y., ZHU, D., & WANG, G. Hydrogen production by *Enterobacter cloacae* isolated from sugar refinery sludge. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 40, n. 3, p. 1402-1407, 2015.

TABATABAEI, M.; RAHIM, R.A.; ABDULLAH, N.; WRIGHT, A.D.G., SHIRAI, Y.; SAKAI, K.; SULAIMAN, A.; HASSAN, M.A. Importance of the methanogenic archaea populations in anaerobic wastewater treatments. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 8, p. 1214-1225, 2010.

TAVARES, A. C. **Modelagem matemática da degradação da glicose, com produção de hidrogênio, em um reator anaeróbio de leito fixo**. 2008. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

VALDEZ-VAZQUEZ, I.; POGGI-VARALDO, H. M. Hydrogen production by fermentative consortia. **Renewable and sustainable energy reviews**, v. 13, n. 5, p. 1000-1013, 2009.

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.

VARDAR-SCHARA, G.; MAEDA T.; WOOD, T. K. Metabolically engineered bacteria for producing hydrogen via fermentation. **Microbial Biotechnology**, v.1, p. 107-125, 2008.

WANG, J.; WANG, W. Effect of temperature on fermentative hydrogen production by mixed cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**, v 33, n 6, p 5392-5397, 2008.

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

WANG, G.; MU, Y.; YU, H. Q. Response surface analysis to evaluate the influence of pH, temperature and substrate concentration on the acidogenesis of sucrose-rich wastewater. **Biochemical Engineering Journal**, v. 23, n. 2, p. 175-184, 2005.

WARWEL, S.; BRÜSE, F.; DEMES, C.; KUNZ, M.; KLASS, M.R.G. Polymers and surfactants on the basis of renewable resources. **Chemosphere**. v. 43, p.39-48, 2001.

WICHER, E.; SEIFERT, K.; ZAGRODNIK, R.; PIETRZYK, B.; LANIECKI, M. Hydrogen gas production from distillery wastewater by dark fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, p. 7767-7773, 2013.

WONG, Y. M.; WU, T. Y.; JUAN, J. C. A review of sustainable hydrogen production using seed sludge via dark fermentation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 34, p. 471-482, 2014.

WU, K. J.; LIN, Y. H.; LO, Y. C.; CHEN, C. Y.; CHEN, W. M.; CHANG, J. S. Converting glycerol into hydrogen, ethanol, and diols with a *Klebsiella* sp. HE1 strain via anaerobic fermentation. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 42, n. 1, p. 20-25, 2011.

XIAO, B., HAN, Y., LIU, J. Evaluation of biohydrogen production from glucose and protein at neutral initial pH. **International Journal of Hydrogen Energy**, 35: 6152-6160, 2010.

XING, D., REN, N.; WANG, A.; LI, Q.; FENG, Y.; MA, F. Continuous hydrogen production of auto-aggregative *Ethanoligenens harbinense* YUAN-3 under non-sterile condition. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, n. 5, p. 1489-1495, 2008.

ZHANG, C.; LV, F. X.; XING, X. H. Bioengineering of the *Enterobacter aerogenes* strain for biohydrogen production. **Bioresource technology**, v. 102, n. 18, p. 8344-8349, 2011.