

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE
PROCESSOS E TECNOLOGIAS

PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO ATRAVÉS DA DIGESTÃO
ANAERÓBIA DE GLICEROL E VINHOTO UTILIZANDO
CONSÓRCIO MICROBIANO

Eduardo Ribeiro Lovatel

Caxias do Sul, 2016
Eduardo Ribeiro Lovatel

**PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO ATRAVÉS DA DIGESTÃO
ANAERÓBIA DE GLICEROL E VINHOTO UTILIZANDO CULTURAS
MISTAS**

Dissertação apresentada no Programa de Pós Graduação em Engenharia de Processos e Tecnologias da Universidade de Caxias do Sul, visando a obtenção de grau de mestre em Engenharia de Processos, orientado por Dr. Lademir Luiz Beal.

L896p Lovatel, Eduardo Ribeiro

PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO ATRAVÉS DA DIGESTÃO
ANAERÓBIA DE GLICEROL E VINHOTO UTILIZANDO
CONSÓRCIO MICROBIANO / Eduardo Ribeiro Lovatel. – 2017.
63 f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa
de Pós-Graduação em Engenharia de Processos e Tecnologias, 2017.
Orientação: Lademir Luiz Beal.

1. Tratamento de Efluente. 2. Digestão Anaeróbia. 3. Hidrogênio. 4.
Glicerol. 5. Vinhoto. I. Beal, Lademir Luiz, orient. II. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UCS com os dados
fornecidos pelo(a) autor(a).

**“Produção de hidrogênio através da digestão anaeróbia de glicerol e
vinhoto utilizando culturas mistas.”**

Eduardo Ribeiro Lovatel

Dissertação de Mestrado submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos e Tecnologias da Universidade de Caxias do Sul, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Engenharia de Processos e Tecnologias, Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos e Produtos Industriais.

Caxias do Sul, 21 de dezembro de 2016.

Banca Examinadora:

Dr. Lademir Luiz Beal
Orientador
Universidade de Caxias do Sul

Dr. Maurício Moura da Silveira
Universidade de Caxias do Sul

Dr. Mario Takayuki Kato
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Suelen Osmarina Paesi
Universidade de Caxias do Sul

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer aos meus pais, Clovis e Rosane, por terem me educado com excelência, por terem me dado o suporte familiar necessário para meu crescimento, e principalmente pela liberdade de descobrir o mundo com meus próprios olhos, acompanhando de longe o caminho que trilhei.

Gostaria de agradecer à minha namorada Karen, pelo suporte emocional necessário durante o tempo de mestrado, aos meus amigos, por conseguirem me distrair, quando já não conseguia pensar em reatores ou hidrogênio.

Devo agradecer aos membros do Laboratório de Tecnologias Ambientais (LATAM) por toda colaboração durante o tempo de mestrado, auxiliando em discussões importantes a ajuda na operação dos experimentos, principalmente à técnica Juliane Inês, às bolsistas Isadora, Ana Paula, e Bruna, e aos colegas de mestrado.

Devo um agradecimento ao meu Orientador Lademir Luiz Beal, que me acompanha desde a graduação e teve grande importância neste projeto, e mostrou que os sábados e domingos valeram a pena.

Um agradecimento especial a todos meus professores, que de algum jeito me moldaram no pesquisador que sou hoje.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo Geral	13
2.2 Objetivos Específicos	13
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3.1. Produção de H ₂ via processos biológicos	14
3.2. Rota metabólica de produção de H ₂	15
3.3. Ajuste Cinético Aplicados à Produção de hidrogênio	18
3.4. Substratos	19
3.4.1. Glicerol	19
3.4.2. Vinhoto	20
3.5. Tipo de inóculo	21
3.5.1. Inativação do lodo	22
3.6. Fatores que influenciam a produção de H ₂ por via biológica	23
3.6.1. pH	23
3.6.2. Temperatura	23
3.6.3. Pressão parcial do hidrogênio	24
3.6.4. Ácidos orgânicos voláteis (AOV)	25
4 MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1. Metodologia Geral	26
4.1.1. Tipo de Lodo	26
4.1.2. Inativação do Lodo	26
4.1.4. Unidade Experimental	28
4.1.5. Análises Cromatográficas	28
4.1.6. Medição do volume de gás gerado	29
4.1.7. Ensaio de atividade metanogênica específica (AME)	29
4.1.8. Ensaio de atividade hidrogênica específica (AHE)	30
4.1.9. Isolamento e identificação dos	31
4.1.10. Isolamento em <i>roll-tube</i>	31
4.1.10.1. Extração de ácidos nucleicos	32
4.2. Ensaio Experimentais	32
4.2.1. Produção de H ₂ a partir de	32
4.2.2. Produção de H ₂ a partir de Glicerol	33
4.2.2.1. Soluções de Nutrientes	33
4.2.3. Produção de H ₂ a partir de vinhoto	34
4.2.4. Produção de H ₂ a partir de m	34

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1. Experimento com glicose	36
5.2. Experimentos com Glicerol.....	37
5.3. Experimentos com vinhoto.....	39
5.3.1. Produção de H ₂ utilizando vinhoto com pH inicial de 4,5.....	39
5.3.2. Produção de H ₂ utilizando vinhoto com pH inicial de 5,5.....	40
5.3.3. Produção de H ₂ utilizando vinhoto com pH inicial de 6,0.....	42
5.3.4. Produção de H ₂ utilizando vinhoto com pH inicial pH 6,5.....	43
5.3.5. Balanço de DQO	45
5.3.6. Análise comparativa de produção de H ₂ em diferentes concentrações de pH inicial....	46
5.4. Experimentos com mistura de substrato (Vinhoto e Glicerol)	47
5.4.1. Produção de hidrogênio.....	47
5.4.2. Taxa de produção de hidrogênio	50
5.4.3. Análise de Ácidos Orgânicos Voláteis.....	51
5.4.4. Balanço de DQO	52
5.4.5. Análise global.....	52
5.5. Análises Microbiológicas	54
6. CONCLUSÕES.....	56
7. RECOMENDAÇÕES	57
REFERÊNCIAS	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Meio de cultivo PYG (Peptona, extrato de levedura, glicose para isolamento dos microrganismos.

Tabela 2: Solução de nutrientes para o teste de AME

Tabela 3: solução de nutrientes para o teste de AHE

Tabela 4: Parâmetros de glicerol e vinhoto utilizados

Tabela 5: Composição inicial do meio nos quatro experimentos

Tabela 6: Balanço de DQO

Tabela 7: Resumo dos experimentos

Tabela 8: Resumo dos experimentos.

Tabela 9: Substrato resultante da relação Vinhoto/Glicerol/Água em 5 litros.

Tabela 10: Maior taxa de produção de hidrogênio x pH

Tabela 11: Balanço de DQO

Tabela 12: Resumo dos experimentos

Tabela 13: Análise dos microrganismos presentes ao fim do experimento.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Rota de degradação de matéria orgânica via digestão anaeróbia
- Figura 2:** Rota metabólica de produção de hidrogênio
- Figura 3:** Produção Brasileira de Etanol
- Figura 4:** Imagem da cápsula após desidratação
- Figura 5:** Imagem do reator
- Figura 6:** Ilustração do sistema de medição de gás
- Figura 7:** Visualização do amplificado em gel de agarose dos microrganismos isolados.
- Figura 8:** (a) Produção acumulada de hidrogênio e taxa de produção (H_2') ao longo do tempo. (b) Taxa de produção de hidrogênio e pH em função do tempo
- Figura 9:** Produção de hidrogênio e pH em função do tempo
- Figura 10:** Produção de hidrogênio e taxa de produção em função do tempo.
- Figura 11:** (a) Produção de hidrogênio e comportamento do pH em função do tempo. (b) Produção de H_2 e taxa de produção ao longo do tempo.
- Figura 12:** Produção de Ácidos orgânicos voláteis ao longo do tempo.
- Figura 13:** (a) Produção de hidrogênio e comportamento do pH ao longo do tempo. (b) Produção de H_2 e taxa de produção ao longo do tempo.
- Figura 14:** Produção de Ácidos orgânicos voláteis ao longo do tempo
- Figura 15:** (a) Produção de hidrogênio e comportamento do pH ao longo do tempo. (b) Produção de H_2 e taxa de produção ao longo do tempo.
- Figura 16:** Produção de ácidos orgânicos voláteis ao longo do tempo.
- Figura 17:** (a) Produção de hidrogênio e comportamento do pH ao longo do tempo. (b) Produção de H_2 e taxa de produção ao longo do tempo.
- Figura 18:** Produção de Ácidos orgânicos voláteis ao longo do tempo.
- Figura 19:** Produção de hidrogênio e comportamento de pH. (A) Relação 80% Vinhoto / 20% Glicerol. (B) 60% Relação Vinhoto / 40% Glicerol. (C) 40% Vinhoto / 60% Glicerol. (D) 20% Relação Vinhoto / 80% Glicerol.
- Figura 20:** Produção de hidrogênio e taxa de produção de hidrogênio. (A) Relação 80% Vinhoto / 20% Glicerol. (B) 60% Relação Vinhoto / 40% Glicerol. (C) 40% Vinhoto / 60% Glicerol. (D) 20% Relação Vinhoto / 80% Glicerol.
- Figura 21:** Produção de Ácidos orgânicos. (a) Relação 80% Vinhoto / 20% Glicerol. (b) 60% Relação Vinhoto / 40% Glicerol. (c) 40% Vinhoto / 60% Glicerol. (d) 20% Relação Vinhoto / 80% Glicerol.

RESUMO

O aumento global da utilização de combustíveis tem por consequência maior demanda energética, seja ela renovável ou não. Posto que nossa matriz energética ainda é baseada em combustíveis fósseis, isso significa que há um aumento no impacto ambiental causado pela queima de fontes derivadas de petróleo e carvão. Neste contexto, destaca-se hidrogênio, um gás que pode desempenhar papel significativo na redução das emissões de gases de efeito estufa (GEE) e produção energética limpa, pois a síntese de hidrogênio pode ser realizada a partir de resíduos orgânicos aplicando o processo de digestão anaeróbia. Em nível nacional, dois resíduos se destacam nesse contexto: glicerol e vinhoto. O primeiro é o principal subproduto da indústria do biodiesel, o segundo é o principal resíduo da indústria sucroalcooleira. Assim, essa pesquisa se focou em estabelecer os melhores parâmetros influência no processo de produção de hidrogênio utilizando vinhoto e glicerol em reatores de modo de operação de batelada.

Concluiu-se que a produção de hidrogênio somente utilizando vinhoto tem seus melhores resultados usando pH 6,0 e pH 6,5, sendo que o primeiro estudo obteve maior produção total acumulada (7.585 mL H₂) e o segundo obteve maior taxa de produção (0,88 mmol H₂.gSSV⁻¹.h⁻¹). Os estudos com mistura dos substratos mostram que a produção de H₂ pode ser ainda mais eficiente em comparação com vinhoto bruto, sendo que a melhor razão de mistura foi com 80% de DQO decorrente do glicerol e 20% de vinhoto em que houve produção total acumulada de 10.070 mL H₂ e 0,85 mmol H₂.gSSV⁻¹.h⁻¹.

Palavras-chave:

hidrogênio, co-digestão, glicerol, vinhoto, digestão anaeróbia, energias sustentáveis.

ABSTRACT

The fuel use increase in a global scale have caused rising energy demand, whether it's renewable or not. Since our energy matrix is still based on fossil fuels, it also means an increase in the environmental impact caused by burning sources derived from oil and coal. In this context, hydrogen is highlighted, as a gas that could play a significant role in the reduction of greenhouse gas (GHG) emissions and clean energy production, since hydrogen synthesis can be performed from organic waste using the anaerobic digestion process. At the national level, two residues stand out: glycerol and sugarcane vinasse. The first is the main by-product of the biodiesel industry, the second is the main residue of the sugar and ethanol industry. Thus, this research focused on establishing the best influence parameters in the hydrogen production process using vinasse and glycerol in batch mode operation reactors.

It was concluded that the production of hydrogen only using vinasse had better results using pH 6.0 and pH 6.5, and the first study obtained higher accumulated total production (7,585 mL H₂) and the second obtained a higher specific production rate (0.88 mmol H₂.gSSV⁻¹.h⁻¹). The studies with mixture of the substrates shown that H₂ production can be even more efficient in comparison with crude vinasse, and the best mixing ratio was with 80% of COD due to glycerol and 20% to vinhoto, in which there was total accumulated production 10.070 mL H₂ and 0.85 mmol H₂.gSSV⁻¹.h⁻¹.

Keywords:

Hydrogen, co-digestion, glycerol, vinasse, anaerobic digestion, sustainable energies.

1. INTRODUÇÃO

A crescente demanda energética provoca um aumento da utilização de combustíveis, sejam eles renováveis ou não. No âmbito dos combustíveis fósseis isto não só coloca uma grande pressão sobre o consumo das reservas, mas também resulta no aumento dos níveis de poluição em todo o mundo.

A combustão de combustíveis fósseis acrescenta cerca de 6 Gigatoneladas de carbono por ano na forma de dióxido de carbono à atmosfera (IPCC, 2006). Esses fatores têm instigado acentuado interesse no desenvolvimento de alternativas energéticas limpas e renováveis (AYAS e ESEN, 2016). Neste ponto, a geração crescente de gases de efeito estufa (GEE), preocupações sobre o esgotamento dos combustíveis fósseis, e a poluição ambiental fazem do hidrogênio uma fonte de energia alternativa.

Nesse contexto, é necessário desenvolver alternativas renováveis para o uso de combustíveis fósseis, sendo o hidrogênio (H_2), um gás combustível importante e promissor, uma vez que pode desempenhar papel significativo na redução das emissões de GEE e produção energética (Wang et al, 2016). O único resíduo da combustão de H_2 é água e, portanto, é considerado uma fonte de energia limpa. Possui rendimento energético 2,75 vezes maior do que a de combustíveis derivados de petróleo, e poder calorífico inferior de 122 kJ/g a 25°C e 1 atm (KADPAN e KARGI,F, 2006).

O tamanho do mercado mundial de produção de H_2 foi estimado em 53 milhões de toneladas métricas em 2010, o que corresponde a um valor estimado em 82,6 bilhões dólares. Mais importante, o volume de produção de H_2 global está previsto para crescer a uma taxa composta anual de 5,6% durante 2011-2016 (MARKETS AND MARKETS, 2011).

O H_2 não ocorre na forma pura; ou seja, sua produção é industrial. Isso acontece a partir de fontes fósseis através de reforma de gás natural ou metano e como um subproduto de alguns processos industriais. A produção a partir de combustíveis fósseis tem como consequência a produção de gases de efeito estufa, CO_2 , não existem benefícios ambientais nesta forma de produção (Jong, 2009). O H_2 atualmente produzido é utilizado principalmente no refino de petróleo, tratamento de metais e fabricação de fertilizantes, e possui grande potencial como combustível automotivo (MARKETS AND MARKETS, 2011) e (LIPMAN, 2011).

No momento, a síntese de hidrogênio a partir de biomassa e resíduos através de rotas biológicas tem interesse emergente devido à sua natureza sustentável. Entre os principais métodos de produção de hidrogênio, os processos biológicos têm a vantagem de serem

duplamente sustentáveis, pois eles podem utilizar resíduos orgânicos para a produção de H₂, gerando energia limpa.

No entanto, atualmente, não é considerado econômico produzir hidrogênio comercialmente devido ao elevado custo das matérias-primas e à crise alimentar (WANG et al, 2016). Assim, a digestão anaeróbia tem recebido interesse em escala global, pois pode converter resíduos orgânicos sejam sólidos ou líquidos, em hidrogênio (HAN, et al, 2016).

Os processos microbiológicos anaeróbios têm demonstrado um importante papel na produção de H₂, pois eles demandam pouca energia para a realização de processos onde os produtos finais sejam não apenas o H₂, mas também outros compostos químicos que possam ser aproveitados como fonte de energia ou que possuam valor agregado como matéria prima para outros processos. Como exemplo, podem-se citar metano, etanol, 1,3-propanodiol, n-butanol, 2,3-butanodiol e ácidos orgânicos, entre outros.

No Brasil, o glicerol e o vinhoto, destacam-se como possíveis substratos para produção de H₂. O primeiro é um subproduto da produção de biodiesel e o segundo, um resíduo da produção de etanol. Ambos podem ser utilizados na formação de produtos com maior valor agregado, com redução de seu potencial poluidor.

Interessante, também é, considerar a mistura dos subprodutos e resíduos, visto que o glicerol possui maior DQO, enquanto o vinhoto, possui maior concentração de magnésio, ferro e potássio. O efluente resultante teoricamente seria mais equilibrado o que favoreceria a degradação dos substratos e também a produção de H₂ por rota biológica. Porém, a co-digestão de ambos pode não ser viável devido a logística necessária para a mistura.

Considerando o potencial energético e ambiental do gás hidrogênio, é importante o estudo dos parâmetros de influência no processo de produção deste gás por via biológica. Também é de suma importância o estudo das rotas metabólicas e formação dos produtos durante o processo de fermentação.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Produzir hidrogênio com a degradação de glicerol e vinhoto, através de processo microbiológico anaeróbio, utilizando culturas mistas.

2.2 Objetivos Específicos

- Relacionar a produção de hidrogênio com a produção de coprodutos oriundos do processo de digestão anaeróbia.
- Identificar os microrganismos presentes na cultura mista após a fermentação.
- Avaliar a cinética de produção de hidrogênio.
- Avaliar a possibilidade de utilizar o método da máxima tangente como análise da taxa máxima de produção de hidrogênio.
- Estabelecer os melhores parâmetros para a realização da fermentação.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O objetivo deste capítulo é apresentar conceitos e fundamentos teóricos que irão embasar a metodologia e a discussão dos resultados obtidos através dos experimentos, assim como a argumentação final da dissertação.

3.1. Produção de H₂ via processos biológicos

Processos biológicos de produção de hidrogênio não apenas trazem benefícios para o meio ambiente, como são inesgotáveis. Além disso, podem utilizar resíduos como substrato para produção do gás. Assim, eles podem ser uma alternativa para os problemas de resíduos e de geração de energia. Já existem diversos estudos no âmbito da produção biológica de hidrogênio, os quais, se concentram principalmente em biofotólise direta e indireta realizado por cianobactérias e algas verdes, por bactérias fotofermentativas e por bactérias fermentativas. No entanto, cada um dos processos tem as suas próprias vantagens e desvantagens (MARTÍNEZ-PÉREZ et al., 2007).

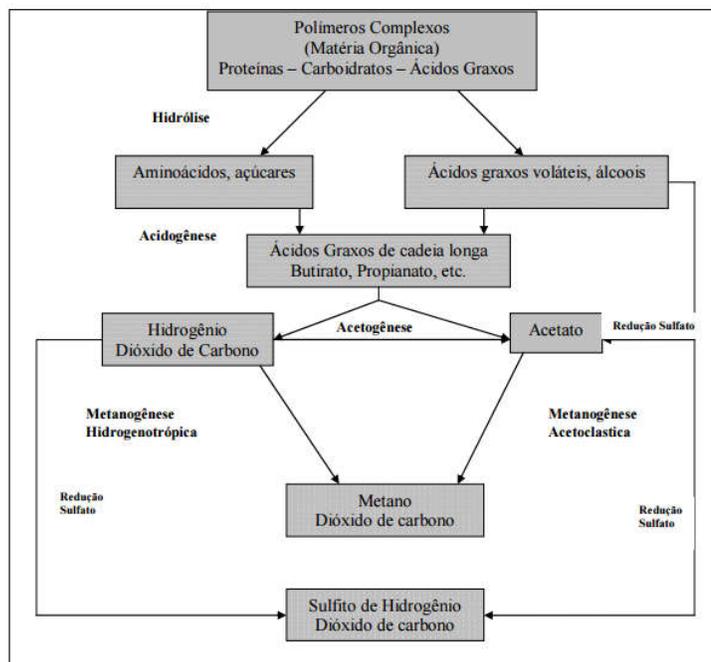
Os principais problemas da biofotólise e foto fermentação são relacionados à dependência de luz e ao seu baixo rendimento e baixa taxa de produção de hidrogênio para aplicações práticas. Entre outros processos, a digestão anaeróbia parece ser mais promissora. O processo não requer energia luminosa, exige condições de controle moderadas e tem menor demanda energética. (CHONG, M. et al., 2012)

Esse processo pode usar resíduos, como os de destilação, os quais possuem alta carga orgânica, que serve como substrato para produção de hidrogênio. O rendimento de H₂ e a taxa de produção de H₂ são mais atrativos nos processos anaeróbios em comparação com os outros processos (DAS et al., 2008).

Uma vantagem da produção de H₂ por via biológica está relacionada à capacidade dos microrganismos de selecionarem o seu substrato, mesmo quando este se encontra em uma mistura de outros compostos. Deste modo, minimiza-se a necessidade de purificação do substrato fundamental ao processo, aumentando o espectro de matérias-primas que podem ser utilizadas e uma menor necessidade de tratamentos químicos (DRAPCHO et. al., 2008). Além disso, o emprego de temperatura e pressão de operação similar às ambientais consiste em uma vantagem relevante do processo microbiológico, tornando-se um processo com balanço energético favorável (DAS e VEZIROGLU, 2008).

Com relação à produção fermentativa de H_2 é possível elencar outras vantagens como a baixa demanda por nutrientes, grande variedade de fontes de carbono que podem ser utilizadas, produção de coprodutos de alto valor agregado, tais como, o ácido butírico e acético, e metano conforme pode ser visto na Figura 1 (WANG e WAN, 2009).

Figura 1: Rota de degradação de matéria orgânica via digestão anaeróbia



Fonte: Salomon (2007)

Por outro lado, existem desvantagens deste processo, como rendimentos relativamente baixos de H_2 comparando com reforma de biogás e outros processos de produção. A produção fermentativa de H_2 é dependente de uma série de parâmetros operacionais e condições físico-químicas que influenciam no processo, como exemplo pode ser citados o tipo de substrato, tipo de reator, a presença e a concentração de nutrientes, além do pH e temperatura (PANDEY, 2011).

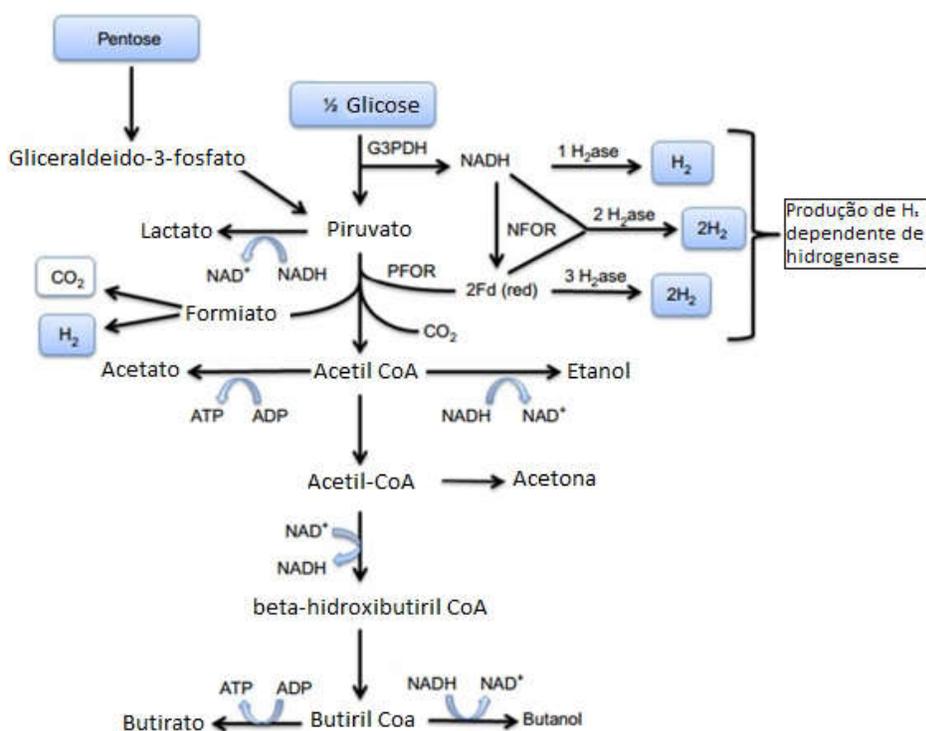
3.2.Rota metabólica de produção de H_2

Uma variedade de microrganismos pode ser utilizada na fermentação visando à obtenção de hidrogênio. Os principais são bactérias anaeróbias estritas e facultativas, que muitas vezes podem estar em consórcios bacterianos.

A fermentação é um processo metabólico que ocorre sob condições anaeróbias para regenerar o ATP da célula. Além disso, sob condições anaeróbias, o ciclo de ácido tricarboxílico é bloqueado. Do mesmo modo, o hidrogênio age como produto final para manter o potencial redox da célula (PANDEY, 2011).

Os carboidratos, principalmente glicose, correspondem às fontes de carbono preferenciais para o processo de fermentação que originam predominantemente ácido acético e butírico concomitantemente com o gás hidrogênio. A fermentação da glicose produz piruvato pela via glicolítica para regenerar ATP; subsequentemente, o piruvato pode ser envolvido em duas reações bioquímicas diferentes que levam à formação de hidrogênio mostrada na Figura 2 (HALLENBECK, 2005).

Figura 2: Rota metabólica de produção de hidrogênio



Fonte: adaptado de Pandey (2011)

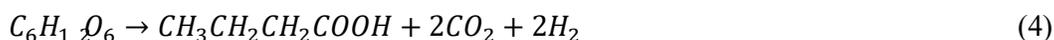
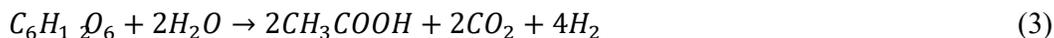
Em microrganismos anaeróbios obrigatórios, como *clostridium* e bactérias termofílicas, piruvato é oxidado a acetil-CoA pela enzima piruvato:ferredoxinaoxirredutase (UYEDA e RABINOWITZ, 1971). Acetil-CoA é, subsequentemente convertida a acetil-fosfato com a geração de ATP e acetato. A oxidação do piruvato para acetil-CoA requer a redução de ferredoxina (Fd).

A Fd reduzida é então oxidada por [FeFe]-hidrogenase e catalisa formação de H₂. A equação geral é mostrada nas equações (1) e (2).



Quatro mols de hidrogênio por mol de glicose se formam quando o piruvato é oxidado para acetato como o único produto final metabólico (BENEMANN, 1996). No entanto, apenas dois mols de hidrogênio por mol de glicose são produzidos quando o piruvato é oxidado para butirato.

A reação bioquímica geral, com ácido acético e ácido butírico como produtos finais do metabolismo, é mostrada nas equações (3) e (4), respectivamente.



O segundo tipo de reação bioquímica envolvida na produção de hidrogênio ocorre em algumas bactérias anaeróbias facultativas, como *Escherichia coli*. Nesta via, o piruvato é oxidado a acetil-CoA e formiato. A reação é catalisada pela enzima piruvato formiato liase. (5) (KNAPPE e SAWERS, 1990).



Subseqüentemente, o formiato é clivado por ferredoxina hidrogênio liase (FHL) para produzir dióxido de carbono e hidrogênio (6).



Na fermentação do ácido láctico, o piruvato é oxidado a lactato diretamente. O hidrogênio não é produzido quando o etanol, ácido láctico, ou ácido propiônico são produtos finais da via metabólica. Além disso, alguns anaeróbios facultativos, tais como bactérias entéricas, podem realizar a respiração anaeróbia em vez de fermentação usando nitrato ou fumarato como aceptores finais (MATHEWS e WANG, 2009).

Respiração aeróbia pode prejudicar a produção de hidrogênio. Portanto, para a realização de estudos sobre a produção de hidrogênio, o meio deve ser desprovido desses receptores de elétrons.

Os ácidos orgânicos produzidos durante a fermentação podem ser utilizados como um substrato para a fotofermentação ou produção de metano (MATHEWS e WANG, 2009).

3.3. Ajuste Cinético Aplicados à Produção de hidrogênio

Durante o processo fermentativo de produção de H_2 as concentrações de substratos, o crescimento das bactérias produtoras de H_2 e alguns metabólitos solúveis mudam regularmente. Deste modo, alguns modelos cinéticos têm sido propostos para descrever tais mudanças. Em revisão literária, WAN e WANG (2009) sinalizam que o modelo modificado de Gompertz é usado com frequência para descrever o progresso da produção de H_2 em bateladas

Porém, um ajuste cinético proposto para avaliar a de produção de H_2 que pode se utilizado é o método da máxima tangente, que é adaptado daquele proposto por BEAL e MONTEGGIA (2009) para o cálculo da atividade metanogênica específica (AME).

O teste de AME pode ser entendido como a capacidade máxima de produção de CH_4 por um consórcio de microrganismos. Portanto, o teste de AME pode servir como um parâmetro de controle da eficiência do consórcio microbiano presente em um reator. Como o teste indica a capacidade de formação de CH_4 , o valor de AME pode ser usado para se determinar a carga orgânica que pode ser aplicada em reatores anaeróbios contendo determinada massa de lodo. Os ensaios de AME são muito importantes para entender o comportamento da cultura mista quanto a uma fonte facilmente degradável de matéria orgânica. Mesmo explorando a produção de metano, esse teste serve para entender se a cultura mista utilizada tem um bom potencial de produção de biogás (BEAL e MONTEGGIA, 2009).

Sendo o teste de AME um método bem embasado, analogamente, ele pode ser extrapolado para a produção de hidrogênio com os mesmos benefícios, desde que os microrganismos metanogênicos sejam inibidos. A AHE ainda é um método pouco conhecido para avaliação da produção de hidrogênio, porém poderia ser melhor difundido, visto que é um método simples, e possui uma boa reprodutibilidade, podendo facilitar a quantificação da taxa de hidrogênio produzida, assim como a capacidade de produção de uma cultura de lodo específica. (TREVISAN, 2010).

3.4. Substratos

Ao longo dos últimos anos, a demanda e a produção de biodiesel aumentou de forma vertiginosa, sendo o Brasil um dos maiores produtores em âmbito mundial. Com relação ao etanol, o Brasil tem se destacado desde a década de 1970 em função do programa Proálcool a partir da cana de açúcar. Os dois produtos geram subprodutos e resíduos com alto potencial de impacto ao meio ambiente: o glicerol, e o vinhoto, respectivamente. Deste modo, é importante que sejam pesquisadas formas para associar esses dois substratos em processos fermentativos ao que tange a produção de H₂ (FRANCO, 2012).

Para resolver esse problema, a produção de hidrogênio utilizando resíduos como substrato é uma abordagem de baixo custo e promissora, pois desta forma, o processo poderia ter melhor relação custo-benefício quando comparado com outros processos químicos e eletrolíticos. O uso de matérias primas de menor custo na produção de hidrogênio, podem tornar os processos de produção mais competitivos em relação aos processos convencionais, no futuro (DAS e VEZIROGLU, 2001).

3.4.1. Glicerol

A partir da Lei nº 11.097, de 13 de Janeiro de 2005 (BRASIL, 2005), foi estabelecido que o óleo diesel vendido no País deveria conter um percentual de 5% de biodiesel até o ano de 2013. Esta data foi antecipada pela Resolução nº 06/2009 do Conselho Nacional de Política Energética (CNPE) (BRASIL, 2009) e o percentual de 5% passou a ser obrigatório desde 1º de janeiro de 2010. Pela lei Lei 3.834 de 2015 (BRASIL, 2016), em março de 2017 entra em vigor o B8, que estabelece até 8% na mistura de diesel, em março de 2018 o B9 e em março de 2019 o B10.

Glicerol é o principal subproduto da indústria do biodiesel, e sua geração tem crescido, de acordo com o crescimento da produção de biodiesel. Ele é formado através da transesterificação de óleos vegetais na proporção de 100 kg de glicerol por tonelada de biodiesel, sendo que sua concentração pode chegar a 1.000 gDQO/L.

Com o aumento gradual da produção de biodiesel, e consequentemente de glicerol, seu valor de mercado ficou menor. Apesar de este subproduto ser utilizado nas indústrias farmacêuticas, cosméticas e alimentícias, o glicerol deve ser processado para que seja purificado (PACHAURI e HE, 2006).

Entretanto, alguns microrganismos podem utilizar glicerol bruto como uma fonte de carbono, que pode ser convertida a ácidos orgânicos e produtos voláteis como hidrogênio e gás carbônico (JONES e WOODS, 1986) e (BIEBL et al. 1999). Sendo um produto com menor

valor de mercado, é possível pensar em utilizá-lo para a produção de H₂ em substituição a fontes de carbono mais usuais. Essa substituição, inclusive, pode ajudar a reduzir os custos da produção do hidrogênio por via biológica, que ainda são elevados. Uma vantagem do uso do glicerol em relação aos açúcares mais comuns, como a glicose e a xilose, refere-se ao fato de proporcionar custo de operação quase 40% menor. (YAZDANI; GONZALEZ, 2007).

Com base na literatura (Van Ginkel, S.W. e Logan, B. 2005 e PRAKASHAM et al, 2009), referencia-se que existe uma gama de concentrações de DQO utilizadas para a produção de hidrogênio, porém para culturas mistas concentrações mais usuais estão na faixa de 2 a 4 gDQO.L⁻¹.

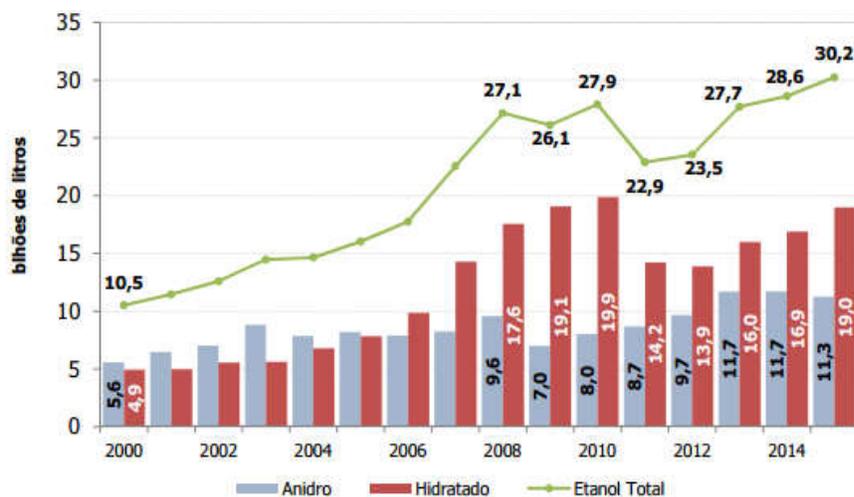
Van Ginkel e Logan (2005) mostraram que valores menores de carga orgânica produzem valores maiores de hidrogênio. R.S. Prakashama (2009) em um estudo utilizando glicose e xilose, mostrou que com 5,5 g de glicose, alcançou-se a produção máxima de hidrogênio, 1500 mL de H₂.

3.4.2. Vinhoto

O vinhoto é o principal resíduo das destilarias de álcool, o qual tem sido há longo tempo uma constante preocupação ambiental devido ao seu potencial poluidor. A composição do vinhoto depende de diversos fatores, sendo que os mais importantes são a natureza e a composição da matéria-prima e o tipo de condução do aparelho de destilação.

Dentre os efluentes líquidos produzidos pelo setor sucroalcooleiro, o vinhoto é o que possui o maior potencial poluidor, cujos valores de demanda bioquímica e química de oxigênio (DBO e DQO) estão entre 20 e 35 g.L⁻¹.

Figura 3: Produção Brasileira de Etanol



Fonte: EPE 2016

É importante ressaltar que para cada litro de álcool produzido são gerados em média, 12 litros de vinhoto (ZOLIN et al., 2011). Esse fato é preocupante, visto que a produção de etanol vem crescendo continuamente (Figura 3) e em 2015 houve produção recorde de etanol, 30 bilhões de litros de etanol (EPE, 2016).

Atualmente no Brasil, a principal destinação do vinhoto é a fertirrigação das plantações de cana-de-açúcar, pois é rico em potássio, sendo que o resíduo é adicionado na água de irrigação, fornecendo nutrientes ao solo (PAULINO et al., 2011).

Todavia, devido ao elevado teor de nutrientes deste resíduo, as agências ambientais estão limitando a quantidade de vinhoto aplicada ao solo, o que motiva novas pesquisas para a destinação do vinhoto. Além disso, a grande desvantagem do uso do vinhoto como fertilizante reside nos elevados custos de transporte para levar este resíduo às plantações (SALOMON e LORA, 2009).

Devido à capacidade limitada de absorção de nutrientes do solo e à crescente produção de vinhoto, devem-se avaliar alternativas para a destinação e tratamento desse resíduo. Neste âmbito, a digestão anaeróbia visando a produção de hidrogênio pode ter um papel significativo no tratamento do vinhoto e na produção de energia.

Nesse contexto, deve-se estudar os melhores parâmetros e qual é o potencial de produção de hidrogênio utilizando vinhoto. FERNANDES et al. (2010), utilizando vinhoto com DQO de 250 mg/L, 2,5 g SSV/L de cultura mista, obtiveram rendimento máximo de H₂ 579 mL H₂/g DQO em uma concentração de efluente baixa (0,25g DQO.L⁻¹).

Este processo reduz a carga orgânica, que está associada ao potencial poluente deste resíduo, e reduz o odor que também é um problema nas regiões onde se localizam as usinas além de produzir um gás combustível. Porém, mesmo com uma boa produção, o processo de biodigestão não reduz um dos principais problemas, que é o alto teor de potássio.

3.5. Tipo de inóculo

Os processos que utilizam culturas mistas são mais simples de operar e controlar, podendo inclusive ser capazes de metabolizar um maior espectro de substratos, demonstrando, em geral, um maior rendimento na produção de H₂, quando comparado às culturas puras. Culturas mistas são benéficas aos processos visto que possuem desempenhos robustos e conversão eficiente de uma grande variedade de materiais e resíduos orgânicos não estéreis com a ajuda de diversos grupos de bactérias (LI et al., 2012).

De um ponto de vista de engenharia, a seleção de culturas mistas é considerada favorável para a aplicação em larga escala. Isto ocorre devido ao fato de que o controle e a operação do processo são facilitado quando não é exigida esterilização do meio (VALDEZ-VAZQUEZ et al., 2005).

Segundo Vazquez (2011), culturas puras de microrganismos tem menos atividades hidrolíticas necessárias para degradar resíduos complexos para a produção de hidrogênio. A degradação da matéria orgânica em ambientes anaeróbios por consórcios microbianos envolve a cooperação de diferentes espécies existentes no sistema e atividade metabólica sinérgica, que geram um fermentação estável e auto regulatória.

Culturas mistas usadas como inóculos para a produção de hidrogênio podem ser obtidas a partir de várias fontes, tais como farelo de soja fermentado ou lodo de digestores anaeróbios de esgotos municipais ou de resíduos orgânicos.

No entanto, MAINTINGUER et al. (2008) destacam a necessidade de um pré-tratamento do inóculo, a fim de se eliminar arqueas metanogênicas hidrogenotróficas, visto que estas utilizam o H_2 em seu metabolismo. Além dessas, também outros microrganismos hidrogenotróficos, como as bactérias redutoras de enxofre devem ser eliminadas.

O pré-tratamento térmico, por exemplo, juntamente com o controle de pH têm sido aplicados para a seleção de bactérias capazes de produzirem esporos, como as do gênero *Clostridium*, o que favorece a produção de H_2 , uma vez que estas bactérias são tolerantes a condições ambientais adversas e a temperaturas elevadas (MAINTINGUER et al., 2008).

A identificação da prevalência microbiana ou as associações de microrganismos em um determinado inóculo podem ser determinadas a partir de métodos de análise microbiológica. Nesse sentido, as técnicas mais utilizadas atualmente são PCR/16S RNAr e PCR-DGGE. Assim, em geral, culturas mistas são mais adequadas para a produção de bio-hidrogênio de matérias primas renováveis, como biomassa e resíduos orgânicos, que possuem composições químicas mais complexas.

3.5.1. Inativação do lodo

Na produção biológica de H_2 o tratamento do inóculo é importante para inativar os microrganismos hidrogenotróficos, dando preferência às bactérias produtoras (acidogênicas), formadoras de esporos. Os métodos mais comuns de inativação de microrganismos são: choque térmico, tratamento químico, aeração, calor seco seguido de dessecação e choque térmico (ROSSI et al, 2012).

Segundo MORAN et al (2008), apesar de alguns tratamentos de inóculo resultarem em baixos rendimentos, esses, ainda são maiores do rendimento onde a biomassa não foi tratada. Logo, essa é uma etapa muito importante na produção de hidrogênio via culturas mistas, pois aumenta o rendimento na taxa de produção do gás.

ROSSI et al. (2011) realizaram um comparativo com cinco métodos físico-químicos para pré-tratamento de inóculos na produção de H₂ a partir de glicerol: choque térmico, tratamentos ácido e básico, calor seco seguido de dessecação, e congelamento seguido de descongelamento. Os resultados apontaram uma maior produção de H₂ quando empregados os métodos de calor seco seguido de dessecação e de choque térmico, o que está de acordo com os resultados obtido nos estudos de DA COSTA (2010).

3.6. Fatores que influenciam a produção de H₂ por via biológica

3.6.1. pH

O pH é conhecido por ser um dos principais fatores ambientais que afetam as vias metabólicas e o rendimento de hidrogênio. Todas as enzimas são ativas apenas em um determinado intervalo específico de pH e têm uma atividade máxima a um pH específico.

Assim, o pH também afeta a atividade da enzima hidrogenase, chave no processo de produção (DABROCK et al., 1992). Estudos têm demonstrado que em altas concentrações de ácidos dissociados, devido a uma alta força iônica no meio, a produção de hidrogênio muda de fase acetogênica para solventogênica (KHANAL et al., 2004).

No entanto o mesmo tipo de inibição ocorre em baixo pH quando ácidos apolares não dissociados presentes no meio penetram na parede celular. Além disso, em operações em que são usadas culturas mistas ou o lodo é utilizado como inóculo, o controle de pH é um fator crítico para suprimir a atividade de bactérias/arqueas metanogênicas, consumidoras de hidrogênio.(CAO e ZHAO, 2009).

Vários estudos demonstram que o pH do meio entre 5 e 6 é considerado adequado para se obter um rendimento mais elevado de hidrogênio (CAO e ZHAO, 2009). A utilização do pH fora da faixa ideal influencia negativamente a produção, suprimindo os rendimentos (KUMAR e DAS, 2000).

3.6.2. Temperatura

A temperatura é outro fator importante na produção de H₂ e está relacionada, por exemplo, à velocidade das reações bioquímicas na fermentação anaeróbia e, conseqüentemente, à dissolução dos reagentes no meio de cultivo.

Para efluentes que contenham matéria orgânica de simples biodegradação, o efeito da temperatura não é tão expressivo, porém, quando o efluente conta em sua composição, com matéria orgânica particulada ou compostos orgânicos complexos, os efeitos da temperatura na hidrólise e na acidogênese passam a ser uma preocupação.

Fermentação para a produção de hidrogênio pode ser realizada a diferentes temperaturas: mesofílica (25-40 °C), termofílica (40-65°C), extremo termofílica (65-80 C) ou hipertermofílicas (> 80 °C). A análise da literatura revela que a maioria dos estudos (quase 73%) na escala de laboratório foram realizados aplicando microrganismos mesófilos (Li e Fang, 2007). Estes estudos mostram que a temperatura tem um efeito significativo sobre a produção de hidrogênio, pois afeta a taxa máxima de crescimento específico do microrganismo, bem como a taxa de conversão do substrato, durante a produção de hidrogênio.

LEE et al. (2006) estudaram o potencial da produção de hidrogênio utilizando culturas mistas em temperaturas variando entre 15°C e 35°C. Eles observaram que o rendimento de hidrogênio e taxa máxima de produção aumenta com relação à temperatura. Em 35 °C, foram obtidas a taxa máxima de produção de hidrogênio e maior rendimento de hidrogênio, sendo 0,574 mol H₂.L⁻¹.d⁻¹ e 1,70 mol H₂/mol de glicose, respectivamente.

Mesmo havendo uma maior produção de hidrogênio em temperaturas termofílicas, do ponto de vista econômico, essas condições podem não ser viáveis devido a utilização intensiva de energia necessárias para manter as altas temperaturas.

3.6.3. Pressão parcial do hidrogênio

As rotas metabólicas de produção de hidrogênio são muito sensíveis à pressão parcial do gás. O acúmulo de hidrogênio no *headspace* do reator aumentará a pressão parcial de hidrogênio no sistema. De acordo com o princípio de Le Chatelier, devido a concentração de hidrogênio, a reação será inibida diretamente.

Assim, uma pressão parcial mais elevada de hidrogênio no sistema irá influenciar negativamente o processo, reduzindo a produção. Concomitantemente, nesse caso, vias metabólicas também podem se deslocar para a formação de produtos finais mais reduzidos, como lactato, etanol, acetona e butanol. Logo pode-se inferir que a pressão parcial de hidrogênio é um fator importante no caso da produção contínua deste gás (GRADY, et al. 2011).

Deste modo, é importante remover o excesso de hidrogênio do sistema para manter a sua produção. Diferentes estratégias de remoção ou separação de gás hidrogênio tem sido desenvolvidas para evitar os efeitos negativos da acumulação de hidrogênio na fase gasosa e líquida (ANGENENT et al. 2012).

MIZUNO et al. (2000) em seu trabalho, conseguiu aumentar a produção de hidrogênio em 68% pela aspersão de nitrogênio gasoso no reator. Estratégias para reduzir a pressão parcial são a aspersão com gases inertes como o nitrogênio e o argônio, a aplicação de pressão negativa no sistema de retirada de gases ou até a recirculação do efluente no reator.

3.6.4. Ácidos orgânicos voláteis (AOV)

Na produção de hidrogênio via digestão anaeróbia, os produtos finais do metabolismo são conhecidos por afetar o rendimento de hidrogênio, principalmente, etanol, ácido acético, ácido butírico e ácido propiônico, que são os metabólitos dominantes produzidos (LEE et al., 2002). No entanto, com o aumento da concentração dos metabólitos também aumenta a força iônica do meio, o que provoca a lise celular.

Foi demonstrado, que em concentrações mais elevadas de ácido, prótons podem permear a membrana celular das bactérias produtoras de hidrogênio e perturbar o equilíbrio fisiológico da célula, comprometendo significativamente o crescimento e a produção de hidrogênio (JONES e WOODS, 1986).

Para determinar o efeito inibitório de AOV sobre a produção de hidrogênio, LEE et al. (2002) adicionaram metabólitos solúveis ao meio. Foi verificado que com a adição de etanol, ácido acético, ácido propiônico e ácido butírico na gama de 0 a 300 mmol/L. Foi evidenciado que a taxa de produção de hidrogênio, reduziu significativamente com o aumento da concentração de AOV.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia é apresentada e dividida pelo tipo de experimento realizado durante as fases experimentais de produção de hidrogênio: com glicerol vinhoto e misto (mistura de glicerol e vinhoto). Também neste tópico é descrita a metodologia geral, que compreende todos os experimentos.

4.1. Metodologia Geral

Neste tópico, são apresentadas as metodologias que foram utilizadas em todos os tipos de experimentos deste projeto, como o tipo de análise de experimento e o tipo de cultura mista.

4.1.1. Tipo de Lodo

O lodo utilizado neste projeto foi obtido de um reator anaeróbio (UASB) de uma indústria de concentrado de proteína de soja; logo, é uma cultura mista de microrganismos granulares, com idade de lodo adequada para o uso nos testes, assim como realizado por SARAVAN et al (2016). Para que o lodo fosse conservado, ele foi armazenado a 4 °C em bombonas dentro de um refrigerador industrial, como feito por (ZAHEDI, 2016).

4.1.2. Inativação do Lodo

A inativação do lodo foi realizada por tratamento térmico. Previamente à utilização do lodo nos reatores, ocorreu o tratamento térmico da biomassa, na qual o lodo granular foi submetido à desidratação em banho à 60 °C até secagem aparente, ou seja, retirada da maior parte da água restando apenas a umidade residual.

Figura 4: Imagem da cápsula após desidratação



O autor (2016)

Após esse processo, a biomassa foi colocada em uma estufa a 105° C por 30 minutos para ser retirada a umidade residual. Depois deste processo, o lodo seco foi armazenado e utilizado.

4.1.3. Análise de sólidos suspensos voláteis (SSV)

O teste de sólidos suspensos voláteis (SSV) é necessário para determinar a quantidade de microrganismos no inoculo inicial. Nesse teste, uma amostra líquida de peso conhecido é passada através de uma membrana, para reter os sólidos contidos na amostra, após os sólidos são submetidos à desidratação e carbonização, para que com a diferença de peso entre etapas, possa ser descoberta a concentração de sólidos suspensos voláteis em uma amostra.

Para tal, segue-se o seguinte protocolo: coloca-se a cápsula em uma mufla a 550°C por aproximadamente 90 minutos; retira-se e dispõe no dessecador; após, coloca-se na cápsula um filtro de fibra de vidro com tamanho do poro igual a 1,2µm, deixar 1 hora no dessecador. Após, deve-se pesar o conjunto cápsula + filtro, denominado de P1. Após a pesagem (P1), posicionar a membrana com a superfície rugosa para baixo, sobre o suporte de um aparato de filtração a vácuo. Para evitar a quebra do filtro adicionar água destilada sobre a mesma; aplicar vácuo ao sistema de filtração; com auxílio de um Bécker coletar a amostra para análise mantendo sob constante agitação (*STANDARD METHODS*, 2012).

No caso de amostras semi-sólidas, como por exemplo, lodo ativado, poderá ser utilizado uma pipeta de descarga rápida para a transferência da amostra. Transfere-se um volume de amostra conhecido sobre o filtro e filtra-se a amostra a vácuo até que toda a fração líquida tenha passado para o kitassato. Após, Colocar o conjunto na estufa e manter a 103° - 105°C até peso constante, normalmente, após 4 horas. Deve-se então transferir o conjunto para dessecador, e aplicar vácuo e aguardar resfriamento até temperatura ambiente (aproximadamente 45 minutos), então pesa-se o conjunto, denominado P2. Após, o conjunto é colocado em uma mufla à 550°C durante duas horas, retira-se o conjunto da mufla e transfere-se para o dessecador, até a amostra ter resfriado à temperatura ambiente (aproximadamente 4 horas), e pesa-se a cápsula, denominado de P3. (*STANDARD METHODS*, 2012).

Para então calcular a quantidade de sólidos suspenso voláteis em uma amostra líquida utiliza-se a equação 7.

$$ST = \frac{(P2 - P1) \times 1000000}{\text{volume da amostra}} \quad (7)$$

4.1.4. Unidade Experimental

Os experimentos foram realizados em um fermentador de bancada da marca New BrunswickBioFlo/CelliGen 115 *Fermentor* (Figura 5) com capacidade para 7,5 L, sendo que o volume utilizado para a fase líquida foi 5 L para que o restante fosse para o *headspace*. Por padrão, em todos os testes houve leitura de pH e ORP (potencial de oxirredução), controle de temperatura e frequência de agitação. A temperatura e a agitação foram ajustadas em 37 °C e 80 rpm, respectivamente, para todos os experimentos.

Figura 5: Imagem do reator



O autor (2016)

4.1.5. Análises Cromatográficas

Para determinar a composição do biogás formado foi utilizado um cromatógrafo a gás (Dani Master GC), dotado de detector de condutividade térmica (TCD) e coluna capilar Carboxen TM 1006 PLOT. As condições de operação do cromatógrafo foram as seguintes: temperatura do injetor, 100°C; temperatura do detector, 230°C; temperatura da coluna, 40°C. Para realizar o arraste do biogás, utilizou-se gás nitrogênio em um fluxo de 6 mL.min⁻¹. O volume de amostra injetada foi de 0,25 µL.

A análise de subprodutos em fase líquida foi realizada por cromatografia gasosa considerando a formação dos seguintes ácidos voláteis: acético, propiônico, isobutírico, butírico, isovalérico, valérico e láctico. O cromatógrafo utilizado foi um Shimadzu GC 2010 *plus* com coluna FID DANI DN-FFAP 11448.

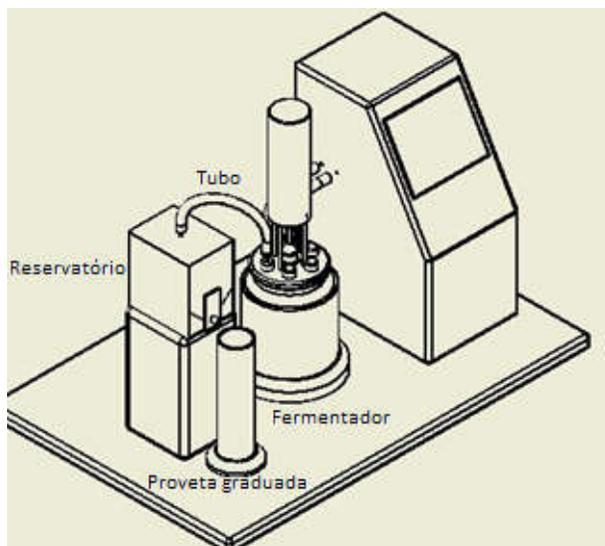
As condições de operação do cromatógrafo foram as seguintes: temperatura do injetor, 200°C; temperatura do detector, 250°C; temperatura da coluna, 100°C. Para realizar o arraste do biogás utilizou-se gás nitrogênio em um fluxo de 3 mL.min⁻¹. O volume de amostra injetada foi de 0,25 µL.

4.1.6. Medição do volume de gás gerado

Para a medição do volume de gás gerado, foi utilizada uma adaptação da lei de Boyle-Mariotte. O gás produzido no reator foi conduzido até um reservatório de água por uma tubulação. No reservatório a água foi alcalinizada a pH 12, utilizando hidróxido de sódio 6 mols.L⁻¹ para que todo o dióxido de carbono (CO₂) fosse solubilizado e que só fosse possível quantificar a produção de hidrogênio.

O volume de gás produzido dentro do reator, então, passava pela coluna de água, ia ao *headspace*, e desloca a mesma quantidade de água para dentro de uma proveta graduada, onde era feita a verificação do volume. Esse sistema é representado na Figura 6.

Figura 6: Ilustração do sistema de medição de gás.



Fonte: O autor (2016)

4.1.7. Ensaio de atividade metanogênica específica (AME)

Os ensaios de AME foram realizados utilizando metodologia adaptada de MONTEGGIA (1991). É importante salientar que, nessa etapa, os microrganismos não passaram por qualquer processo de inativação. O teste AME seguiu as etapas: Primeiramente ocorreu a determinação de sólidos suspensos voláteis (SSV) do lodo antes de iniciar os testes.

Após, ocorreu ajuste da concentração de SSV a fim de obter-se uma faixa de concentração entre 2,0 e 4,0 gSSV/L. Após, ocorreu a adição de solução nutriente nos reatores, substituição do ar atmosférico contido no *headspace* do reator por nitrogênio utilizando *stripping*. O consórcio microbiano foi ambientado às condições do experimento por um período de 24h.

Após efetuada a aclimatização, ocorreu a alimentação dos reatores com o substrato (acetato de sódio 10%) através do septo de borracha, obtendo-se uma concentração de DQO de 2 g/L, e dando-se início ao teste. Imediatamente após a adição de substrato e periodicamente até o fim do experimento, houve coleta de amostras do biogás gerado.

Para calcular a atividade metanogênica utilizou-se o método da maior tangente (BEAL, 2004). Para isso, modela-se a curva de produção de metano, aplicando uma função polinomial mais adequada. A partir da derivada desta função obtém-se os valores dos pontos tangentes à curva polinomial obtida e o maior valor da tangente foi utilizado. Este valor foi dividido pela concentração de SVT contida no digestor. O cálculo da atividade metanogênica pode ser equacionado pela seguinte equação:

$$AME = Ame = \frac{\Delta P_{met}}{\Delta t \times SSV} \quad (8)$$

Onde:

AME: atividade metanogênica específica (mL CH₄/mg SSV/h),

ΔP_{met}: produção acumulada de CH₄ (mL),

Δt : intervalo de tempo (h),

SSV: sólidos voláteis totais (mg/L)

4.1.8. Ensaios de atividade hidrogênica específica (AHE)

A metodologia de cálculo da AHE foi adaptada daquela proposta por BEAL e MONTEGGIA (2009) para o cálculo da AME, e utilizada nos estudos de TREVISAN (2010). A metodologia utiliza o método da máxima tangente, e sequência de atividades é seguinte: análise da composição do gás gerado via cromatografia gasosa; construção da curva que representa a composição percentual de hidrogênio em função do tempo; modelagem da curva obtida; cálculo do volume produzido de H₂; construção do gráfico de produção acumulada de H₂ em função do tempo; modelagem da curva obtida através de polinômios; derivação da equação que melhor representou a curva obtida, no período de tempo do teste; cálculo das inclinações das tangentes da curva utilizando adequação derivada obtida no item anterior;

identificação do maior volume de H₂ produzido por hora, correspondente ao maior valor da inclinação das tangentes obtidas; determinação da AHE, expressa em mLH₂/gSVT, através da razão entre o valor encontrado no item anterior e a concentração de biomassa inserida no digestor.

4.1.9. Isolamento e identificação dos microrganismos em placas de Petri

O isolamento dos microrganismos produtores de hidrogênio foi feito por estriamento direto em placa de Petri contendo meio de cultivo PYG sólido, conforme Tabela 1. O meio de cultivo foi esterilizado em autoclave (121°C, 1 atm por 15 min). Após o estriamento, as placas de Petri foram colocadas em jarras de anaerobiose e incubadas a 37°C em estufa até a observação do aparecimento das colônias.

Tabela 1: Meio de cultivo PYG (Peptona, extrato de levedura, glicose para isolamento dos microrganismos).

Composto	Concentração (g/L)
Glicose	10
Extrato de Carne	5
Extrato de Levedura	5
Peptona de carne	5
Ágar (meio sólido)	15

4.1.10. Isolamento em *roll-tube*

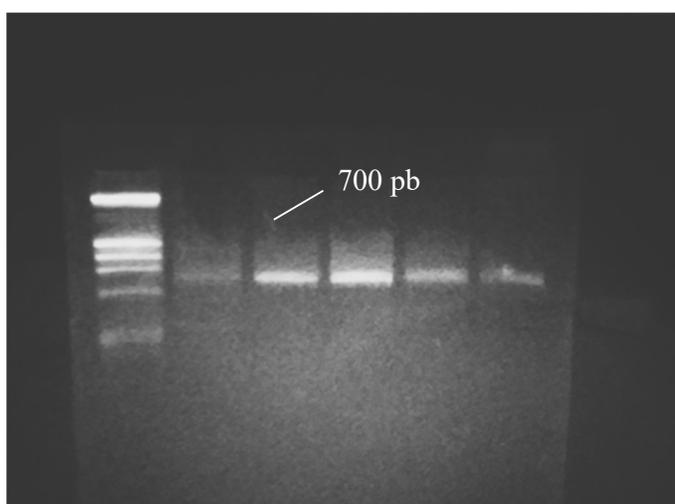
Para o isolamento dos anaeróbios estritos, também foi realizada a técnica de *roll-tube* (Hungate e Macy, 1973). Um volume de 3,0 mL do meio PYG foi distribuído em frascos de vidro de 20 mL sob fluxo de gás N₂. Os frascos contendo o meio de cultura foram esterilizados em autoclave (1 atm por 15 min). Antes da inoculação, os frascos foram colocados em banho-maria (100°C), até a liquefação do meio líquido.

Quando a temperatura do meio atingiu 45°C, foi realizada a inoculação com 0,1 mL da amostra. Após a inoculação, os frascos foram submersos em recipiente com gelo e mantidos em movimento giratório até que o meio solidificar. Os frascos foram incubados invertidos em estufa a 37°C até o aparecimento de colônias ou bolhas.

4.1.10.1. Extração de ácidos nucleicos

O material genético dos microrganismos isolados foi extraído com o *Kit* de extração Ilustra TM bactéria *genomic Prep Mini-Spin* (GE Healthcare), seguindo o protocolo do fabricante. Após a extração, foi realizada a reação em cadeia de polimerase (PCR) utilizando o *kit Phusion High-FidelityTM PCR* (Finnzymes) utilizando *primers* universais 16S-F e 16S-R, para o Domínio Bactéria 16S rRNA: "16S-F 5' – CCTGGCTCAGGACGAACGCTGG-3' e "16S-R 5'- CTG CGCTCGCTTTACGCCAAT-3. Após o término das reações, foi realizada eletroforese com gel de agarose (0,5%) com GelRed para visualização do amplificado.

Figura 7: Visualização do genoma amplificado microrganismos isolados.



Fonte: O autor (2016)

Os produtos do PCR foram purificados e seguiram para o sequenciamento genético e as sequências nucleotídicas obtidas foram alinhadas e identificadas (*Blast*) a nível de gênero e espécie através do GenBank.

4.2. Ensaio Experimentais

Neste item é apresentada a metodologia específica para os testes com diferentes substratos

4.2.1. Produção de H₂ a partir de Glicose

Com base na literatura, utilizaram-se 25 g de glicose PA em 5 L de reator. Diluiu-se a glicose em uma solução com 5 L de água, e foram adicionados 10g/L de lodo seco inativado. A temperatura foi controlada em 37°C e frequência em 80 RPM, enquanto foram monitorados pH e a produção de hidrogênio. A atividade hidrogênica (AH) foi calculada segundo o método da máxima tangente.

4.2.2. Produção de H₂ a partir de Glicerol

Foram utilizados 10 g de glicerol bruto por litro de reator e o volume foi completado com uma solução de nutrientes para suplementar as necessidades dos microrganismos, conforme Tabela 3. Esta concentração foi estabelecida com base na literatura, visto que a melhor faixa de concentração para produção de hidrogênio utilizando glicerol abrange valores de 2 a 30 g/L. Após testes preliminares foi estabelecido o valor de 10 g/L de glicerol bruto, juntamente com 5g/L de biomassa. As características do glicerol bruto estão evidenciadas na Tabela 4. A atividade hidrogênica (AH) foi calculada segundo o método da máxima tangente.

4.2.2.1. Soluções de Nutrientes

Como o glicerol possui alta carga orgânica, porém é deficiente em alguns macro e micronutrientes, o meio foi suplementado por solução de nutrientes, sendo que para os testes de AHE e AME, essas soluções foram distintas. Nas Tabelas 2 e 3 estão especificadas as concentrações das substâncias para cada solução nutriente utilizada, baseada em (TREVISAM, 2010).

Tabela 2: Solução de nutrientes para o teste de AME

Reagente	KH ₂ PO ₄	K ₂ HPO ₄	NH ₄ Cl	Na ₂ S.7H ₂ O	Extrato de Levedura
Concentração	1,5 g/L	1,5 g/L	0,5 g/L	0,05 g/L	0,2 g/L

Fonte: BEAL (2004)

Tabela 3: solução de nutrientes para o teste de AHE

Nutrientes	Concentração (mg/L)
MgCl ₂ .6H ₂ O	40
CaCl ₂ .2H ₂ O	1.000
NH ₄ Cl	50
ZnCl ₂	2,5
MnSO ₄ .4H ₂ O	3,8
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	10
CuSO ₃ . 5H ₂ O	5
KCl	130
MgCl ₂ .6H ₂ O	40
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	2.550
NiCl ₂ .6H ₂ O	2,5
KI	12,5
NaCl	1.000
FeSO ₄ .7H ₂ O	1
CoCl ₂ .6H ₂ O	2,5

Fonte: TREVISAN (2010)

4.2.3. Produção de H₂ a partir de vinhoto

Em todos os experimentos foram utilizados 5 L de vinhoto obtido de uma indústria sucroalcooleira, com temperatura controlada de 37°C, e foi adicionado 10 g/L de SSV. Os experimentos foram realizados em pH 4,5, 5,5, 6,0 e 6,5. Nestes casos, foram avaliados a produção de hidrogênio, o tempo de fase *lag* e produção de ácidos gerados no processo. A atividade hidrogênica (AH) foi calculada segundo o método da máxima tangente.

4.2.4. Produção de H₂ a partir de mistura de substrato

Os experimentos ocorreram no reator New Brunswick™ BioFlo®/CelliGen® 115, conforme descrito no item 4.1.3 com todos os passos de pré tratamento conduzidos segundo o item 4.1.2. O volume útil utilizado foi de 5 litros, e foi adicionado 10 g/L de biomassa. Não foi encontrada em literatura nenhum estudo sobre a mistura de glicerol e vinhoto, então houve mistura fracionada de ambos para avaliar a concentração final do substrato, conforme Tabela 4. A atividade hidrogênica (AH) foi calculada segundo o método da máxima tangente.

Tabela 4: Parâmetros de glicerol e vinhoto utilizados.

Parâmetros	Glicerol	Vinhoto
Cálcio Total (mg L ⁻¹)	112,5	316,3
Demanda Química de Oxigênio (mg O ₂ L ⁻¹)	868.840	21.480
Ferro Total (mg L ⁻¹)	0,868	4,926
Magnésio Total (mg L ⁻¹)	2.946	430,4
NTK (mg L ⁻¹)	66,41	394,7
Fósforo (mg L ⁻¹)	-	58,8
pH	5,51	4,10
Potássio (mg L ⁻¹)	7,12	2.713,8
Sódio (mg L ⁻¹)	24.854	26.883
Sólidos Suspenso Voláteis (mg L ⁻¹)	2.901	2.431
Sólidos Suspensos Fixos (mg L ⁻¹)	222	1.006

Para essa etapa, os testes foram realizados fixando a carga orgânica volumétrica, o pH e a quantidade de biomassa, logo a relação A/M no início do experimento. A razão entre glicerol, vinhoto e água foi variada, e é apresentada na Tabela 5. O pH foi fixado em 6,0 para todos experimentos, assim como a quantidade de microrganismos que foi fixada em 10 g.L⁻¹ de SSV. A carga orgânica volumétrica foi fixada em 20 kg DQO.m⁻³ pois segundo HAN et al (2016), altas concentrações de DQO tem demonstrado maior produção de hidrogênio, porém se muito altas, podem levar à inibição da produção.

Tabela 5: Composição inicial do meio nos quatro experimentos

Razão Vinhoto /Glicerol	80%/20%	60%/40%	40%/60%	20%/80%
Sólidos Suspenso Voláteis (g.L⁻¹)	10,00	10,00	10,00	10,00
DQO Vinhoto (g O₂/ L⁻¹)	20,48	20,48	20,48	20,48
DQO Glicerol (g O₂/ L⁻¹)	868,84	868,84	868,84	868,84
Concentração DQO (kg DQO.m⁻³)	20,00	20,00	20,00	20,00
Volume V (mL)	3.905,9	2.929,4	1.952,9	976,5
Volume G (mL)	23,0	46,1	69,05	92,05
Volume H₂O (mL)	1.071	2.024	2.978	3.931

Obs: vinhoto (V) e glicerol (G)

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados para cada substrato são discutidos a seguir. A glicose foi utilizada uma vez como substrato padrão para avaliar a atividade hidrogênica da biomassa e comparar com os resultados posteriores.

5.1. Experimento com glicose

O experimento com glicose foi desenvolvido conforme o item 4.2.1. e produziu 10.290 mL de gás hidrogênio ao longo de 30 horas de experimento. Na Figura 9a, pode-se observar o comportamento da produção de H₂ ao longo do período de ensaio. O cálculo da atividade hidrogênica (AH) ocorreu conforme item 4.1.7. da metodologia, e possibilitou obter a taxa máxima de hidrogênio e a AH, as quais respectivamente resultaram em 1.011,36 mLH₂/h e 0,80 mmol H₂/gSSV.h .

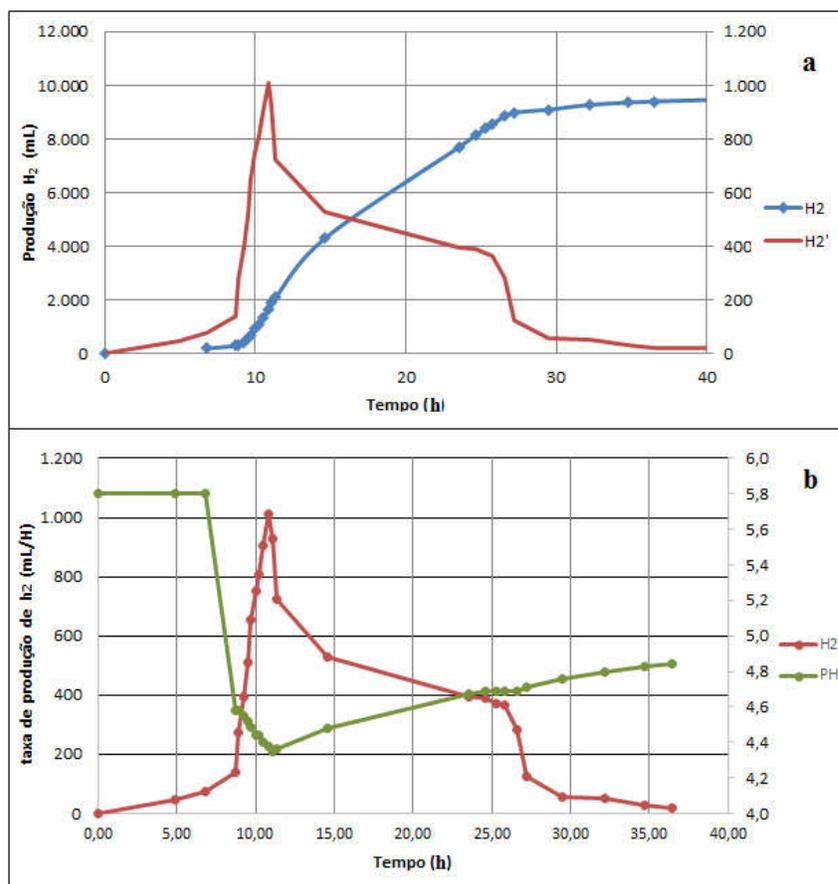
Pode-se notar na Figura 8a, que foram necessárias 5 horas para o início da produção, o que se deve, possivelmente, ao fato dos microrganismos necessitarem deste período para eclodir do estado de esporo. Já o período de produção ocorreu aproximadamente em torno de 9 horas de experimento até 27 horas, compreendendo 16 horas. A produção de hidrogênio foi concluída em 36 horas e 30 minutos. Posto que a fase exponencial teve fim às 27 horas, o restante do tempo de experimento foi apenas para confirmar se realmente não haveria mais produção.

No mesmo gráfico, é visto que o ponto em que existe a maior taxa de produção de hidrogênio (maior ponto da derivada – H₂'), converge ao mesmo ponto de maior atividade na fase exponencial, em torno de 18 horas de experimento e pH 4,38.

Pode-se notar na Figura 8b, a relação direta entre a redução do pH e a taxa de produção de hidrogênio, quando há a maior formação de ácidos orgânicos voláteis, ocorre a maior produção de hidrogênio. Também pode-se perceber que não houve alteração do pH até as 8 horas de experimento, o que pode indicar que a produção de ácidos e a de H₂ não foi significativa.

Esse comportamento de aumento de pH indica uma redução da concentração de ácidos, ou seja, são transformados possivelmente em H₂ pela rota acetogênica. Os experimentos realizados com glicose, indicam que a cultura mista de bactérias é capaz de produzir apenas hidrogênio e gás carbônico, sem a produção de metano, após o tratamento térmico, sendo então adequada para os testes com glicerol e vinhoto.

Figura 8: (a) Produção acumulada de hidrogênio e taxa de produção (H_2') ao longo do tempo. (b) Taxa de produção de hidrogênio e pH em função do tempo

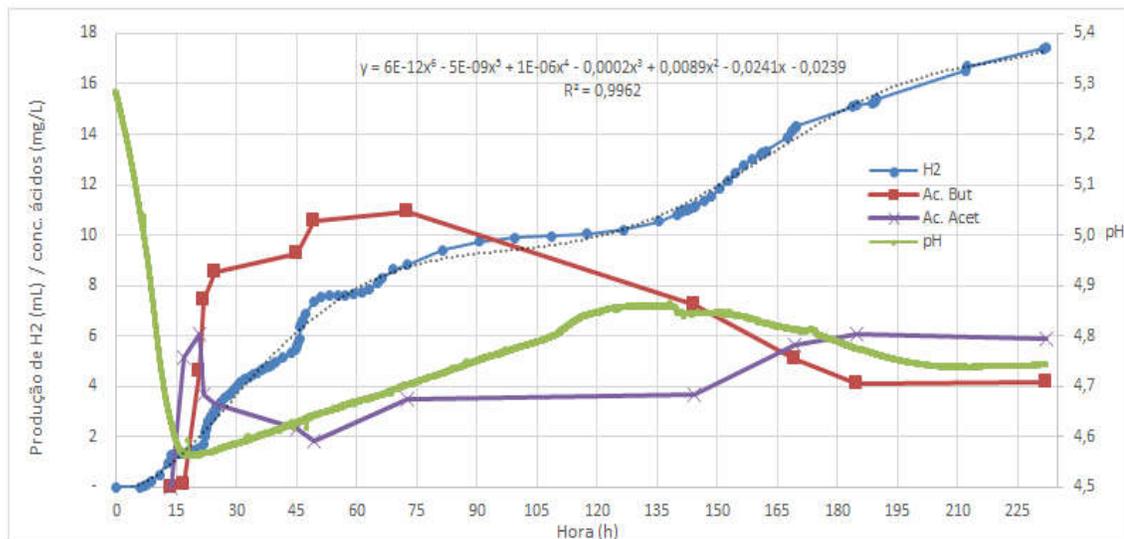


5.2. Experimentos com Glicerol

O experimento com glicerol foi desenvolvido conforme o item 4.2.2. A produção acumulada de gás hidrogênio no experimento com glicerol bruto resultou em 18.360 mL, como pode ser visto na Figura 10. Pode-se identificar que a curva de produção tem comportamento similar ao diáuxico, ou seja, há um segundo incremento de produção.

Pode-se argumentar que a degradação do glicerol por digestão anaeróbia gera subprodutos que também podem ser utilizados como substrato para a produção de hidrogênio. Nota-se que o menor valor de pH foi obtido no mesmo tempo da primeira fase de produção, em pH 4,56 e 15 horas de experimento, e que a segunda curva ocorre quando o pH volta a diminuir, conforme Figura 9. Analisando o perfil da produção de hidrogênio em relação à produção de ácido butírico e acético, é possível inferir que uma vez que o glicerol é praticamente todo consumido e metabolizado, os microrganismos podem utilizar o ácido butírico sozinho ou com outro subproduto em conjunto como um substrato secundário, produzindo ácido acético.

Figura 9: Produção de hidrogênio e pH em função do tempo

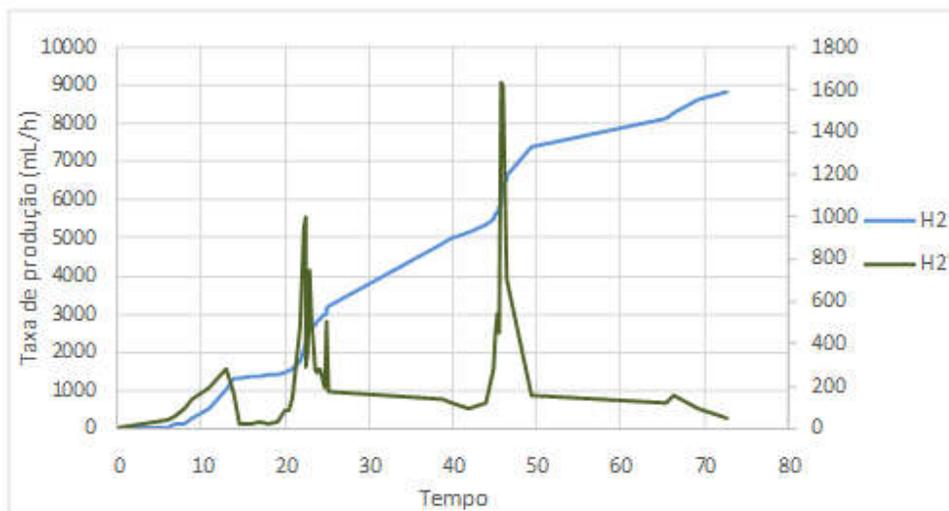


O cálculo da atividade hidrogênica foi realizado segundo método da máxima tangente, e a AH obtida neste experimento foi 2,58 mmol H₂/gSSV.h, ocorrida ao final da segunda fase de produção. Tal comportamento pode ser notado na Figura 10.

Nesse caso, a concentração inicial de glicerol não foi um fator limite para a quantidade de hidrogênio produzida e não houve inibição no processo estudado. A relação A/M inicial desse estudo foi igual a 1,06 gDQO/gSSV.

Isso também demonstra que o ácido butírico pode ser consumido para a produção de hidrogênio na rota acidogênica. A AH e o rendimento encontrados no experimento, corresponde a 2,58 mmol H₂/gSSV.h, e 2,5 mmolH₂/mol de glicerol.

Figura 10: Produção de hidrogênio e taxa de produção em função do tempo.



Pode-se comparar esses resultados com os experimentos de TREVISAN (2010), que obteve AH de 0,42 mmolH₂/gSSV.h utilizando um respirômetro de bancada. SEIFERT et al (2009) obteve rendimento máximo de 0,41 mol H₂/mol glicerol com reatores em escala de bancada com 600 mL de volume, sendo que também foi aplicado tratamento térmico para inativar as arqueas metanogênicas.

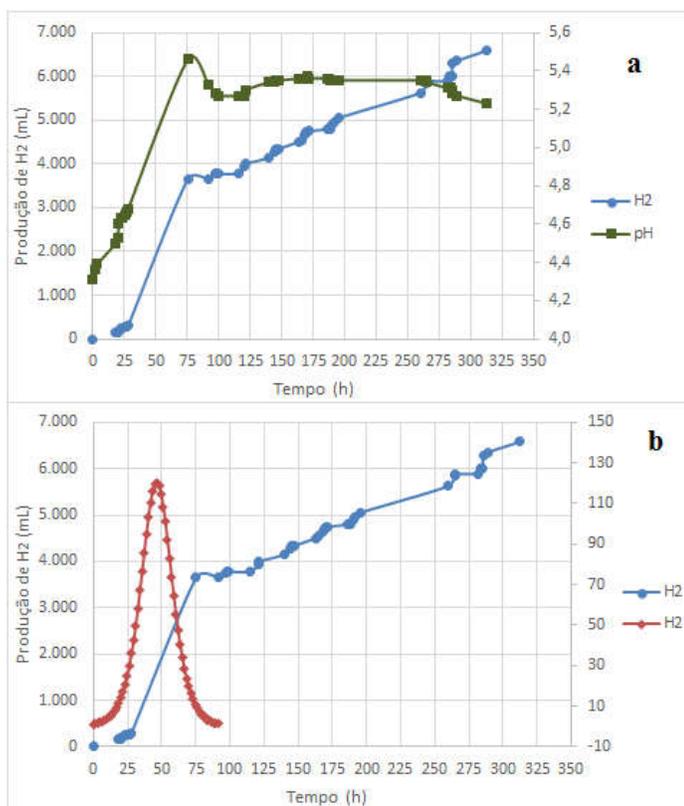
5.3. Experimentos com vinhoto

Nesse item são apresentados os resultados obtidos nos experimentos, comparando como os diferentes valores de pH alteram a produção de hidrogênio.

5.3.1. Produção de H₂ utilizando vinhoto com pH inicial de 4,5

Existem alguns aspectos a serem notados quanto a produção de hidrogênio realizando a digestão anaeróbia do vinhoto como substrato. Devem-se destacar a redução do tempo necessário para o início da produção, que foi de 20 horas, o aumento do pH para o início da produção de hidrogênio e o maior tempo até a estabilização e parada de produção de gás, como pode ser visto na Figura 11a.

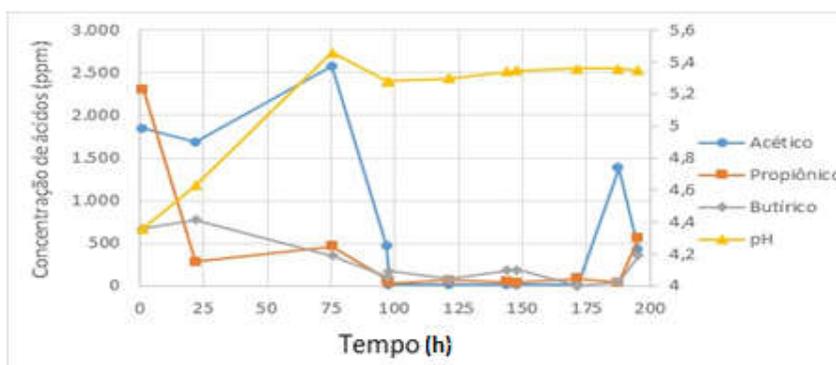
Figura 11: (a) Produção de hidrogênio e comportamento do pH em função do tempo. (b) Produção de H₂ e taxa de produção ao longo do tempo.



A produção total acumulada alcançada neste experimento foi 6.585 mL, em 310 horas, e a atividade hidrogênica resultou em 0,095 mmol H₂/gSSV.h. Como esperado, a maior taxa de produção foi observada durante a fase exponencial conforme Figura 11a. Pode-se notar que as curvas de produção de hidrogênio e de pH tem comportamentos semelhantes. Uma possível explicação para esse comportamento é que o vinhoto, em sua forma bruta, contém ácidos orgânicos e seu consumo no início do experimento explicaria a produção do gás e o aumento do pH.

Pode-se notar que existe consumo relativamente à produção de ácido butírico e propiônico e produção de ácido acético no início do experimento. Porém, após 75 horas todo o ácido acético é consumido sem haver nova produção, o que pode justificar redução da produção de hidrogênio, como isto na Figura 12. No tempo da maior atividade hidrogênica também houve maior taxa de produção de ácido acético, o que mostra a clara relação entre os dois fatores.

Figura 12: Produção de Ácidos orgânicos voláteis ao longo do tempo.



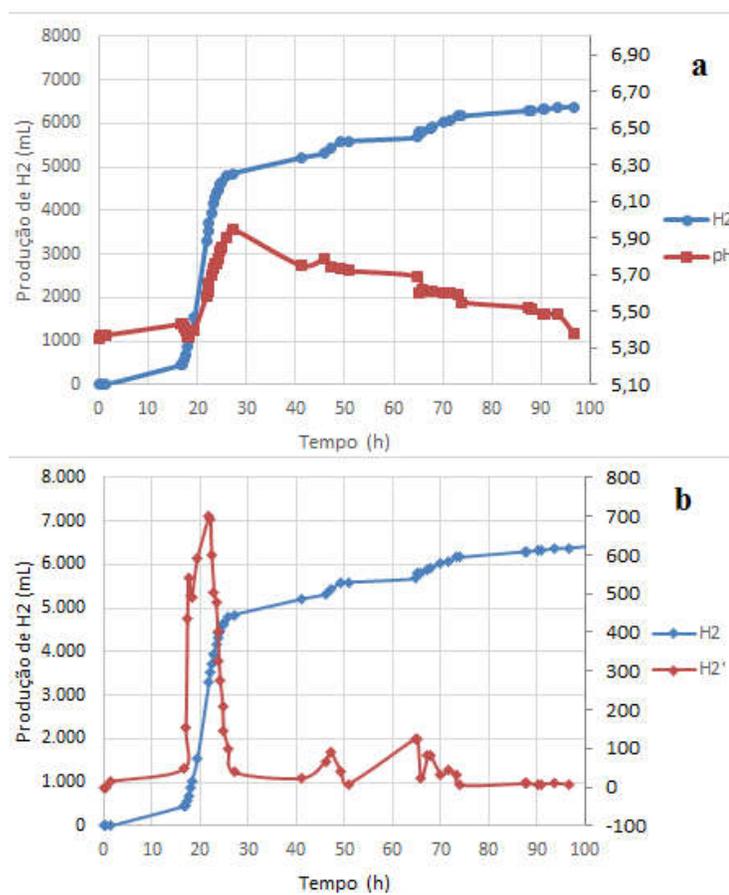
5.3.2. Produção de H₂ utilizando vinhoto com pH inicial de 5,5

No experimento com pH inicial em 5,5 pode-se notar uma pequena redução no tempo de início de produção, para 18 horas, porém a produção de hidrogênio foi maior, de 7.335 mL e mais constante. Também pode-se notar que o tempo para o término da produção de gás foi drasticamente reduzido, quando comparado com o experimento com pH inicial em pH 4,5, de 310 horas para 100 horas. Todos esses aspectos podem ser vistos na Figura 13a.

Quanto ao comportamento do pH ao longo do tempo, observa-se na Figura 13a, que mesmo o pH inicial sendo maior que no experimento pH 4,5, há um aumento do valor deste parâmetro ao longo da fase exponencial.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Figura 13: (a) Produção de hidrogênio e comportamento do pH ao longo do tempo. (b) Produção de H₂ e taxa de produção ao longo do tempo. Colocar gráfico completo

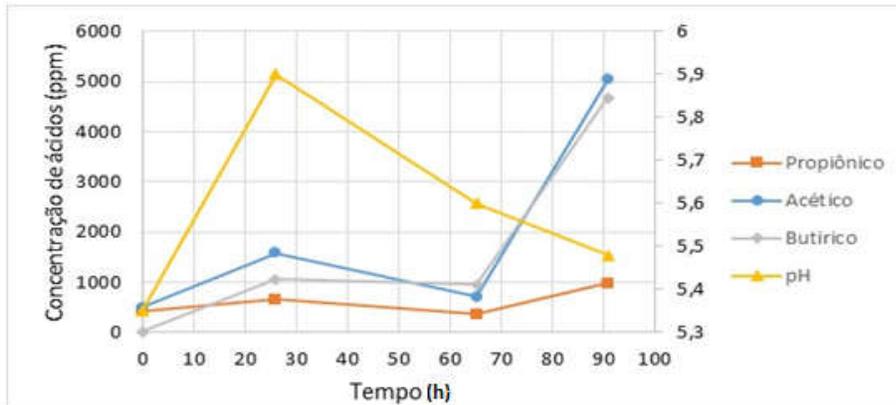


A atividade hidrogênica resultou em 0,55 mmol H₂/gSSV.h, 5,8 vezes maior que a atividade registrada no experimento com pH inicial em 4,5. Assim como esperado a maior taxa de produção foi observada durante a fase de produção conforme Figura 13b.

É possível notar na Figura 14 que neste experimento o comportamento da curva de pH e produção de ácidos orgânicos é muito similar até 50 horas. Um comportamento similar também foi observado em relação a produção de hidrogênio.

Quando há aumento da produção de ácidos, há aumento na produção de hidrogênio, conforme Figuras 13a e 14. Também é possível notar que ao final do experimento ocorreu um aumento na produção de ácidos, porém a produção de hidrogênio começou a cessar, o que pode evidenciar talvez a pressão parcial de hidrogênio pode estar em valor elevado suficiente para inibir a produção de H₂. Também pode-se notar que após 70 horas, não há mais produção significativa de hidrogênio

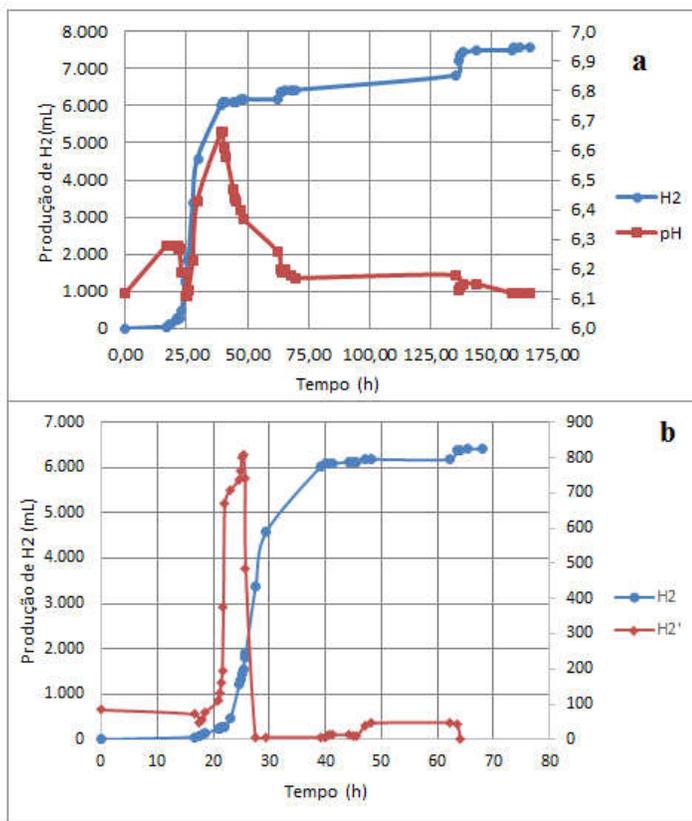
Figura 14: Produção de Ácidos orgânicos voláteis ao longo do tempo



5.3.3. Produção de H₂ utilizando vinhoto com pH inicial de 6,0

No experimento com pH inicial em 6, pode-se notar uma sensível redução do tempo de início de produção, para 16 horas, com produção de hidrogênio superior comparando ao resultado do experimento com pH inicial 5,5. A produção acumulada total neste experimento foi 7.585 mL. A curva de produção de hidrogênio pode ser vista na Figura 15a.

Figura 15: (a) Produção de hidrogênio e comportamento do pH ao longo do tempo. (b) Produção de H₂ e taxa de produção ao longo do tempo.

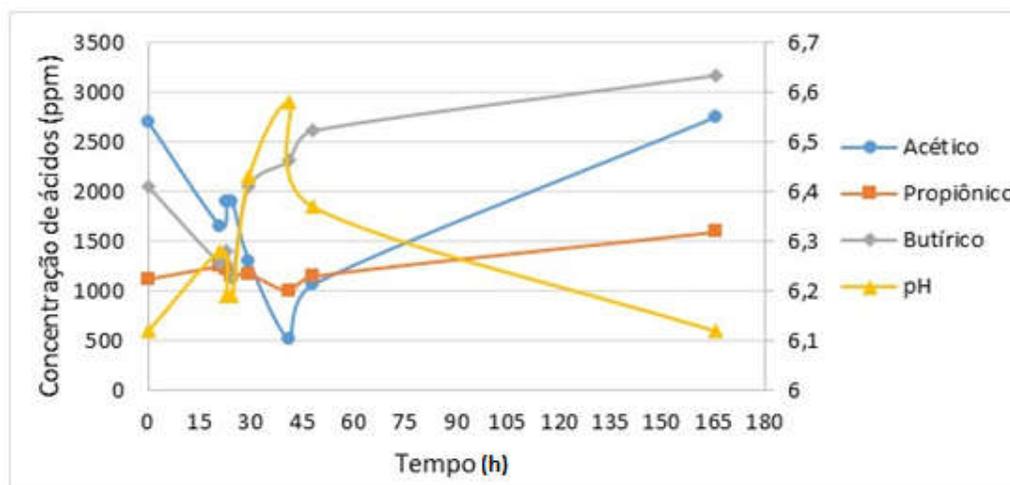


O comportamento do pH durante o experimento oscilou, provavelmente pela hidrólise de compostos do vinhoto, porém pode-se notar a redução do valor do pH durante o início da produção de hidrogênio. É interessante notar que o menor valor de pH é obtido em tempo similar ao de maiores produções s, de 28,5 horas. O comportamento do pH pode ser visto na Figura 15a.

A atividade hidrogênica resultou em 0,65 mmol H₂/gSSV.h, valor 18,2% superior ao experimento com pH inicial 5,5, isso devido a uma maior taxa de produção durante a fase exponencial de produção de gás, conforme pode ser observado na Figura 15b.

Na Figura 16, pode-se verificar a influência da produção e consumo de ácidos no início do experimento no comportamento do pH e produção de hidrogênio. Pode-se notar que quando há aumento na produção de H₂ também há uma drástica redução de ácido acético e produção de ácido butírico, o que evidencia a rota metabólica utilizada.

Figura 16: Produção de ácidos orgânicos voláteis ao longo do tempo.



5.3.4. Produção de H₂ utilizando vinhoto com pH inicial pH 6,5

No experimento com pH inicial em 6,5 pode-se notar uma grande redução do tempo de início da produção, comparando com os experimentos anteriores. Neste caso, essa etapa durou 10 horas, como pode ser visto na Figura 17a, porém a produção acumulada de hidrogênio total foi um pouco menor que com pH inicial 6,0, totalizando 7.355 mL.

Pode-se notar que o ganho volumétrico após o término da fase de produção foi pequeno, e o tempo necessário para que houvesse o término da produção de gás foi maior que nos experimentos com pH inicial 5,5, e 6,0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

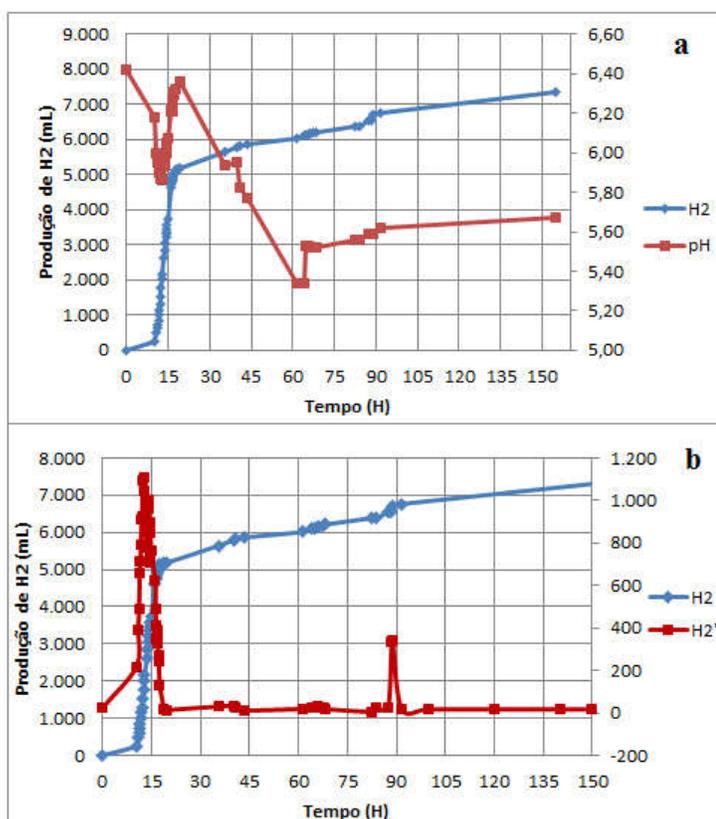
O comportamento do pH durante o experimento foi diferente em relação a todos os outros experimentos conduzidos com vinhoto, visto que houve redução do pH desde a inoculação da biomassa.

Como pode ser observado na Figura 17a, a redução do pH ocorre até que seu menor valor seja alcançado, fato que coincide com a maior taxa de produção de hidrogênio em 12 horas. É interessante que após esse valor, há aumento de pH até o final da fase exponencial e após, tem novamente comportamento decrescente.

A atividade hidrogênica resultou em 0,88 mmol H₂/gSSV.h, valor 35,4% maior do que o observado no experimento com pH inicial de 6,0, conforme pode ser observado na Figura 17b. Esse valor também é 9,26 vezes maior do que a AH obtida no experimento com pH 4,5.

Nesse experimento o comportamento inicial do pH e da produção de ácidos são muito similares, ambos têm redução quando há o início da fase exponencial de produção de hidrogênio.

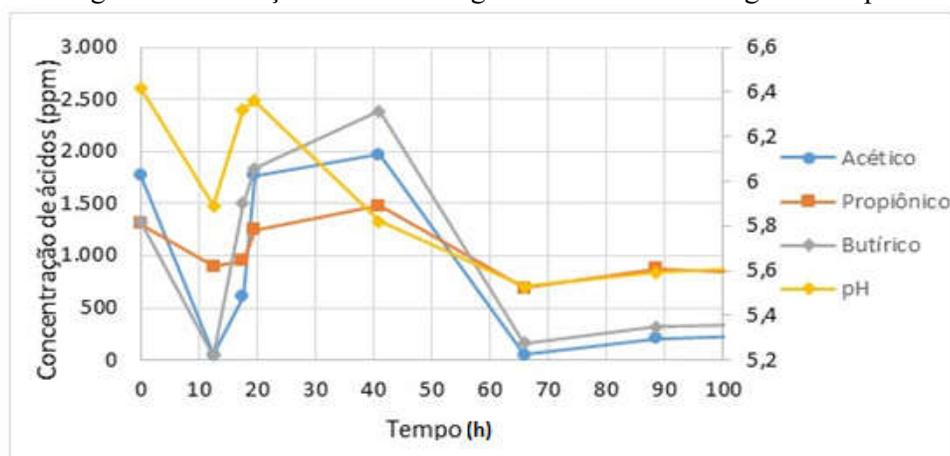
Figura 17: (a) Produção de hidrogênio e comportamento do pH ao longo do tempo. (b) Produção de H₂ e taxa de produção ao longo do tempo.



5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Mais interessante é notar que neste estudo, diferentemente do experimento com pH 6,0, ambos ácidos acéticos e butírico tem redução de sua concentração em conjunto, o que pode explicar a maior atividade de hidrogênio (AHE) em relação ao experimento anterior, o que pode ser visto na Figura 18.

Figura 18: Produção de Ácidos orgânicos voláteis ao longo do tempo.



5.3.5. Balanço de DQO

O balanço de DQO representa a quantidade de H_2 produzido por uma quantidade de matéria orgânica incorporada pelos microrganismos. A Tabela 6 mostra a relação do balanço de DQO para todos os experimentos realizados.

Tabela 6: Balanço de DQO

pH	4,5	5,5	6,0	6,5
DQO inicial (mg O_2/L)	23.249	19.373	22.035	18.136
Eficiência de remoção de DQO (%)	9	10	5	12
Produção de H_2 (mL)	6.585	7.335	7.585	6.765
DQO Removida (mg O_2/L)	2.096,22	1.937,30	1.101,75	2.179,95
Conversão (mL $H_2/$ mg DQO)	3,14	3,79	6,88	3,10

É possível notar que o experimento com maior produção acumulada de H_2 , pH 6,0, também possui a melhor relação entre produção de gás e consumo de DQO, porém não possui a maior taxa de produção. Também deve-se notar que a baixa c de DQO é esperada, visto que os processos de produção de hidrogênio tem como característica a transformação de produtos, removendo geralmente de 10% à 20% da carga orgânica.

5.3.6. Análise comparativa de produção de H₂ em diferentes concentrações de pH inicial

No caso dos experimentos com vinhoto, a Tabela 7 resume os resultados dos testes apresentados. Nela, pode-se observar que os melhores resultados foram obtidos nos experimentos com pH 6,0 e 6,5. Cabe ressaltar que no experimento com pH 6,0 houve uma produção total maior de que os outros experimentos, enquanto no experimento com pH 6,5, houve maior taxa de produção de hidrogênio, maior AHE e menor tempo de produção de H₂.

Tabela 7: Resumo dos experimentos

	pH 4,5	pH 5,5	pH 6,0	pH 6,5
Lag fase (h)	20	18	16	10
Tempo de experimento (h)	310	190	165	160
AHE (mmol H ₂ /gSSV.h)	0,095	0,55	0,65	0,88
Produção total (mL H ₂)	6.585	7.335	7.585	6.765
Duração da fase exponencial (h)	73,31	29,4	21,79	30,6
Volume de H ₂ produzido na fase exponencial (mL)	3.655	5.310	6.105	5.825
Porcentagem de H ₂ produzido na fase exponencial (%)	55%	72%	80%	86%
Conversão (mL H ₂ / mg DQO)	3,14	3,79	6,88	3,10

Na Tabela 7, pode-se notar que no experimento de pH inicial igual a 4,5 a produção de hidrogênio começa em pH 4,6 - no mesmo tempo que ocorre aumento de produção de ácido acético, o que indica a rota metabólica mais utilizada (equação 3). Ocorre redução de concentração de ácido butírico ao longo do tempo, o que pode ser um indício de consumo para outras reações.

Após 100 horas de experimento, ocorre redução drástica de produção de ácido acético, e redução de hidrogênio. Após, a produção de H₂ continua à menores taxas, provavelmente em vista da rota metabólica utilizada ser a do ácido butírico (equação 4)

Em pH 5,5, no início da produção de H₂, há uma leve redução do pH até 5,4, seguido de aumento, até pH 6,0 ao mesmo tempo em que a taxa de produção de hidrogênio reduz e entra em uma fase quase estacionária. Também é interessante notar em 20 horas, no tempo em que ocorreu a maior AHE, também ocorre o pico de produção de ácido acético e butírico. Após, a concentração de ambos ácidos decresce, assim como a concentração de pH. Existe um último pico de produção de ácidos, porém não é acompanhado pela produção de hidrogênio.

No experimento de pH 6,0, logo no início, há um leve aumento de pH (6,3), porém quando ocorre o início de produção de hidrogênio, o pH começa a diminuir até alcançar seu menor valor 6,2 no mesmo tempo em que ocorre a taxa máxima de produção de hidrogênio, e aumento na concentração de ácido butírico e redução do ácido acético.

Quando a produção de hidrogênio começa a entrar em fase estacionária, ocorre o pico de concentração de ácido butírico e de pH (6,6) e após, ambos começam a reduzir.

Logo no início do experimento de pH 6,5, ocorre redução de pH e ácidos orgânicos até seus menores valores (pH 5,9, e ácidos chegando a zero). Quando há o início de produção de hidrogênio, os valores de ácidos e pH começam a aumentar, sendo que o pH tem seu maior valor no início da fase quase estacionária de produção de hidrogênio. Nota-se que ambos, ácido acético e butírico, aumentam suas concentrações ao mesmo tempo, o que possivelmente significa que existe produção de hidrogênio com as duas vias metabólicas ao mesmo tempo, o que poderia explicar a maior taxa de produção de hidrogênio desse experimento em relação aos outros. Ao final dos experimentos a concentração de ácidos começa a aumentar, porém sem produção de hidrogênio, isso pode ser relacionado com a pressão parcial de hidrogênio no reator, ou inibição dos microrganismos devido a produção de ácidos.

Os resultados se mostram positivos ao que tange a produção de hidrogênio, pois não foi necessário nenhum tipo de suplementação de nutrientes. Porém, os resultados encontrados foram menores do que os apresentados por Fernandes (2010) que obteve 3,08 mmol H₂/ (gSSV.h).

Esse resultado, provavelmente, é superior ao encontrado nesse projeto, pois que foi utilizado uma cultura mista já enriquecida e adaptada de uma fase anterior enquanto neste estudo foi necessário maior tempo para que os microrganismos saíssem da fase de esporos.

5.4. Experimentos com mistura de substrato (Vinhoto e Glicerol)

Nesse item serão apresentados os resultados obtidos nos experimentos nos quais foram avaliadas diversas relações Vinhoto/Glicerol como substrato. Pode-se notar a clara diferença entre as diferentes razões, e como elas afetam a produção de hidrogênio.

5.4.1. Produção de hidrogênio

Os resultados dos testes realizados são mostrados na Figura 19, onde cada relação vinhoto/glicerol em relação a contribuição orgânica é evidenciado no título de cada gráfico. Os resultados para cada experimento são resumidos na Tabela 8.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

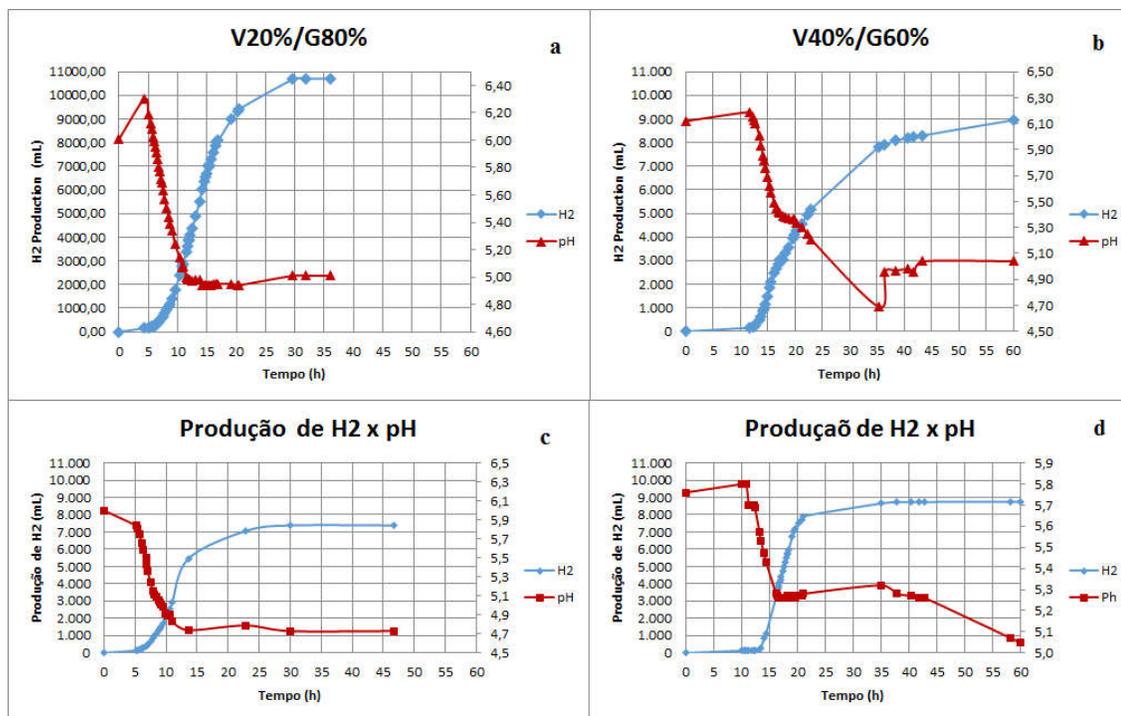
Tabela 8: Resumo dos experimentos.

	80%V – 20%G	60%V – 40%G	40%V – 60%G	20%V – 80%G
Fase Lag (h)	10,13	5	11,4	4,28
Tempo de Experimento (h)	37,87	48,72	60,6	36
AHE (mmol H ₂ /gSSV.h)	1,17	0,77	0,59	0,85
Produção Total (mL H ₂)	8.750	7.380	8.960	10.070
Tempo necessário para obter produção total (h)	37	46	63	36
Volume de H ₂ produzido na fase exponencial (mL)	7.915	6.800	7.900	9.425
Percentagem de H ₂ produzido na fase exponencial (%)	90%	92%	88%	94%

A melhor produção total de H₂ ocorreu utilizando a razão 20%V/80%G, na qual, houve menor fase *lag*, o que se significa que nesse teste o início da produção foi mais rápido.

Como pode ser visto na Figura 19, em todos os gráficos ocorre redução do pH enquanto há aumento na produção cumulativa de H₂. O comportamento da curva de pH, provavelmente seja devido a produção de ácidos orgânicos, que ocorre durante a rota de produção de hidrogênio.

Figura 19: Produção de hidrogênio e comportamento de pH. (A) Relação 80% Vinhoto / 20% Glicerol. (B) 60% Relação Vinhoto / 40% Glicerol. (C) 40% Vinhoto / 60% Glicerol. (D) 20% Relação Vinhoto / 80% Glicerol.



5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Também é importante ressaltar que a maior produção total de H₂ foi 10.070 mL, valor maior do que encontrado em estudos anteriores utilizando apenas vinhoto ou glicerol, como único substrato. Por exemplo, no teste com maior produção utilizando apenas vinhoto ocorreu uma produção de 6.105 mL de H₂, o que significa que com a adição de glicerol, foi obtido um resultado 65% maior, além de redução no tempo de experimento em 120 Horas.

Como o pH, relação A:M inicial, temperatura e concentração orgânica foram os mesmos no início de todos os experimentos, o grau de liberdade principal é a razão entre vinhoto e glicerol, e conseqüentemente a razão C:N:P. Assim, é possível inferir que a mistura dos substratos e suas características resultantes são responsáveis pelas variações de produção de hidrogênio.

Na Tabela 9 estão os resultados da mistura do vinhoto e glicerol, em todas as razões estudadas. O experimento com a razão V20%/G80% resultou em um meio mais balanceado para o crescimento microbiano.

Tabela 9: Substrato resultante da relação vinhoto/glicerol/água em 5 litros de reator.

	V80%/G20 %	V60%/G40 %	V40%/G60 %	V20%/G80 %
Cálcio Total (mg Ca L ⁻¹)	247,6	186,4	125,1	63,8
DQO (mg O ₂ L ⁻¹)	20.000	20.000	20.000	20.000
Ferro Total (mg Fe L ⁻¹)	3,8	2,9	1,9	1,0
Magnésio Total (mg Mg L ⁻¹)	336,3	252,2	168,2	84,1
NTK (mg L ⁻¹)	308,6	231,9	155,1	78,3
Fósforo (mg L ⁻¹)	45,9	34,5	23,0	11,5
DQO/NTK/P	64,8/6,7/1	86,2/6,7/1	128,9/6,7/1	255,4/6,8/1
C:N:P	163,4/6,7/1,0	217,4/6,7/1,0	26,1/6,7/1,0	652,2/6,8/1,0
Potássio (mg K L ⁻¹)	2.120	1.590	1.060	530
Sódio (mg Na L ⁻¹)	21.115	15.979	10.843	5.708
Sólidos Suspensos Voláteis (mg L ⁻¹)	1.912,39	1.450,99	989,58	528,18
Sólidos Suspenso Fixos (mg L ⁻¹)	786,9	591,4	396,0	200,6

Ainda que a melhor razão entre C:N:P para a produção de biogás seja bem estabelecida como 400:7:1, o mesmo não pode ser aplicado para a produção de H₂. Nos estudos de Lin e Lay (2005), uma maior produção de hidrogênio foi encontrada à medida que a relação C:N e C:P aumentaram, sendo que a melhor relação C:N:P encontrada foi de 100/0,5/0,1. Da mesma forma, a maior relação C:N:P, foi encontrada no substrato misto com relação V20%/G80%, o qual permitiu maior produção de hidrogênio.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

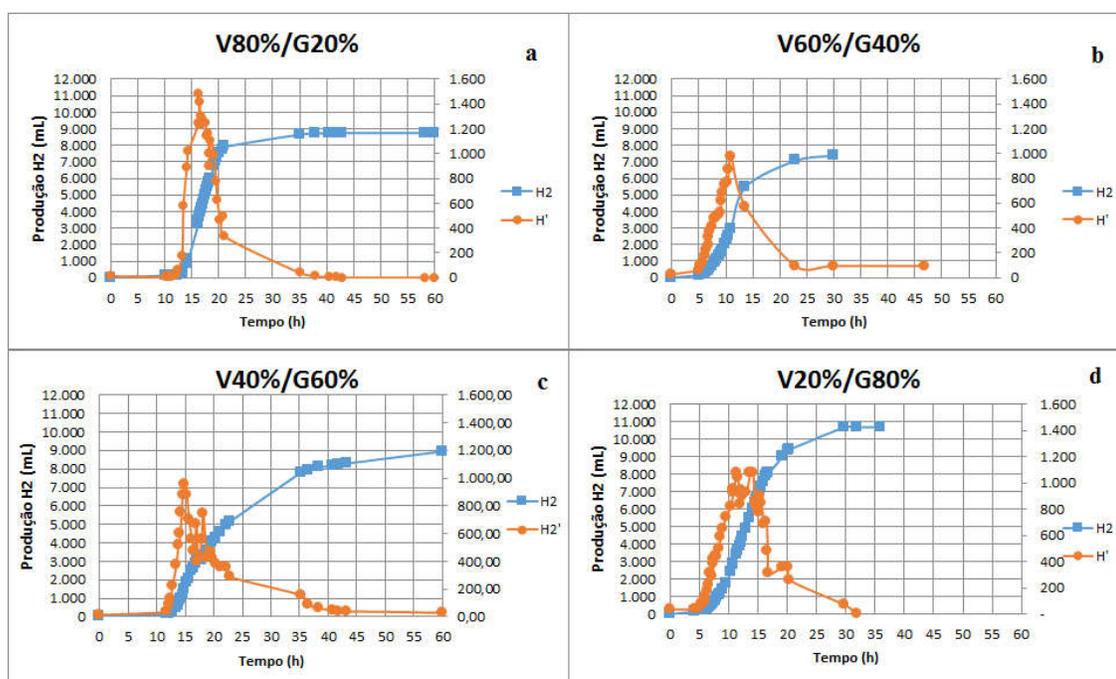
5.4.2. Taxa de produção de hidrogênio

A produção acumulada de hidrogênio (H_2) e a taxa de produção de H_2 (H') são mostradas na Figura 20. A maior atividade hidrogênica foi 1,17 $\text{mmol } H_2/\text{gSSV.h}$, a qual foi medida no experimento com relação vinhoto/glicerol 80%V/20%G.

A maior taxa foi encontrada no experimento de razão 80%V/20%G, visto que o vinhoto possui em sua composição ácidos orgânicos, o que pode explicar uma fase de crescimento rápido após o início da aclimação dos microrganismos.

O teste com relação 20%V/80%G obteve a segunda maior AH, e o menor tempo de início de produção o que pode ser relacionado ao fato de que o glicerol não purificado pode ter alguns nutrientes de rápida absorção na sua composição.

Figura 20: Produção de hidrogênio e taxa de produção de hidrogênio. (A) Relação 80% Vinhoto / 20% Glicerol. (B) 60% Relação Vinhoto / 40% Glicerol. (C) 40% Vinhoto / 60% Glicerol. (D) 20% Relação Vinhoto / 80% Glicerol.



Esse fato explicaria por que mesmo obtendo maior produção acumulada de hidrogênio e menor tempo de início da produção, comparando com outros testes, esse não obteve a maior AH. A AH obtida para a co-digestão é maior que a encontrada nos estudos anteriores com vinhoto puro. Nesses estudos a melhor AH foi 0,88 $\text{mmol } H_2/\text{gSSV.h}$, com menor produção total de H_2 .

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Outro ponto interessante é a interação entre o comportamento da curva de pH e a taxa de produção de H_2 nas figuras 19 e 20. Na Tabela 10, pode se ver a interação entre os dois parâmetros nos quatro experimentos. De acordo com os resultados é possível ver uma tendência para uma maior taxa de produção de hidrogênio próxima ao pH 5. Essa informação pode se importante para estudos em reatores contínuos. Essa maior taxa em pH igual a 5 quando há co-digestão de vinhoto e glicerol destoa dos resultados encontrados apenas para vinhoto, enquanto os melhores resultados em 6 e 6,5.

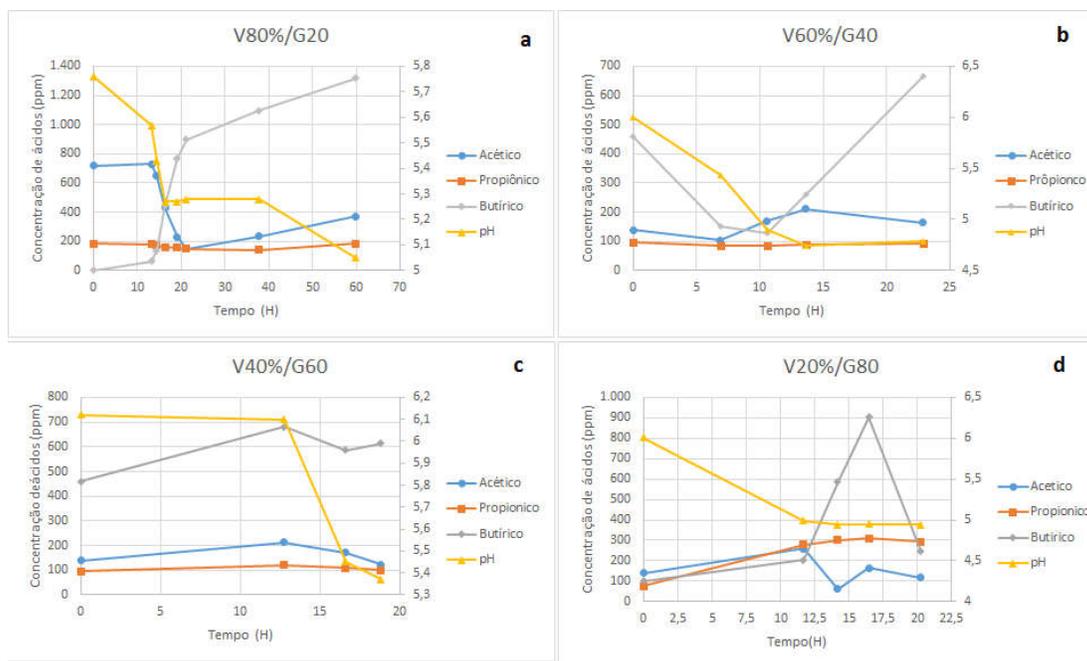
Tabela 10: Maior taxa de produção de hidrogênio x pH

	V80%/G20%	V60%/G40%	V40%/G60%	V20%/G80%
pH	5,27	4,83	5,69	5
Maior taxa de produção de H_2 (mL.h ⁻¹)	1.484,8	973,9	953,4	1.079,5
AH (mmol H_2 /gSSV.h)	1,17	0,77	0,59	0,85

5.4.3. Análise de Ácidos Orgânicos Voláteis

Na Figura 21, pode-se notar que em todos os experimentos existe a redução de pH e ácidos orgânicos voláteis ao mesmo tempo em que há a maior produção e de hidrogênio e taxa de produção de hidrogênio.

Figura 21: Produção de Ácidos orgânicos. (a) Relação 80% Vinhoto / 20% Glicerol. (b) 60% Relação Vinhoto / 40% Glicerol. (c) 40% Vinhoto / 60% Glicerol. (d) 20% Relação Vinhoto / 80% Glicerol.



Na Figura 21d, cujo experimento obteve a melhor produção de hidrogênio, é possível notar que o comportamento do pH é de redução desde o início do teste, que culmina com o comportamento de aumento de concentração dos ácidos ligados a produção de H₂. A maior redução de ácido acético na Figura 21d, relaciona-se com um maior consumo desse ácido devido a rota metabólica utilizada pelos microrganismos.

O experimento com maior porcentagem de DQO advinda do glicerol provavelmente obteve maior produção total de hidrogênio, pois possui maior disponibilidade de carbono no meio.

5.4.4. Balanço de DQO

Na Tabela 11, são apresentados os dados referentes ao balanço de produção de hidrogênio nos quatro experimentos realizados.

É possível notar que o experimento de relação G20%/V80%, o qual teve maior produção acumulada de H₂, também obteve melhor relação entre produção de gás e remoção de DQO no efluente, provavelmente por ter maior disponibilidade de carbono.

Tabela 11: Balanço de DQO

%G/%V	80/20	60/40	40/60	20/80
Eficiência de remoção de DQO (%)	17	13	12	21
Produção de H ₂ (mL)	10.700	8.960	7.830	8.750
DQO Removida (mg O ₂ /L)	2.859,74	3.027,18	2.152,08	3.358,53
Balanço (mL H ₂ / mg DQO)	3,74	2,96	3,64	2,61

5.4.5. Análise global

A Tabela 12 resume os resultados dos testes apresentados. Nela, pode-se observar que os melhores resultados foram obtidos nos experimentos de razão glicerol/vinhoto 20/80 e 80/20, posto que no primeiro ocorreu a melhor AH, e no segundo a maior produção total de hidrogênio.

Cabe ressaltar que no experimento com relação 80%G/V20%, houve menor tempo para o início da produção de H₂, menor tempo total de experimento, maior porcentagem de H₂ produzido na fase exponencial, e melhor conversão de DQO para hidrogênio em relação aos demais experimentos. Pode-se afirmar que essa razão é a melhor para utilização em reatores em batelada, porém em estudos com reatores contínuos será interessante testar a relação 20%G/V80%, devido a maior AH obtida. É curioso notar também que em todos os experimentos a duração da fase exponencial foi em torno de 25 minutos.

Tabela 12: Resumo dos experimentos

%G/%V	80/20	60/40	40/60	20/80
Lag fase (h)	5,98	11,7	5,1	10,1
Tempo de experimento (h)	36	63,2	48,7	160
AH (mmol H ₂ /gSSV.h)	0,85	0,59	0,77	1,17
Produção total (mL H ₂)	10.700	8.960	7.830	8.750
%G/%V	80/20	60/40	40/60	20/80
Duração da fase exponencial (h)	25,2	25,0	24,85	24,9
Volume de H ₂ produzido na fase exponencial (mL)	10.525	7.800	7.240	5.825
Porcentagem de H ₂ produzido na fase exponencial (%)	98,3%	87,1%	92,4%	86%
Conversão (mL H ₂ / mg DQO)	3,74	2,96	3,64	2,61

Analisando os experimentos globalmente, pôde-se notar em todos, redução do valor inicial de pH quando há início de produção de hidrogênio. No momento em que a produção de H₂ cessa, o pH estabiliza e em todos os experimentos o pH final é torno de 5,0.

Em todos os experimentos a AH tem seu maior valor no meio da fase exponencial de produção de hidrogênio. Porém é interessante notar que quanto maior a razão de glicerol em relação ao vinhoto do experimento, nota-se mais um comportamento de duplo pico na curva de AH. Ou seja, quanto mais glicerol na mistura, maior o tempo com alta taxa de produção de hidrogênio o que poderia explicar por que o experimento de razão V20%/G80% tem maior produção total de hidrogênio.

Singularmente, no experimento com razão V80%/G20%, existe redução do valor de pH logo no início de experimento, e aumento na concentração de ácido butírico. Durante a produção de H₂, há maior concentração de ácido butírico, o que demonstra a principal rota utilizada para a produção de hidrogênio. Nesse mesmo tempo o ácido acético foi consumido, podendo ter sido utilizado para outras reações ou mesmo na acetogênese, o que poderia reduzir a produção total de H₂.

No experimento de razão V60%/G40% existe redução do pH no início do experimento, com um leve consumo de ácido butírico e produção de ácido acético. No tempo em que houve a maior AH, também foi o que ocorreu produção de ácido acético e butírico, sendo que houve um pequeno acúmulo de ácido butírico no fim do experimento, o que pode levar a crer que mesmo havendo a produção de ácido, a produção de hidrogênio pode ter sido inibida por causa da pressão parcial do gás no reator.

No experimento de razão V40%/G60% o pH, assim como os ácidos orgânicos voláteis, permanecem estáveis até o início da produção de hidrogênio, quando há aumento da produção de ácido acético, que mostra a rota metabólica principal. Já no experimento de razão V20%/G80%, o pH inicia o experimento com comportamento de redução, enquanto os ácidos orgânicos têm comportamento de aumento de concentração, que culmina em um grande aumento de produção de ácido butírico no mesmo tempo em que ocorre a maior AH. O ácido butírico possui um pico de concentração em torno de 17 minutos, quando a produção de H₂ já está com taxas de produção reduzidas. O que pode significar que mesmo havendo produção de ácido butírico o H₂ pode não ser produzido devido a pressão parcial de H₂ no reator.

É interessante notar o efeito positivo da co-digestão de dois substratos diferentes na produção de hidrogênio. Pode-se supor que a mistura dos substratos cria um meio mais balanceado, auxiliando na produção de hidrogênio, visto que os resultados obtidos com a co-digestão foram melhores em todos os aspectos que os experimentos realizados com substratos separados.

Ainda que a produção total de hidrogênio tenha sido a melhor, a AH encontrada foi menor que a apresentada por Fernandes (2010) que obteve 3,08 mmol H₂/ (gSSV.h), utilizando glicerol como substrato. Mesmo que os resultados de Fernandes (2010) tenham sido melhores, os resultados encontrados nessa pesquisa foram interessantes, visto que a autora precisou suplementar o meio com uma solução de nutrientes, e utilizou menores concentrações de glicerol.

5.5. Análises Microbiológicas

A partir das amostras de consórcios microbianos foram isoladas nove amostras de microrganismos (Tabela 13). Destas, oito foram identificados por sequenciamento genético sendo que em todas havia pelo menos 88% de similaridade de dna. Todos os microrganismos identificados são anaeróbios facultativos, não sendo possível isolar e identificar anaeróbios estritos, como as espécies de *Clostridium*, que são descritos na literatura como produtores de hidrogênio.

Tabela 13: Análise dos microrganismos presentes ao fim do experimento.

Amostra (data)	Amostra	Identificação	Acesso	Microrganismo
03.08.2014	1	97%	NR_074540.1	<i>Bacillus cereus</i>
24.09.2014	2	93%	NR_074540.1	<i>Bacillus cereus</i>
24.09.2014	3	98%	NR_074540.1	<i>Bacillus cereus</i>
24.09.2014	4	94%	NR_074540.1	<i>Bacillus cereus</i>
24.09.2014	5	98%	NR_074540.1	<i>Bacillus cereus</i>

Amostra (data)	Amostra	Identificação	Acesso	Microrganismo
24.09.2014	6	Não amplificou	-----	-----
03.08.2014	7	93%	NR_074540.1	<i>Bacillus cereus</i>
03.08.2014	8	88%	NR_074540.1	<i>Bacillus cereus</i>
03.08.2014	9	98%	NR_074540.1	<i>Bacillus cereus</i>

Bacillus cereus é uma bactéria anaeróbia facultativa, Gram-positiva, de 3 a 4 µm, que forma esporos. Foi primeiramente isolada em 1969, em um caso fatal de pneumonia. Esse organismo é mesofílico, com crescimento preferencial entre 20°C e 40°C.

Amplamente distribuído na natureza, é encontrado comumente no solo, como um organismo saprófita, na microflora de insetos, rizosfera de algumas plantas e pode ser encontrado em reatores de tratamento de efluentes. Ghoshal, et al (2011) utilizaram o microrganismo para o tratamento de mercúrio em efluentes residenciais. Zhao, et al (2012), estudaram o uso de *Bacillus cereus* para a remoção de cromo hexavalente em efluentes de curtumes.

Quanto ao uso de *Bacillus* na produção de hidrogênio, existem diversas pesquisas sobre o assunto, como nos trabalhos de Kalia et al (1994), que estudaram a produção de hidrogênio utilizando grãos de trigo como substrato, juntamente com *Bacillus licheniformis*. Shin et al (2004), utilizaram *Bacillus thuringiensis*, para produzir H₂, usando glicerol como substrato.

Por outro lado, existem poucos estudos que pesquisam a utilização de *Bacillus Cereus* para a produção de hidrogênio, nenhum se refere ao vinhoto e/ou glicerol como substrato. O único estudo encontrado, relacionando a produção de H₂ e o microrganismo foi realizado por Patel, et al (2011), que utilizaram glicose para a produção de hidrogênio conseguindo rendimentos de 2 mol H₂ por mol de glicose. Assim, esse resultado é de extrema importância, visto que não foi encontrado em literatura nenhum estudo que identificou o microrganismo *B. cereus* como produtor de hidrogênio utilizando vinhoto ou glicerol. Mais estudos devem ser realizados para comprovar a eficiência de produção desse microrganismo.

6. CONCLUSÕES

Os presentes resultados demonstram que é possível realizar a produção de hidrogênio utilizando resíduos e subprodutos com alto potencial poluidor como substrato. Mais importante, esse estudo mostra os benefícios de tratar anaerobiamente resíduos com alto potencial poluidor tais como glicerol e vinhoto: pode-se gerar energia de baixo custo ao mesmo tempo que se mitiga um impacto ambiental. Em todos os experimentos, houve um rendimento superior comparação a alguns outros estudos da literatura.

Pode-se concluir que a produção de hidrogênio somente utilizando vinhoto é viável, e tem seus melhores resultados utilizando pH 6,0 e pH 6,5. Em pH 6,0 foi obtido 7.585 mL de produção total de hidrogênio, 16 horas de fase lag e AH de 0,65 mmol H₂/gSSV.h. Utilizando pH 6,5 foi obtido 7.355 mL de produção total de hidrogênio, 10 horas de fase lag e AH de 0,88 mmol H₂/gSSV.h.

A co-digestão dos dois substratos misturados teve resultados muito melhores que quando estes foram utilizando de forma individual, isso se deve ao maior balanço de nutrientes resultante no substrato. A melhor razão de mistura foi com 80% de DQO decorrente do glicerol e 20% de vinhoto, nela houve maior produção de hidrogênio (10,7 litros), menor tempo para o início da produção de H₂ (6 horas), menor tempo total de experimento (36 horas), AH de 0,85 mmol H₂/gSSV.h, e melhor conversão de DQO para hidrogênio (3,74 mL H₂/mg DQO) em relação aos demais experimentos. Também concluiu-se que o ajuste da máxima tangente pode ser utilizado como uma ferramenta de análise da taxa máxima de produção de hidrogênio, sendo um método simples e de fácil reprodutibilidade.

A identificação *B. cereus* é de extrema importância, visto que não foi encontrado em literatura nenhum estudo que identificou o microrganismo *B. cereus* como produtor de hidrogênio utilizando vinhoto ou glicerol. Mais estudos devem ser realizados para comprovar a eficiência de produção desse microrganismo.

7. RECOMENDAÇÕES

Embora os resultados alcançados até aqui sejam auspiciosos, não há um fechamento das oportunidades para aumentar o conhecimento nessa área visando maior colaboração para o estado da arte. Assim, entende-se que pode-se deixar recomendadas as seguintes sugestões de estudo:

- Continuar o estudo área microbiológica na digestão anaeróbia visando produção de hidrogênio, pois o *Bacillus Cereus* foi o principal microrganismo identificado e o mesmo carece de informações nessa área de estudo.
- Outro ponto interessante a ser estudado seria a variação da carga orgânica a ser adicionada em estudos com co-digestão de substratos.
- Também será muito importante que as pesquisas futuras foquem em reatores contínuos, assim, pode-se dar mais um passo na direção de obter produção de hidrogênio via microbiológica, em escalas piloto com maior eficiência.

REFERÊNCIAS

ATIF, A.A.Y., FAKHRU'L-RAZI, A., NGAN, M.A., MORIMOTO, M., IYUKEAND, S.E., VEZIROGLU, N.T., 2005. Fed batch production of hydrogen from palm oil mill effluent using anaerobic microflora. **Int. J. Hydrogen Energy** 30, 1393–1397.

AYAS, N.; ESEN, T. **Hydrogen production from tea waste**, International Journal of Hydrogen Energy, Volume 41, Issue 19, 25 May 2016, Pages 8067-8072, ISSN 0360-3199, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.09.156>.

BEAL, L. L. **Tratamento anaeróbio de efluente de curtume de acabamento associado a membranas de micro e ultrafiltração**. 2004. 313 f. Tese de Doutorado (Programa de Pós-Graduação em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

BEAL, L. L.; MONTEGGIA, L. O. **Proposta de uma nova metodologia para o cálculo da atividade metanogênica**. Em: Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, XXV, Recife, Brazil. II 127, 2009.

BRASIL. **Lei no 11.097**, de 13 de janeiro de 2005 . Dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira; altera as Leis n o 9.478, de 6 de agosto de 1997, 9.847, de 26 de outubro de 1999 e 10.636, de 30 de dezembro de 2002; e dá outras providências.

BRASIL. **Resolução nº 6/2009**. Estabelece em cinco por cento, em volume, o percentual mínimo obrigatório de adição de biodiesel ao óleo diesel comercializado ao consumidor final, de acordo com o disposto no art. 2º da Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005

CAO, X., ZHAO, Y., 2009. The influence of sodium on biohydrogen production from food waste by anaerobic fermentation. **J. Mater. Cycles Waste Manag.** 11, 244–250.

CHONG, M. SABARATNAM, V. SHIRAI, Y. HASSAN, M.A. **Biohydrogen production from biomass and industrial wastes by dark fermentation**, International Journal of Hydrogen Energy, Volume 34, Issue 8, May 2009, Pages 3277-3287.

DABROCK, B., BAHL, H., GOTTSCHALK, G., 1992. Parameters affecting solvent production by *Clostridium pasteurium*. **Appl. Environ. Microbiol.** 58, 1233–1239.

DA COSTA, J. B. **Produção biotecnológica de hidrogênio, etanol e outros produtos a partir do glicerol da reação de formação de biodiesel**. 2010. 84 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

DAS, D.; VEZIROGLU, T. N. Advances in biological hydrogen production processes. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, n. 21, p. 6046-6057, nov. 2008.

DRAPCHO,, 2008. Biofuel feedstocks, Chapter 4. In: Drapcho, C. M; NhuanPhNghim; Walker T. (Eds), **Biofuels Engineering Process Technology**, McGraw-Hill

FERNANDES, B. S. **Produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fixo**. 2008. 115 f. Tese (Doutorado em Engenharia) – Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

FRANCO, P. F. **Biodiesel, glicerol e microrganismos**. Artigos técnicos: Embrapa, dez. 2011. Disponível em: < <http://www.embrapa.br/imprensa/artigos/2011/biodiesel-glicerol-e-microrganismos-1>>. Acesso em: 25 abr. 2015.

GINKEL, S.V., SUNG, S., 2001. Biohydrogen as a function of pH and substrate concentration. **Environ. Sci. Technol.** 35,4726–4730.

GHOSHAL, S., BHATTACHARYA, P., CHOWDHURY, R. De-mercurization of wastewater by *Bacillus cereus* (JUBT1): Growth kinetics, biofilm reactor study and field emission scanning electron microscopic analysis, **Journal of Hazardous Materials**, Volume 194, 30 October 2011, Pages 355-361.

GRADY, C. P. L; DAIGGER, G. T.; LIM, H. C. **Biological Wastewater Treatment**. 3. Ed. New York: Marcel Dekker, 2011, 991 p.

HAN,W.; FANG, J.; LIU, Z., TANG, J. **Techno-economic evaluation of a combined bioprocess for fermentative hydrogen production from food waste**, Bioresource Technology, Volume 202, February 2016, Pages 107-112, ISSN 0960-8524.

HAN, W.; HU, Y.; LI, S.; HUANG, J.; NIE, Q.; ZHAO, H.; TANG, J.; **Simultaneous dark fermentative hydrogen and ethanol production from waste bread in a mixed packed tank reactor**, Journal of Cleaner Production, Volume 141, 10 January 2017, Pages 608-611, ISSN 0959-6526.

HALLENBECK, P., 2005. **Fundamentals of the fermentative production of hydrogen**. Water Science and Technology. 52, 21–29.

IPCC, 2006. IPCC guidelines for national greenhouse gas inventories. Prepared by the National Greenhouse Gas Inventories Programme (Eggleston, H.S., Buendia, L., Miwa, K., Ngara, T., Tanabe, K., Eds.). **IGES**, Japan.

JONES, D.T., WOODS, D.R., 1986. Acetone–butanol fermentation revisited. **Microbiol. Rev.** 50 (4), 484–524.

JONG, W., 2009. Sustainable hydrogen production by thermochemical biomass processing. In: Gupta, R.B. (Ed.), **Hydrogen Fuel: Production, Transport, and Storage**. Taylor & Francis Group, LLC.

- KALIA, C.V., JAIN, S. R., KUMAR, A., JOSHI, A. P. Fermentation of biowaste to H₂ by *Bacillus licheniformis*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology** (1994).
- KAPDAN,I.K., KARGI, F. Bio-hydrogen production from waste materials, **Enzyme and Microbial Technology**, Volume 38, Issue 5, 2 March 2006, Pages 569-582.
- KHANAL, S. K. et al. Biological hydrogen production: effects of pH and intermediate products. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 29, p. 1123-1131, 2004.
- KNAPPE, J., SAWERS, G., 1990. A radical-chemical route to acetyl-CoA: The anaerobically induced pyruvate formate lyase system of *Escherichia coli*. **Microbiol. Lett.** 75, 383–398
- KUMAR, N., Das, D., 2000. Enhancement of hydrogen production by *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08. **Process Biochem.**35, 589–593.
- Angenent, L.T. Karim, K. Al-Dahhan, M.H. Wrenn, B.A. Domínguez-Espinosa, R. **Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater**, Trends in Biotechnology, Volume 22, Issue 9, September 2004, Pages 477-485
- LEE, Y.J., Miyahara, K., Noike, T., 2002. Effect of pH on microbial hydrogen fermentation. **J. Chem. Technol. Biotechnol.** 77, 694–698.
- LEE, K.S., Lin, P.J., Chang, J.S., 2006. Temperature effects on biohydrogen production in a granular sludge bed induced by activated carbon carriers. **Int. J. Hydrogen Energy.** 31 (4), 465–472.
- Li, C.L., Fang, H.H.P., 2007. Fermentative hydrogen production from wastewater and solid wastes by mixed cultures. **Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.** 37 (1), 1–39.
- LI, Y.; LIU, Y.; CHU, C.; CHANG, P.; HSU, C.; LIN, P.; WU, S. **Techno-economic evaluation of biohydrogen production from wastewater and agricultural waste**, International Journal of Hydrogen Energy, Volume 37, Issue 20, October 2012, Pages 15704-15710.
- LIN, C.-Y., LAY, CH. Research and development of biohydrogen production in Taiwan. In: FANG H.H. P. (Org.). **Environmental anaerobic technology: applications and new developments**. Londres Imperial College Press, 2010, p. 331-244.
- LO, Y.C., SU, Y.C., CHEN, C.Y., CHEN, W.M., LEE, K.S., Chang, J.S., 2009. Biohydrogen production from cellulosic hydrolysate produced via temperature-shift-enhanced bacterial cellulose hydrolysis. **Bioresour. Technol.** 100(23), 5802–5807.

LIPMAN, T. An overview of hydrogen production and storage systems with renewable hydrogen case studies. Em: **Energy Efficiency and Renewable Energy Fuel Cell Technologies Program**, 2011.

MAINTINGUER, S.I. et al. Fermentative hydrogen production by microbial consortium. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, n. 16, p. 6046-6057, 2008.

MARKETS AND MARKETS, 2011. **Hydrogen Generation Market-by Merchant & Captive Type, Distributed & Centralized Generation, Application & Technology-Trends & Global Forecasts (2011–2016)**. Report code: EP1708. Disponível em: <http://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/hydrogen-generation-market-494.html>. Acesso em: 10 ago. 2015.

MARTÍNEZ-PÉREZ, N. CHERRYMAN, S.J. PREMIER, G.C. DINSDALE, R.M. HAWKES, D.L. HAWKES, F.R. **The potential for hydrogen-enriched biogas production from crops: Scenarios in the UK, Biomass and Bioenergy**, Volume 31, Issues 2–3, February–March 2007, Pages 95-104.

MATHEWS, J., WANG, G., 2009. **Metabolic pathway engineering for enhanced biohydrogen production**. *Int. J. Hydrogen Energy* 34, 7404–7416.

MIZUNO, O. et al. Enhancement of hydrogen production from glucose by nitrogen gas sparging. **Bioresource Technology**, v. 73, n. 1, p. 59-65, mai. 2000.

MOHAN, S. V. BABU, V. L. SARMA, P.N. Effect of various pretreatment methods on anaerobic mixed microflora to enhance biohydrogen production utilizing dairy wastewater as substrate, **Bioresource Technology**, Volume 99, Issue 1, January 2008, Pages 59-67.

MONTEGGIA, L. O. Proposta de metodologia para avaliação do parâmetro “Atividade Metanogênica Específica”. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 19., 1997, Foz do Iguaçu. Anais Foz do Iguaçu: ABES, 1997

NATH, K., Kumar, A., DAS, D., 2006. Effect of some environmental parameters on fermentative hydrogen production by *Enterobacter cloacae* DM11. *Can. J. Microbiol.* 52, 525–532.

NOORI, M.; SAADY, C.; **Homoacetogenesis during hydrogen production by mixed cultures dark fermentation: Unresolved challenge**, *International Journal of Hydrogen Energy*, Volume 38, Issue 30, 8 October 2013, Pages 13172-13191, ISSN 0360-3199.

PANDEY, A., CHANG, J. C., HALLENBECK, P., LARROCHE, C. **Biohydrogen**. 1 edição. Elsevier, Junho de 2013. 588 paginas. ISBN: 978-0-444-59555-3

PATEL, S. K. S., SINGH, M., KALIA, V.C. Hydrogen and Polyhydroxybutyrate Producing Abilities of *Bacillus* spp. From Glucose in Two Stage System. **Indian Journal of Microbiology**, 2011, 51(4):418–423.

PANDU, K.; JOSEPH, S. Comparisons and limitations of biohydrogen production processes: a review. **International Journal of Advances in Engineering & Technology**, v. 2, n. 1, p. 342-356, 2012.

PRAKASHAM, R.S.; BRAHMAIAH, P.; SATHISH, T.; SAMBASIVARAO, K.R.S. Fermentative biohydrogen production by mixed anaerobic consortia: Impact of glucose to xylose ratio, **International Journal of Hydrogen Energy**, Volume 34, Issue 23, December 2009, Pages 9354-9361.

REN, N, Q., GUO, W, Q., WANG, X, J., XIANG, W, S., LIU, B, F., Effects of different pretreatment methods on fermentation types and dominant bacteria for hydrogen production, **International Journal of Hydrogen Energy**, Volume 33, Issue 16, August 2008, Pages 4318-4324.

ROSSI, D. M. DA COSTA, J.B. DE SOUZA, E. A. PERALBA, M.C.R. SAMIOS, D. AYUB, M. A. C. Comparison of different pretreatment methods for hydrogen production using environmental microbial consortia on residual glycerol from biodiesel, **International Journal of Hydrogen Energy**, Volume 36, Issue 8, April 2011, Pages 4814-4819.

SALOMON, Ribeiro Karina. **Avaliação Técnico-Econômica e Ambiental da Utilização do Biogás Proveniente da Biodigestão da Vinhaça em Tecnologias para Geração de Eletricidade**. 2007. 247. Tese Doutorado - UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ. Itajubá, Novembro de 2007.

SEIFERT, K. WALIGORSKA, M. WOJTOWSKI, M. LANIECKI, M. Hydrogen generation from glycerol in batch fermentation process, **International Journal of Hydrogen Energy**, Volume 34, Issue 9, May 2009, Pages 3671-3678.

SHANMUGAM, S. R.; CHAGANTI, S. R.; LALMAN, J.A.; HEATH, D. D. **Effect of inhibitors on hydrogen consumption and microbial population dynamics in mixed anaerobic cultures**, *International Journal of Hydrogen Energy*, Volume 39, Issue 1, 2 January 2014, Pages 249-257, ISSN 0360-3199.

SHIN, HS., YOUN, JH., KIM, SH. Hydrogen production from food waste in anaerobic mesophilic and thermophilic acidogenesis, **International Journal of Hydrogen Energy**, Volume 29, Issue 13, October 2004, Pages 1355-1363.

TREVISAN, V. **Proposta de metodologia para determinação da atividade hidrogênica específica**. 2010. 187 f. Tese (Doutorado em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental) – Instituto de Pesquisa Hidráulicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

UYEDA K, RABINOWITZ JC (1971). Pyruvate-ferredoxinoxidoreductase. 3. Purification and properties of the enzyme". J. Biol. Chem. 246 (10): 3111–9. Benemann, J.R., 1996. **Hydrogen biotechnology: Progress and prospects. Nat. Biotechnol.** 14, 1101–1103

VAZQUEZ, V. 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.; LOGAN, B. Increased biological hydrogen production with reduced organic loading, **Water Research**, Volume 39, Issue 16, October 2005, Pages 3819-3826.

WANG, J.; WAN, W. Factors influencing fermentative hydrogen production: A review. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, n. 2, p. 799-811, jan. 2009.

WANG, S.; ZHANG, T.; Su, H. **Enhanced hydrogen production from corn starch wastewater as nitrogen source by mixed cultures**, Renewable Energy, Volume 96, Part B, October 2016, Pages 1135-1141, ISSN 0960-1481.

YAZDANI, S. S.; GONZALEZ, R. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. **Current Opinion Biotechnology**, v. 18, n. 3, p. 213–219, jun. 2007.

ZAHEDI, S.; SOLERA, R.; GARCÍA-MORALES, J.L.; SALES, D. **Effect of the addition of glycerol on hydrogen production from industrial municipal solid waste**, Fuel, Volume 180, 15 September 2016, Pages 343-347, ISSN 0016-2361.

ZHAO, C., YANG, Q., CHEN, W., TENG, B. Removal of hexavalent chromium in tannery wastewater by *Bacillus cereus*. **Canadian Journal of Microbiology**, 2012, 58:23-28,

ZWIETERING, M. H. et al. Modelling of the bacterial growth curve. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 6, p. 1875-1881, jun. 1990.