

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOENERGIA

FERNANDA BERNARDO CRIPA

AVALIAÇÃO DE INÓCULOS MISTOS PARA PRODUÇÃO DE
BIOHIDROGÊNIO

PALOTINA
2016

FERNANDA BERNARDO CRIPA

AVALIAÇÃO DE INÓCULOS MISTOS PARA PRODUÇÃO DE
BIOHIDROGÊNIO

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Bioenergia, no Curso de Pós-Graduação em Bioenergia da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Helton José Alves

Co-Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Sequinel

PALOTINA

2016

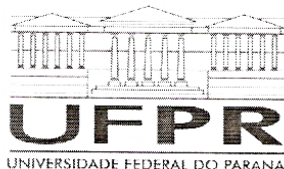
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

C931 Cripa, Fernanda Bernardo
Avaliação de inóculos mistos para produção de Biohidrogênio/
Fernanda Bernardo Cripa. – Palotina, 2016.
95f.

Orientador: Helton José Alves
Coorientador: Rodrigo Sequinel
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do
Paraná, Setor Palotina, Programa de Pós-Graduação em
Bienergia.

1. Biohidrogênio. 2. *Dark fermentation*.
3. Inóculos mistos. I. Alves, Helton José. II. Sequinel,
Rodrigo. III. Universidade Federal do Paraná.

CDU 620.92



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor PALOTINA
Programa de Pós Graduação em BIOENERGIA - UEL - UEM - UEPG - UNICENTRO -
UNIOESTE - UFPR
Código CAPES: 40002012041P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em BIOENERGIA - UEL - UEM - UEPG - UNICENTRO - UNIOESTE - UFPR da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **FERNANDA BERNARDO CRIPA**, intitulada: "**AVALIAÇÃO DE INÓCULOS MISTOS PARA PRODUÇÃO DE BIOHIDROGÊNIO**", após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação.

Palotina, 01 de Julho de 2016.

Prof HELTON JOSÉ ALVES
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

Prof SIMONE DAMÁSCENO GOMES
Avaliador Externo (UNIOESTE)

Prof DILCÊMARA CRISTINA ZENATTI
Avaliador Externo (UFPR)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiro e principalmente à Deus pela graça de VIVER, viver bem, com saúde e sempre em busca dos meus sonhos. Aos meus pais e irmãos por todo apoio que sempre me deram, desde meu primeiro ano de graduação até hoje, abrindo mão de muitas coisas para eles e do próprio lazer, para que eu pudesse continuar estudando, sempre me direcionando para os melhores caminhos e sempre permitindo que eu faça minhas escolhas de acordo com o meu objetivo.

Ao meu namorado João Luiz que sempre me incentivou, obrigada pela paciência e pela compreensão, mesmo com a distância e a ausência sempre me deu todo apoio necessário para que eu fosse em busca dos meus objetivos, para que eu fosse sempre em frente.

Ao meu orientador professor Dr. Helton José Alves pela oportunidade de poder trabalhar ao seu lado, por ter encarado o desafio do Bio-H₂ e me encorajado a encarar também. Mesmo sem saber, muitas vezes ensinou pelo exemplo de profissional que és. Obrigada por todos os ensinamentos, por toda paciência e compreensão.

Agradeço aos professores co-orientadores: Dr. Rodrigo Sequinel e M.^a Mabel Carina Arantes, por me permitirem trabalhar ao lado de vocês e dividirem comigo algo que dinheiro nenhum pode pagar, o conhecimento. Obrigada também pela paciência e pelas muitas horas me ajudando a resolver problemas e ajustando todos os detalhes, ajudando a originar um trabalho que com certeza renderá bons frutos futuramente.

Agradeço aos colegas do LabCatProBio, especialmente a Andressa Neves, Carine Schwengber, Andressa Estevam, Vanessa Rossato, Carlos Pessuti, Igor Prochnow, Julia Bavaresco pela ajuda no decorrer do trabalho. E as amigas do multidisciplinar Mara, Jéssica, Cleuza, Zenaide e Eliete que me acolheram no decorrer dessa jornada e deram todo o apoio necessário.

Obrigada UFPR – Setor Palotina (Universidade Federal do Paraná) e a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela oportunidade.

Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para esse trabalho.

Dedico este trabalho a minha família e ao meu namorado pela compreensão e incentivo sempre depositados durante a busca por meus sonhos.

RESUMO

A busca por fontes alternativas de energia tem se intensificado nos últimos anos devido à preocupação com o meio ambiente e a elevada dependência de fontes fósseis de energia. O hidrogênio (H_2) mostra-se uma alternativa promissora e destaca-se como um vetor energético que não emite gases de efeito estufa, no entanto, atualmente quase 95% da produção mundial de hidrogênio é a partir de matérias-primas à base de combustíveis fósseis. A fermentação anaeróbia vem sendo uma opção interessante para a produção biológica de H_2 (Bio- H_2). Nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi a avaliação de inóculos provenientes de resíduos agroindustriais para a produção de bio- H_2 a partir da fermentação de efluente sintético contendo sacarose ou glicerol. Para isso foram preparados reatores para condução de ensaios em batelada, utilizando frascos agitados e condições mesofílicas. Foram avaliados inóculos provenientes de sistemas de tratamento anaeróbio de resíduos agroindustriais (suinocultura e abatedouro de aves), pré-tratados termicamente. Os substratos avaliados foram sacarose, glicerol puro e misturas de glicerol puro e glicerol bruto. A avaliação foi feita a partir da composição do biogás considerando a produção de H_2 em mmol e percentual. Observou-se que o inóculo proveniente efluente de lagoa anaeróbia aplicada ao tratamento de águas residuais de abatedouro de aves é o mais indicado para a produção de Bio- H_2 nas condições em que se conduziu o presente estudo. Nas reações utilizando sacarose como substrato obteve-se o maior rendimento de H_2 (8,3 mmol H_2 L⁻¹ meio reacional). O máximo rendimento de H_2 obtido para os ensaios utilizando glicerol puro como substrato foi de 3,6 mmol H_2 L⁻¹ meio reacional; já para a mistura de glicerol puro/bruto obteve-se o máximo de 1,0 mmol H_2 L⁻¹ meio reacional. Em relação a composição do biogás em percentual de H_2 , os melhores resultados obtidos foram 61,4, 63,3 e 50,5% (sacarose, glicerol puro e mistura de glicerol puro/bruto, respectivamente). A inibição da metanogênese por tratamento térmico mostrou-se eficiente, sendo possível obter biogás rico em H_2 e isento de CH_4 .

Palavras-chave: Inóculos mistos. *Dark fermentation*. Biohidrogênio. Efluente.

ABSTRACT

The search for alternative energy sources has intensified in recent years due to concern for the environment and the high reliance on fossil sources of energy. Hydrogen (H_2) is a promising alternative and stands out as an energy vector that does not emit greenhouse gases, however, currently almost 95% of the world's hydrogen production from raw materials based on fossil fuels. The anaerobic fermentation has been an interesting option for organic production of H_2 (Bio- H_2). In this context, the objective of this study was the evaluation of inoculum from agroindustry waste to produce bio- H_2 from the fermentation of synthetic sewage containing sucrose or glycerol. For it were prepared for conducting test reactors in batch, using bottles and mesophilic conditions. Inoculants were evaluated from anaerobic treatment systems of agro-industrial waste (pigs and slaughter of birds), thermally pre-treated. The substrates evaluated were sucrose, pure glycerol and glycerol mixtures pure and crude glycerol. The evaluation was made from the biogas composition considering the production of H_2 at mmol and percentage. It was observed that the anaerobic pond effluent inoculum applied to treatment of waste water of slaughter of poultry is the most suitable for the production of Bio- H_2 in the conditions in which conducted this study. In reactions using sucrose as a substrate was obtained the greatest yield of H_2 (8.3 mmol L⁻¹ reaction system H_2). The maximum performance of H_2 obtained for the tests using pure glycerol as substrate was 3.6 mmol L⁻¹ reaction system H_2 ; the mixture of pure glycerol/gross obtained the maximum of 1.0 mmol L⁻¹ reaction system H_2 . Regarding the composition of biogas in percentage of H_2 , the best results were 61.4, and 50.5 63.3% (sucrose, pure glycerol and glycerol mixture pure/gross, respectively). Inhibition of Methanogenesis by heat treatment was shown to be efficient, being possible to obtain biogas rich in H_2 and CH_4 .

Keywords: Mixed inoculant. Dark fermentation. Biohydrogen. Effluent.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ALGUMAS ALTERNATIVAS DE MATÉRIA-PRIMA E PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE H ₂	20
FIGURA 2 - ROTA METABÓLICA DE DEGRADAÇÃO DE RESÍDUOS AGRÍCOLAS. AS SETAS EM NEGRITO INDICAM AS VIAS DE PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO E AS SETAS PONTILHADAS AS VIAS QUE CONSOMEM HIDROGÊNIO	23
FIGURA 3 - MORFOLOGIA DE ARQUEAS METANOGÊNICAS	27
FIGURA 4 - ROTA DE PRODUÇÃO DE GLICERINA A PARTIR DO PROPILENO.....	32
FIGURA 5 - PRODUÇÃO DE BIODIESEL A PARTIR DA TRANSESTERIFICAÇÃO DE ÓLEOS VEGETAIS COM METANOL, USANDO CATÁLISE BÁSICA	33
FIGURA 6 - FLUXOGRAMA EXPERIMENTAL.....	39
FIGURA 7 - COMPOSIÇÃO DO BIOGÁS (%) E QUANTIDADE DE MATÉRIA (MMOL) EM TERMOS DE H ₂ , CO ₂ E CH ₄ PARA OS ENSAIOS 1,2 E 3; TEMPO DE REAÇÃO: 48 HORAS.	51
FIGURA 8 - COMPOSIÇÃO DO BIOGÁS (%) E QUANTIDADE DE MATÉRIA (MMOL) EM TERMOS DE H ₂ , CO ₂ E CH ₄ PARA OS ENSAIOS 4 E 5. ENSAIOS COM ALIMENTAÇÃO DOS REATORES, TEMPO DE REAÇÃO: 11 DIAS.....	53
FIGURA 9 - COMPOSIÇÃO DO BIOGÁS AO LONGO DO TEMPO DE REAÇÃO PARA OS ENSAIOS 6 (A) E 7 (B). ENSAIOS COM ALIMENTAÇÃO DOS REATORES.	55
FIGURA 10 - COMPOSIÇÃO DO BIOGÁS (%) AO LONGO DO TEMPO DE REAÇÃO PARA OS INÓCULOS AT (A) E AA (B) (ENSAIOS 7 E 8 RESPECTIVAMENTE). ENSAIOS COM ALIMENTAÇÃO DOS REATORES.....	58
FIGURA 11 - PRODUÇÃO DE H ₂ E CO ₂ (MMOL) E COMPOSIÇÃO DO BIOGÁS (%) PARA OS ENSAIOS 9 (35 °C – 150 RPM), 10 (35 °C – SEM AGITAÇÃO), 11 (28 °C – 150 RPM) E 12 (28 °C – SEM AGITAÇÃO).....	60
FIGURA 12 - COMPOSIÇÃO DO BIOGÁS (%) E PRODUÇÃO DE H ₂ E CO ₂ (MMOL) AO LONGO DO TEMPO PARA O ENSAIO 13. ENSAIO SEM ALIMENTAÇÃO DOS REATORES	62
FIGURA 13 - COMPOSIÇÃO DO BIOGÁS E PRODUÇÃO DE H ₂ E CO ₂ AO LONGO DO TEMPO PARA O ENSAIO 15.....	63
FIGURA 14 - COMPOSIÇÃO DO BIOGÁS E PRODUÇÃO DE H ₂ E CO ₂ AO LONGO DO TEMPO PARA OS ENSAIOS 18 E 19	67
FIGURA 15 - COMPOSIÇÃO DO BIOGÁS PARA O ENSAIO 26 (AUTOFERMENTAÇÃO DE EFLUENTE SINTÉTICO 1 - SUBSTRATO SACAROSE).	73
FIGURA 16- COLORAÇÃO DE GRAM DE AMOSTRAS DE EFLUENTE DE LAGOA ANAERÓBIA APLICADA AO TRATAMENTO DE ÁGUAS RESIDUAIS DE ABATEDOURO DE AVES, SEM PRÉ-TRATAMENTO.....	81
FIGURA 17 - COLORAÇÃO DE GRAM REFERENTE AOS ENSAIOS 7 E 12	82
FIGURA 18 - COLORAÇÃO DE GRAM REFERENTE AO ENSAIO 21	83

FIGURA 19 - COLORAÇÃO DE GRAM REFERENTE AO ENSAIO DE AUTOFERMENTAÇÃO DO EFLUENTE SINTÉTICO 1 (ENSAIO 26).....	84
FIGURA 20 - COLORAÇÃO DE GRAM REFERENTE AO ENSAIO 13	84

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - APLICAÇÕES DO HIDROGÊNIO NA INDÚSTRIA.....	18
TABELA 2 - FONTES, PROCESSOS E TIPOS DE ENERGIA UTILIZADAS NA OBTENÇÃO DE HIDROGÊNIO.	20
TABELA 3 - PRINCIPAIS REAÇÕES DE DECOMPOSIÇÃO DO PIRUVATO	22
TABELA 4 - DIFERENTES TIPOS DE INÓCULO PARA A PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO POR FERMENTAÇÃO ANAERÓBIA.....	26
TABELA 5 - ESTUDOS REALIZADOS COM PRÉ-TRATAMENTO DE INÓCULO PARA PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO	30
TABELA 6 - PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO GLICEROL.....	33
TABELA 7 - COMPOSIÇÃO DO EFLUENTE SINTÉTICO 1.....	40
TABELA 8 - COMPOSIÇÃO DO EFLUENTE SINTÉTICO 2.....	40
TABELA 9 - DESCRIÇÃO DOS ENSAIOS DE ESCOLHA DO INÓCULO.....	43
TABELA 10 - DESCRIÇÃO DOS ENSAIOS DE DETERMINAÇÃO DO PRÉ-TRATAMENTO.....	43
TABELA 11 - DESCRIÇÃO DOS ENSAIOS PARA DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES OPERACIONAIS	44
TABELA 12 - DESCRIÇÃO DOS ENSAIOS REALIZADOS COM REUSO DE INÓCULO	45
TABELA 13 - DESCRIÇÃO DOS ENSAIOS REALIZADOS COM REUSO DE INÓCULO	46
TABELA 14 - DESCRIÇÃO DOS ENSAIOS DE VARIAÇÃO DE CARGA ORGANICA PARA ALIMENTAÇÃO DOS REATORES COM GLICEROL	47
TABELA 15 - DESCRIÇÃO DOS ENSAIOS UTILIZANDO GLICEROL PURO E BRUTO PARA ALIMENTAÇÃO DOS REATORES.....	47
TABELA 16 - DESCRIÇÃO DOS ENSAIOS UTILIZANDO AUTOFERMENTAÇÃO DO EFLUENTE SINTÉTICO 1 (AF1) E EFLUENTE SINTÉTICO 2 (AF2) COMO INÓCULO	48
TABELA 17 - RESULTADOS DE PH OBTIDOS NO INÍCIO E FIM DE CADA REAÇÃO, STV INICIAL E DQO INICIAL DOS ENSAIOS 6 E 7.....	54
TABELA 18 - RESULTADOS DE PH OBTIDOS NO INÍCIO E FIM DE CADA REAÇÃO, STV INICIAL E DQO INICIAL DOS ENSAIOS 7 E 8.....	57
TABELA 19 - RESULTADOS DE PH E DQO OBTIDOS NO INÍCIO E FIM DE CADA REAÇÃO E STV INICIAL DOS ENSAIOS 13 A 17.....	64
TABELA 20 - RESULTADOS DE CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS OBTIDOS PARA O ENSAIO 13 (DIAS 0 E 2) E 15 (DIAS 0, 7 E 11).....	64
TABELA 21 - REAÇÕES USADAS PARA CÁLCULO DA DQO TEÓRICA DE CADA METABÓLITO E O FATOR QUE RELACIONA A MASSA DA SUBSTÂNCIA COM O EQUIVALENTE EM DQO.	66
TABELA 22 - RESULTADOS DE PH E DQO OBTIDOS NO INÍCIO E FIM DE CADA REAÇÃO E STV INICIAL DOS ENSAIOS 18 E 19.....	68
TABELA 23 - RESULTADOS DE PH E DQO OBTIDOS NO INÍCIO E FIM DE CADA REAÇÃO E STV INICIAL DOS ENSAIOS 20 E 21.....	69

TABELA 24 - RESULTADOS DE pH E DQO OBTIDOS NO INÍCIO E FIM DE CADA REAÇÃO E STV INICIAL DOS ENSAIOS 20 E 21.....	71
TABELA 25 - RESULTADOS DE pH E DQO OBTIDOS NO INÍCIO E FIM DE CADA REAÇÃO E STV INICIAL DOS ENSAIOS 20 E 21.....	74
TABELA 26 - RESUMO DOS ENSAIOS DE PRODUÇÃO DE H ₂ PARA OS QUAIS FOI REALIZADA A ANALISE DE ÁCIDOS VOLÁTEIS.....	75
TABELA 27 - RESULTADOS DE ÁCIDOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS E ALCOÓIS PARA OS ENSAIOS 6 E 7.....	76
TABELA 28 - RESULTADOS DE ÁCIDOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS E PRODUÇÃO DE H ₂ (QUANTIDADE DE MATÉRIA E PERCENTUAL) PARA ALGUNS ENSAIOS CONDUZIDOS COM SUBSTRATO CONTENDO GLICEROL.....	78
TABELA 29 - RESULTADOS DE pH, STV E DQO DE ENSAIOS QUE OBTIVERAM RENDIMENTO DE H ₂ ACIMA DE 1,5 MMOL H ₂ L ⁻¹ MEIO REACIONAL.	80
TABELA 30 - RESULTADOS DE pH, STV E DQO DE ENSAIOS QUE OBTIVERAM RENDIMENTO DE H ₂ ABAIXO DE 1,5 MMOL H ₂ L ⁻¹ MEIO REACIONAL.	80
TABELA 31 - RESUMO DOS ENSAIOS DE PRODUÇÃO DE H ₂ PARA OS QUAIS FOI REALIZADA A AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA.....	81

LISTA DE EQUAÇÕES

- Equação 1** $\text{NADH} + \text{H}^+ + 2\text{Fd}^{2+} \rightarrow 2\text{H}^+ + \text{NAD}^+ + 2\text{Fd}^+$
- Equação 2** $2\text{Fd}^+ + 2\text{H}^+ \xrightarrow{\text{Hidrogenase}} 2\text{Fd}^{2+} + \text{H}_2$
- Equação 3** $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{CH}_3\text{COOH} + 2\text{CO}_2 + 4\text{H}_2$
- Equação 4** $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \rightarrow \text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH} + 2\text{CO}_2 + 2\text{H}_2$
- Equação 5** $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 2\text{NAD}^+ \rightarrow 2\text{CH}_3\cdot\text{CO}\cdot\text{COOH} + 2\text{NADH} + 2\text{H}^+$
- Equação 6** $\text{CH}_3\cdot\text{CO}\cdot\text{COOH} + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_3\cdot\text{CHOH}\cdot\text{COOH} + \text{NAD}^+$
- Equação 7** $2\text{CH}_3\cdot\text{CO}\cdot\text{COOH} \rightarrow \text{CH}_3\cdot(\text{CH}_2)_2\cdot\text{COOH} + 2\text{CO}_2$
- Equação 8** $\text{CH}_3\cdot\text{CO}\cdot\text{COOH} + \text{CO}_2 + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow (\text{CH}\cdot\text{COOH})_2 + \text{H}_2\text{O} + \text{NAD}^+$
- Equação 9** $\text{HCOOH} \rightarrow \text{H}_2 + \text{CO}_2$
- Equação 10** $\text{CH}_3\cdot\text{CO}\cdot\text{COOH} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\cdot\text{COOH} + \text{HCOOH}$
- Equação 11** $2\text{CH}_3\cdot\text{CO}\cdot\text{COOH} + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_3\cdot(\text{CHOH})_2\cdot\text{CH}_3 + 2\text{CO}_2 + \text{NAD}^+$
- Equação 12** $\text{CH}_3\cdot\text{CO}\cdot\text{COOH} + 2\text{NADH} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_3\cdot\text{CH}_2\text{OH} + \text{HCOOH} + 2\text{NAD}^+$
- Equação 13** $2\text{CH}_3\cdot\text{CO}\cdot\text{COOH} + \text{H}_2\text{O} + 2\text{NAD}^+ \rightarrow \text{CH}_3\cdot\text{CO}\cdot\text{CH}_3 + 3\text{CO}_2 + 2\text{NADH} + 2\text{H}^+$
- Equação 14** $2\text{CH}_3\cdot\text{CO}\cdot\text{COOH} + 2\text{NADH} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_3\cdot(\text{CH}_2)_2\cdot\text{CH}_2\text{OH} + 2\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} + 2\text{NAD}^+$
- Equação 15** $4\text{H}_2 + \text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$
- Equação 16** $4\text{HCOOH} \rightarrow \text{CH}_4 + 3\text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$
- Equação 17** $4\text{CH}_3\text{NH}_2\text{Cl} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 3\text{CH}_4 + \text{CO}_2 + 4\text{NH}_4\text{Cl}$
- Equação 18** $2(\text{CH}_3)\text{NHCl} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 3\text{CH}_4 + \text{CO}_2 + 2\text{NH}_4\text{Cl}$
- Equação 19** $4(\text{CH}_3)_2\text{NCl} + 6\text{H}_2\text{O} \rightarrow 9\text{CH}_4 + 3\text{CO}_2 + 4\text{NH}_4\text{Cl}$
- Equação 20** $\text{CH}_3\text{COOH} \rightarrow \text{CH}_4 + \text{CO}_2$
- Equação 21** $4\text{H}_2 + \text{H}_2\text{SO}_4 \rightarrow \text{H}_2\text{S} + 4\text{H}_2\text{O}$

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	17
2.1 OBJETIVO GERAL.....	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1 HIDROGÊNIO	18
3.2 PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO POR <i>DARK FERMENTATION</i>	21
3.3 FATORES QUE INFLUENCIAM A PRODUÇÃO DE H ₂ POR <i>DARK FERMENTATION</i>	24
3.3.1 <i>Influência do inóculo</i>	24
3.3.2 <i>Influência do pré-tratamento do inóculo</i>	28
3.3.3 <i>Influência do substrato</i>	31
3.3.3.1 Glicerol.....	32
3.3.3.2 Glicerol gerado no processo de produção de biodiesel.....	33
3.3.4 <i>Influência do pH</i>	35
3.3.5 <i>Influência da temperatura</i>	36
4 MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1 MONTAGEM DO REATOR.....	38
4.2 SUBSTRATO	40
4.3 INÓCULO.....	41
4.4 ENSAIOS PRELIMINARES UTILIZANDO SACAROSE E EFLUENTE SINTÉTICO 1 COMO SUBSTRATO.....	42
4.4.1 <i>Avaliação dos inóculos quanto ao potencial para a produção de H₂</i>	42
4.4.2 <i>Avaliação da eficiência do pré tratamento do inóculo</i>	43
4.4.3 <i>Determinação das condições operacionais – temperatura/ agitação</i>	44
4.5 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE H ₂ UTILIZANDO COMO SUBSTRATO O EFLUENTE SINTÉTICO 2, QUE CONTÉM GLICEROL COMO FONTE DE CARBONO	45
4.5.1 <i>Reuso de inóculo</i>	45
4.5.2 <i>Reativação do inóculo</i>	46
4.5.3 <i>Determinação da carga orgânica para alimentação dos reatores com glicerol</i>	46
4.5.4 <i>Estudo da inserção de glicerol bruto na alimentação dos reatores</i>	47
4.6 AUTOFERMENTAÇÃO DOS EFLUENTES SINTÉTICO 1 E 2.....	48
4.7 CARACTERIZAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS E ANÁLISE MICROBIOLÓGICA.....	49
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
5.1 ENSAIOS PRELIMINARES UTILIZANDO SACAROSE E EFLUENTE SINTÉTICO 1 COMO SUBSTRATO.....	51

5.1.1 Avaliação dos inóculos quanto ao potencial para a produção de H ₂	51
5.1.1.1 Ensaios realizados com coletas ao longo do tempo de reação.....	54
5.1.2 Avaliação da eficiência do pré tratamento do inóculo	57
5.1.3 Determinação das condições operacionais – temperatura/ agitação	59
5.2 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE H ₂ UTILIZANDO COMO SUBSTRATO O EFLUENTE SINTÉTICO 2, QUE CONTÉM GLICEROL COMO FONTE DE CARBONO	62
5.2.1 Reuso de inóculo.....	62
5.2.2 Reativação do inóculo	66
5.2.3 Avaliação da carga orgânica para alimentação dos reatores com glicerol	68
5.2.4 Inserção de glicerol bruto na alimentação dos reatores.....	70
5.3 RESULTADOS OBTIDOS UTILIZANDO INÓCULO DE AUTOFERMENTAÇÃO DOS EFLUENTES SINTÉTICO 1 E 2.....	72
5.4 CORRELAÇÃO ENTRE ÁCIDOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS E ROTAS METABÓLICAS.....	75
5.5 AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE ENSAIOS DE PRODUÇÃO DE H ₂	80
6 CONCLUSÃO.....	86
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	87
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88

1 INTRODUÇÃO

Diversos fatores tem impulsionado a busca por fontes alternativas de energia: a preocupação com o meio ambiente, a elevada dependência por fontes fósseis de energia, o constante aumento populacional proporcionando aumento da demanda energética, bem como, a baixa constante dos níveis dos reservatórios de água, considerando que a energia hidrelétrica corresponde aproximadamente 70% demanda energética do país.

Dessa forma, as buscas atuais por novas fontes de energia têm sido pautadas por fatores econômicos e ambientais, sendo que este último encontra suporte em acordos mundiais como o Acordo de Paris de 2015 (ONU). A exigência cada vez mais vai além de buscar apenas fontes renováveis: é necessário que esta fonte de energia esteja disponível o ano todo, seja limpa, sustentável e economicamente viável.

Diante disso, o hidrogênio (H₂) mostra-se uma alternativa interessante em diversos aspectos supra citados, destacando-se como um vetor energético que não emite gases de efeito estufa, já que na conversão de energia química à energia elétrica gera apenas vapor d'água como resíduo. Porém, para que seja considerado energia limpa, o hidrogênio deve ser produzido de forma a não gerar prejuízo ao meio ambiente. Para que seja economicamente viável a produção de hidrogênio deve advir da utilização de sistema e matérias-primas baratas e sem gasto excessivo de energia.

Neste caso, os métodos biológicos para a produção de hidrogênio (como fermentativos e fotossintéticos) vem sendo bastante promissores. Dentre os métodos fermentativos *dark fermentation* destaca-se por ser relativamente simples, envolvendo microrganismos cultivados na presença de substratos orgânicos que são degradados para fornecer energia para o crescimento microbiano.

Assim, fatores como o tipo de inóculo e de substrato, são importantes e interferem no processo de *dark fermentation*. Os inóculos podem ser culturas puras de microrganismos selecionados para fermentar o substrato de interesse ou, consórcios microbianos provenientes de resíduos de diversos setores, sendo que os resíduos também são interessantes como fonte de substrato.

Lodos proveniente de biodigestores como os do tipo UASB (*upflow anaerobic sludge blanket*), são amplamente utilizados como inóculo em estudos de produção de hidrogênio por conter elevada concentração de microrganismos anaeróbios. Porém, no caso de indisponibilidade desses sistemas de tratamentos de resíduos, outra opção

viável que também vem sendo estudada é a utilização de efluentes de tratamento de águas residuais.

A geração de resíduos é um problema ambiental crescente e alguns desses resíduos como os efluentes de tratamento de águas residuais da agroindústria, resíduo da indústria de celulose, resíduo da produção de biodiesel (glicerol), possuem potencial para serem reutilizados como inóculo ou substrato em outros processos como o de biodigestão para produção de hidrogênio. Assim, alguns tipos de resíduos ricos em fontes de carbono fermentescíveis podem ser excelentes oportunidades de se aliar tratamento do efluente com geração de energia.

Os açúcares simples, tais como glicose e sacarose são substratos altamente biodegradáveis pelos microrganismos fermentativos, no entanto, por serem matérias-primas caras, apenas são interessantes do ponto de vista de utilização em estudos iniciais, como modelo para implementação dos resíduos.

Considerando esses aspectos, neste trabalho foi estudado o uso de inóculos mistos, provenientes de sistemas de tratamento anaeróbio de resíduos agroindustriais de suinocultura e de abatedouro de aves para a produção de biohidrogênio a partir da fermentação de efluente sintético contendo sacarose como fonte de carbono, com posterior inserção de glicerol P.A. e residual, visando contribuir para os esforços de utilização do glicerol residual, coproduto da produção de biodiesel, disponível em grande quantidade no Brasil.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar diversos inóculos para a produção de biohidrogênio (bio-H₂) a partir da fermentação de efluente sintético contendo sacarose ou glicerol.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar metodologia para a produção de biohidrogênio utilizando como reator frascos agitados, em batelada e condição mesofílica;
- Avaliar o funcionamento do reator determinando as condições operacionais (temperatura e agitação) e propor um inóculo com potencial para a produção de biohidrogênio a partir de resíduos agroindustriais;
- Desenvolver estratégias de otimização de inóculos para a produção de biohidrogênio;
- Avaliar a variação da carga orgânica e do pH em função das condições reacionais de produção de H₂;
- Analisar os principais metabólitos gerados na fase líquida do reator ao final do processo de produção de H₂;
- Avaliar a composição do biogás em função das condições reacionais de produção de H₂ e do tempo de reação.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 HIDROGÊNIO

O hidrogênio é considerado o elemento mais simples e o mais comum do universo, muito reativo e de menor massa molecular. Registros indicam que em 1671, Robert Boyle produziu hidrogênio molecular (H_2) enquanto fazia experimentos com ferro e ácidos, no entanto, o hidrogênio só foi caracterizado e reconhecido como um elemento por Henry Cavendish em 1766, e nomeado pelo químico Antoine Lavoisier em 1783 com a união das palavras gregas “hidro” (água) e “genes” (gerar) (CRUZ, 2010; NEVES, 2009).

O hidrogênio não deve ser considerado como uma fonte energética, mas como um vetor energético, pois, na terra não existe quantidade significativa de H_2 livre, estando sempre associado a outros elementos, sendo assim, para que o hidrogênio seja obtido “puro” é necessário gastar energia na dissociação de uma fonte primária.

Além de ser um importante vetor energético, o hidrogênio assume um papel importante na indústria, sendo amplamente utilizado em vários setores como mostrado a TABELA 1.

TABELA 1 - APLICAÇÕES DO HIDROGÊNIO NA INDÚSTRIA.

Segmento	Aplicação
Refino de Petróleo	Remoção de enxofre de combustíveis (dessulfurização) e hidrocrackeamento
Processos Químico	Fabricação de amônia, metanol, cloro e soda cáustica
Industria Farmacêutica	Fabricação de Sorbitol, utilizado em cosméticos, vitaminas, surfactantes e adesivos
Industria Alimentícia	Utilizado na hidrogenação de óleos e no aumento da saturação de gorduras
Processos Metalúrgicos	Agente redutor de minérios metálicos
Industria Eletrônica	Utilizado no processo de fabricação de semicondutores
Geração de Energia	Utilizado como fonte de energia térmica em queimadores ou como insumo de células a combustível

FONTE: CRUZ, F.E. (2010)

Como vetor energético, o hidrogênio pode ser usado para gerar eletricidade através de células a combustível, pois, detém a maior quantidade de energia por unidade de massa do que qualquer outra substância conhecida (121.000 kJ/kg), seu alto rendimento energético é 2,75 vezes superior quando comparado aos combustíveis de hidrocarbonetos (ALVES *et al.*, 2013; AUTHAYANUN *et al.*, 2010; CUI *et al.*, 2009).

Porém, o uso do hidrogênio para fins energéticos ainda é inexpressivo no Brasil, tornando-se favorável a sua introdução gradual na matriz energética devido ao comprometimento do Ministério de Minas e Energia com as questões ambientais, conforme atesta o Acordo de Cooperação Técnica¹, celebrado pelos Ministérios de Minas e Energia e do Meio Ambiente, em 30 de março de 2004, bem como a estabilidade econômica, com tendência de crescimento sustentável nos próximos anos (MME, 2005).

Ainda de acordo com MME (2005), inicialmente a produção de hidrogênio deve utilizar o gás natural como matéria-prima devido à presença tecnologias em estágio mais avançado de desenvolvimento, este também configurar-se-á como o energético de transição para a economia do hidrogênio renovável. A partir de 2020 o hidrogênio produzido no Brasil deverá ser majoritariamente produzido a partir das energias renováveis.

Algumas matérias-primas e processos para obtenção do hidrogênio, bem como o tipo de energia utilizada estão listados na TABELA 2, é importante observar que todos os tipos de energia produzida por todas as fontes existentes, podem ser utilizados para produção de hidrogênio através da eletrólise (PARIZZI, 2008) .

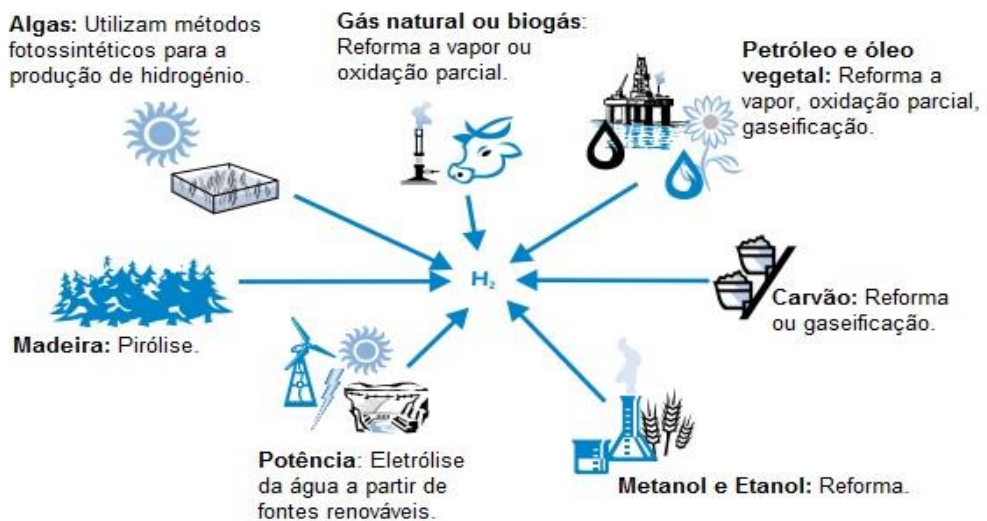
¹Acordo de Cooperação Técnica celebrado entre Ministério de Minas e Energia e Ministério de Meio Ambiente com objetivo de conjugar esforços para implementação de uma Agenda Ambiental para os setores de Energia Elétrica, Petróleo, Gás Natural e Combustíveis Renováveis, e Atividades de Geologia e Minerárias (MME, 2005).

TABELA 2 - FONTES, PROCESSOS E TIPOS DE ENERGIA UTILIZADAS NA OBTENÇÃO DE HIDROGÊNIO.

Fonte de H ₂	Energia	Processo
Água	Eletricidade	Eletrólise, Fotólise, Decomposição Termoquímica ou Processo Fotoeletroquímico.
Petróleo	Petróleo	Reforma ou Gaseificação
Lixo Urbano	Calor, eventualmente	Biológico (Biogás)
Bactérias Fermentativas	Bactérias Fermentativas	Fermentação de Compostos Orgânicos
Biomassa	Biomassa	Gaseificação
Bactérias Fotossintetizantes	Energia Solar	Biofotólise
Hidrocarbonetos Pesados	Hidrocarbonetos	Oxidação Parcial

FONTE: adaptado de PARIZZI (2008).

Outras alternativas de matéria-prima e processos para produção de hidrogênio estão ilustradas na FIGURA 1.

FIGURA 1 - ALGUMAS ALTERNATIVAS DE MATÉRIA-PRIMA E PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE H₂

FONTE: adaptado de International Energy Agency (IEA), 2006.

Dentre os vários processos de produção de hidrogênio, destacam-se na literatura: reforma do gás natural, oxidação parcial de hidrocarbonetos pesados, métodos biológicos (fotossintéticos e fermentativos) e eletrólise da água (PÉREZ, 2014). Ao tratar especificamente os processos fermentativos, estudos destacam a utilização do método conhecido como *dark fermentation*.

3.2 PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO POR *DARK FERMENTATION*

Dark fermentation é um processo relativamente simples para a produção de hidrogênio por fermentação anaeróbia (bio-hidrogênio/ bio-H₂), ocorre quando microrganismos são cultivados com substratos orgânicos e estes são degradados por oxidação para fornecer energia para o crescimento metabólico (NEVES, 2009).

Segundo Levin, Pitt, e Love (2004) *dark fermentation* é o sistema de produção biológica de hidrogênio com maior potencial. Nesse sistema a formação do hidrogênio molecular ocorre geralmente por duas vias metabólicas, pela via de decomposição de ácido fórmico que é relacionada com a via acetato (TABELA 3 – equações 9 e 10) ou pela re-oxidação da nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH para NAD⁺) relacionada às vias acetona-butanol e butirato (TABELA 3 – equações 1 e 2) (LEE *et al.*, 2011).

A quantidade de hidrogênio obtida é determinada principalmente pela relação de butirato/acetato produzido durante a fermentação, ou seja, pela via metabólica seguida pelas bactérias fermentativas (EQUAÇÕES 3 e 4) (Lee *et al.*, 2011).

Assim, os maiores rendimentos teóricos de hidrogênio estão associados ao acetato como produto final da fermentação. No entanto, na prática, as duas reações ocorrem e os rendimentos de hidrogênio estão associados a mistura do acetato e butirato como produtos finais, já os menores rendimentos estão associados ao propionato, álcoois, ácido láctico (LEVIN; PITT; LOVE, 2004), como pode ser observado na TABELA 3, onde estão demonstrados algumas reações de decomposição do piruvato.

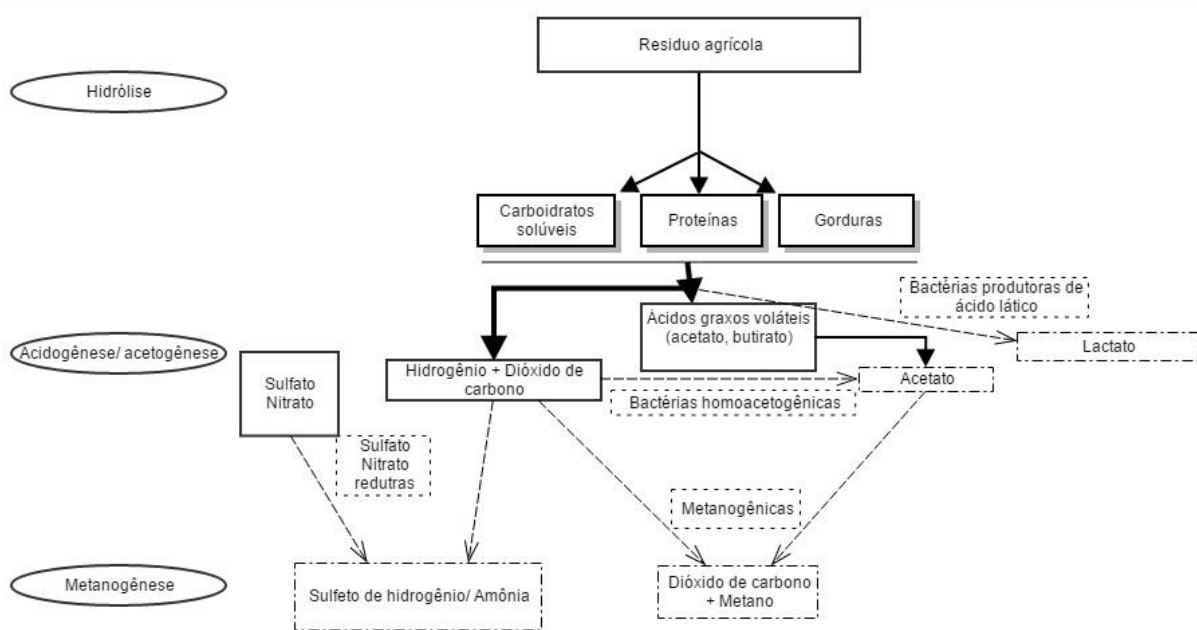
TABELA 3 - PRINCIPAIS REAÇÕES DE DECOMPOSIÇÃO DO PIRUVATO

	Eq.
$\text{NADH} + \text{H}^+ + 2\text{Fd}^{2+} \rightarrow 2\text{H}^+ + \text{NAD}^+ + 2\text{Fd}^+$	1
$2\text{Fd}^+ + 2\text{H}^+ \xrightarrow{\text{Hidrogenase}} 2\text{Fd}^{2+} + \text{H}_2$	2
$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{CH}_3\text{COOH} + 2\text{CO}_2 + 4\text{H}_2$	3
$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \rightarrow \text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH} + 2\text{CO}_2 + 2\text{H}_2$	4
Principal reação (glicólise)	
$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 2\text{NAD}^+ \rightarrow 2\text{CH}_3\text{CO}\cdot\text{COOH} + 2\text{NADH} + 2\text{H}^+$	5
Decomposição do piruvato	
Ácido láctico $\text{CH}_3\text{CO}\cdot\text{COOH} + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_3\text{CHOH}\cdot\text{COOH} + \text{NAD}^+$	6
Ácido butírico $2\text{CH}_3\text{CO}\cdot\text{COOH} \rightarrow \text{CH}_3\cdot(\text{CH}_2)_2\cdot\text{COOH} + 2\text{CO}_2$	7
Ácido fumárico $\text{CH}_3\text{CO}\cdot\text{COOH} + \text{CO}_2 + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow (\text{CH}\cdot\text{COOH})_2 + \text{H}_2\text{O} + \text{NAD}^+$	8
Ácido fórmico $\text{HCOOH} \rightarrow \text{H}_2 + \text{CO}_2$	9
Ácido acético $\text{CH}_3\text{CO}\cdot\text{COOH} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\cdot\text{COOH} + \text{HCOOH}$	10
Butanodiol $2\text{CH}_3\text{CO}\cdot\text{COOH} + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_3\cdot(\text{CHOH})_2\cdot\text{CH}_3 + 2\text{CO}_2 + \text{NAD}^+$	11
Etanol $\text{CH}_3\text{CO}\cdot\text{COOH} + 2\text{NADH} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_3\cdot\text{CH}_2\text{OH} + \text{HCOOH} + 2\text{NAD}^+$	12
Acetona $2\text{CH}_3\text{CO}\cdot\text{COOH} + \text{H}_2\text{O} + 2\text{NAD}^+ \rightarrow \text{CH}_3\text{CO}\cdot\text{CH}_3 + 3\text{CO}_2 + 2\text{NADH} + 2\text{H}^+$	13
Butanol $2\text{CH}_3\text{CO}\cdot\text{COOH} + 2\text{NADH} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_3\cdot(\text{CH}_2)_2\cdot\text{CH}_2\text{OH} + 2\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} + 2\text{NAD}^+$	14

FONTE: adaptado de TANISHO; ISHIWATA (1995).

Dessa forma, *dark fermentation* é o processo envolvido nas primeiras etapas da digestão anaeróbia e esta deve ser interrompida na etapa acidogênese para que o H_2 produzido não seja consumido para a geração de metano (GUO *et al.*, 2010; MACIEL; CRUZ; ALVES, 2015; PENTEADO, 2012; SÁ; CAMMAROTA; FERREIRA-LEITÃO, 2014). Na FIGURA 2 é possível observar um processo simplificado da digestão anaeróbia.

FIGURA 2 - ROTA METABÓLICA DE DEGRADAÇÃO DE RESÍDUOS AGRÍCOLAS. AS SETAS EM NEGRITO INDICAM AS VIAS DE PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO E AS SETAS PONTILHADAS AS VIAS QUE CONSOMEM HIDROGÊNIO



FONTE: adaptado de GUO et al., 2010.

Hallenbeck e Ghosh (2009) elencam algumas vantagens da utilização de *dark fermentation* como método de produção, entre elas estão a utilização de reatores simples, o fato de não ser necessário a utilização de luz diminuindo o gasto energético e a variedade de resíduos ou culturas energéticas que pode ser utilizados para a produção de bio-H₂.

Os açúcares simples como glicose, sacarose e lactose são facilmente biodegradáveis e, portanto, são amplamente utilizados como substratos modelo para a produção de hidrogênio em escala laboratorial. No entanto, fontes de carboidratos puros são matérias-primas caras para a produção de hidrogênio em grande escala, que só podem ser viáveis quando baseada em fontes renováveis e de baixo custo (SHOW et al., 2012).

Considerando que os resíduos da agricultura são compostos de substratos complexos e podem ser degradados biologicamente pelos ecossistemas microbianos complexos, a *dark fermentation* apresenta-se um método promissor para a produção de hidrogênio a partir desses resíduos, resíduos de animais e resíduos alimentares (GUO et al., 2010).

Diversos pesquisadores têm levado em consideração a necessidade de diminuir os gastos energéticos e os custos de produção para tornar viável a produção

biológica de hidrogênio, diante disso, tem-se utilizado resíduos de diversas áreas da agropecuária e da indústria tanto como fonte de inóculo, quanto fonte de substrato.

(Pendyala et al. 2012) utilizaram lodo de estação de tratamento de efluentes industriais e municipais como fonte de inóculo, os experimentos foram conduzidos em batelada numa temperatura de 37 °C e agitação de 200 RPM, utilizando glicose como substrato (5000 mg.L⁻¹), os autores obtiveram o máximo rendimento de hidrogênio de 1,69 mol H₂.mol substrato⁻¹.

(Zahedi et al. 2014) estudaram a evolução do microrganismo e sua relação com as diferentes etapas da produção de hidrogênio por *dark fermentation* utilizando resíduo sólido urbano como inóculo, os autores concluíram que a evolução da comunidade microbiana aumenta de acordo com o aumento da carga orgânica e é fortemente influenciado pelo teor microbiano da fração orgânica dos resíduos. Observaram também que a contribuição de microrganismos ativos nos resíduos indica que a produção de hidrogênio pode ser realizada a partir do tempo de retenção hidráulica mais baixo do que o tempo de duplicação das bactérias acidogênicas.

(Chu, Tung, e Lin 2013), com o objetivo de encontrar um modelo adequado e parâmetros cinéticos de acompanhamento para a ampliação de um reator anaeróbio para a produção de hidrogênio operado em batelada, utilizaram lodo ativado da estação de tratamento de esgoto municipal como fonte de inóculo e como substrato foi utilizado água residual de uma fábrica de cerveja com alto teor de matéria orgânica.

Entre as condições e parâmetros operacionais e físico-químicos que influenciam no resultado final do processo de produção de hidrogênio por fermentação anaeróbia encontra-se o tipo de inóculo e de substrato, tipo de reator, temperatura e o pH.

3.3 FATORES QUE INFLUENCIAM A PRODUÇÃO DE H₂ POR *DARK FERMENTATION*

3.3.1 Influência do inóculo

Há uma variedade de microrganismos com capacidade de produzir hidrogênio, eles podem ser mesofílicos ou termofílicos, anaeróbios facultativos ou obrigatórios, desde que possuam as enzimas hidrogenase ou nitrogenase (FERNANDES, 2008).

Algumas bactérias são citadas na literatura como produtoras de hidrogênio, por exemplo: *Klebsiella sp.* (CHOOKAEW; O-THONG; PRASERTSAN, 2014); *Rhodobacter capsulatus* (SILVA *et al.*, 2016); *Desulfovibrio vulgaris*, *Magashaera elsdenii*, *Citrobacter intermedius* e *Escherichia coli*, bem como, algumas bactérias dos gêneros *Enterobacter* e *Clostridium* (NEVES, 2009).

Apesar de o uso de cultura pura ser interessante considerando o entendimento em relação ao metabolismo, a aplicação de culturas puras em maior escala pode apresentar-se difícil de viabilizar devido aos problemas de contaminação (LOVATO, 2014).

A utilização de cultura mista é uma das técnicas para melhorar a produção de hidrogênio, pois, as comunidades microbianas complexas são potencialmente mais tolerantes às alterações das condições operacionais (HALLENBECK; GHOSH, 2009; HUNG *et al.*, 2011).

A utilização de culturas puras e mistas como inóculo para produção de hidrogênio vem sendo estudadas de forma a contribuir para maximizar o rendimento em H₂. As culturas mistas podem ser provenientes de resíduos, como por exemplo, o uso de lodo de estações de tratamento de águas residuais, solo, dentre outros naturalmente ricos em microrganismos anaeróbios. Na TABELA 4 estão expostos alguns trabalhos realizados usando diferentes inóculos.

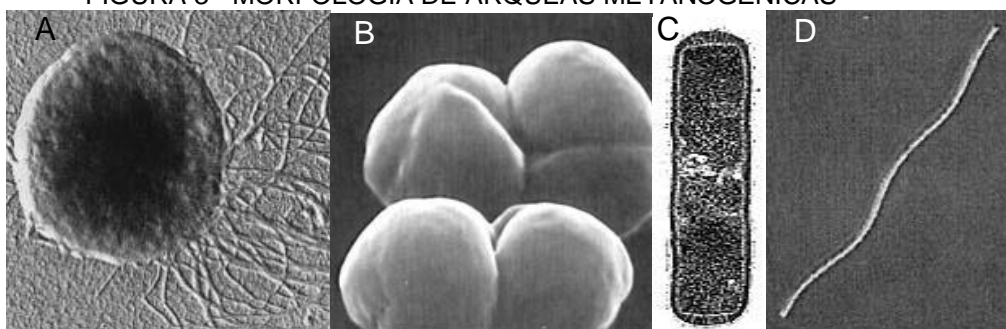
TABELA 4 - DIFERENTES TIPOS DE INÓCULO PARA A PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO POR FERMENTAÇÃO ANAERÓBIA

Microrganismo	Substrato	Modo de operação	Rendimento máximo de hidrogênio	Referência
<i>Clostridium butyricum</i>	Sacarose	Batelada	2,78 mol H ₂ .mol ⁻¹ substrato	CHEN <i>et al.</i> (2005)
Lodo (ETE)	Glicose	Batelada	1,96 mol H ₂ .mol ⁻¹ substrato	REN <i>et al.</i> (2008)
Lodo ativado (ETE)	Glicose	Batelada	1,51 mol H ₂ .mol ⁻¹ substrato	CHANG, LI; LIU (2011)
Lodo anaeróbio digerido (ETE)	Glicose	Batelada	1,77 mol H ₂ .mol ⁻¹ substrato	LUO <i>et al.</i> (2011)
Lodo anaeróbio de produção de etanol	Glicose	Batelada	1,7 mol H ₂ .mol ⁻¹ substrato	CHAGANTI; KIM; LALMAN (2012)
Lodo de digestor (ETE)	Glicose	Batelada	1,69 mol H ₂ .mol ⁻¹ substrato	PENDYALA <i>et al.</i> (2012)
Lodo de ETE	Sacarose	Batelada	4,62 mol H ₂ .mol ⁻¹ substrato	DE SÁ <i>et al.</i> (2013)
<i>Klebsiella</i> sp. (TR17)	Glicerol	Batelada	0,27 mol H ₂ .mol ⁻¹ substrato	CHOOKAEW; O-THONG; PRASERTSAN (2014)
<i>Rhodobacter capsulatus</i>	Glicose e Lactose	Batelada	208,4 mmol H ₂ L ⁻¹ de substrato	SILVA <i>et al.</i> (2016)
Lodo anaeróbio de reator de tratamento de efluente de processamento de soja	Sacarose	Contínuo	4,00 mol H ₂ .mol ⁻¹ substrato	MU <i>et al.</i> (2007)
Lodo (ETAR)	Sacarose	Contínuo	59 mmol h ⁻¹ L ⁻¹	WU <i>et al.</i> (2007)
<i>Ethanoligenens harbiense</i>	Glicose	Contínuo	1,92 mol H ₂ .mol ⁻¹ substrato	XING <i>et al.</i> (2008)

Como resultado dos processos metabólicos relacionados à diversidade microbiana, quando se utiliza cultura mista como inóculo observa-se na fase gasosa dos reatores de fermentação a presença de outros gases, principalmente metano (CH_4) oriundo da ação competitiva de bactérias e arqueas metanogênicas.

As arqueas podem apresentar-se como bacilos de diferentes tamanhos, cocos e sarcinas como apresentado na FIGURA 3.

FIGURA 3 - MORFOLOGIA DE ARQUEAS METANOGENÉICAS

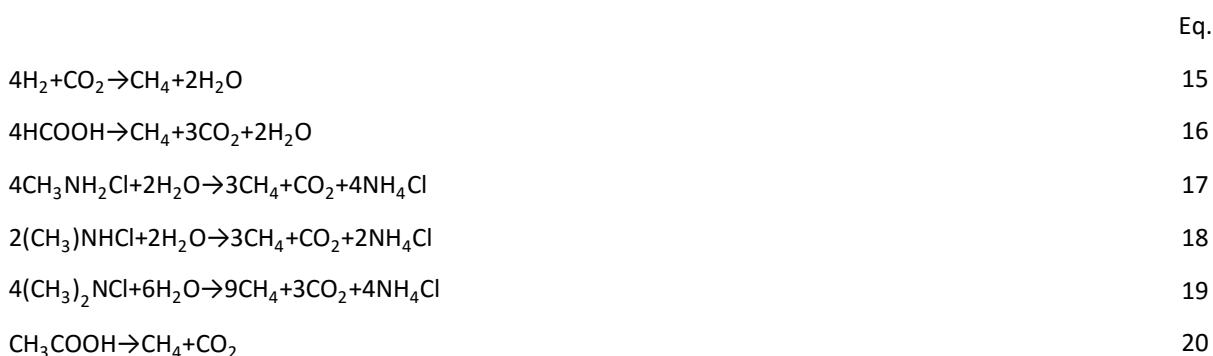


Legenda: (A) (COCO) *METHANOCOCCUS SP.*; (B) (SARCINA) *METHANOSARCINA SP.*; (C) (BACILO) *METHANOTHERMUS SP.*; (D) (BACILO) *METHANOBACTERIUM SP.*

FONTE: Imagens B e D (Departamento de Microbiologia da Universidade de Nijmegen na Holanda)
Imagens A e C (Dr. Karl O. Stetter da Universidade de Regensburg na Alemanha)

Disponível em: <<http://www2.bioqmed.ufrj.br/ciencia/Archaea.htm>>

Estão associadas ao consumo de substratos para geração de CH_4 , dentre eles o H_2 , CO_2 , acetato, formiato, CO , metanol, 2-propanol, aminas metiladas e metil mercaptanas, sendo universal o CO_2 , que necessita de H_2 como doador de elétrons. Algumas reações de conversão são exibidas a seguir:



Tais reações envolvem diversos mecanismos, enzimas e cofatores e são processos conhecidos e descritos na literatura (MOAT; FOSTER; SPECTOR, 2002).

Um fator importante a se destacar é a diminuição do rendimento de biohidrogênio, podendo ser devido competição entre microrganismos por substrato. Dessa forma, estratégias de pré-tratamento do inóculo visando controlar condições do cultivo que favoreçam a ação de bactérias produtoras de hidrogênio e que, ao mesmo tempo, inibam metanogênese e consumo de H_2 tem sido estudadas.

3.3.2 Influência do pré-tratamento do inóculo

O pré-tratamento do inóculo tem como principal objetivo selecionar as bactérias produtoras de hidrogênio e cessar a atividade das que são consumidoras. Existem vários métodos de pré-tratamento, citados na literatura, dentre eles destacam-se: tratamento com ácido, base, choque térmico, aeração e clorofórmio (WANG; WAN, 2008a).

REN *et al.* (2008) avaliaram a eficiência de quatro pré-tratamentos de inóculo para produção de hidrogênio utilizando lodo de estação de tratamento de águas residuais, os pré-tratamentos utilizados foram choque térmico, pré-tratamento com ácido, pré-tratamento com base e reaeração; sem pré-tratamento foi utilizado como controle. Os autores concluíram que o melhor pré-tratamento para o inóculo em estudo foi a reaeração, em seguida choque térmico, controle, alcalino e por último o pré-tratamento com ácido. A atividade metanogênica foi totalmente suprimida com os tratamentos: choque-térmico, ácido e aeração.

HU e CHEN (2007), avaliaram a eficiência de três pré-tratamentos para cessar a atividade de bactérias metanogênicas em lodo de esgoto, sendo eles: pré-tratamento ácido, térmico e com clorofórmio. Os autores observaram que os pré-tratamentos térmico e ácido não são completamente eficazes, já o pré-tratamento com clorofórmio pode ser completamente eficaz se a concentração for controlada a níveis baixos, caso contrário, também poderá afetar a atividade das bactérias produtoras de hidrogênio.

ZHU e BÉLAND (2006) avaliaram seis pré-tratamentos: choque térmico, aeração, ácido, base, ácido bromoetano sulfônico (BESA) e iodopropano. Os autores observaram que o pré-tratamento térmico e ácido suprimiu a atividade das bactérias metanogênicas, porém, reprimiu parcialmente a produção de hidrogênio; o BESA e

iodopropano suprimiram a atividade das bactérias metanogênicas sem impactar na produção de hidrogênio; a aeração e o inóculo sem tratamento (controle) apresentaram uma alta atividade de bactérias produtoras de hidrogênio e baixa atividade das metanogênicas; o pré-tratamento com base foi considerado o que apresentou melhores resultados, não reprimiu totalmente a atividade das metanogênicas, mas impactou significativamente na produção de hidrogênio.

DE SÁ *et al.* (2013) avaliaram o efeito dos pré-tratamentos ácido, básico e térmico a fim de inibir bactérias metanogênicas e selecionar as produtoras de hidrogênio em lodo anaeróbio, para isso, os experimentos foram conduzidos em frascos de vidro contendo sacarose como substrato. Os autores observaram que todos os pré-tratamentos testados foram eficazes na seleção de microrganismos produtores de hidrogênio, todavia, o tratamento térmico apresentou melhor resultado em relação ao rendimento máximo de hidrogênio produzido após 72 h de fermentação (4,62 mol H₂ mol⁻¹ de substrato).

A partir dos dados apresentados anteriormente, é possível observar que ainda há divergência em relação ao melhor pré-tratamento para selecionar bactérias produtoras de hidrogênio; de acordo com Penteado (2012), esse fato deve-se possivelmente pela diferença entre esses estudos em termos do inóculo, metodologia de pré-tratamento estudada, condições específicas de cada método e do tipo de substrato, na TABELA 5 estão apresentados outros trabalhos realizados com pré-tratamento de inóculo.

TABELA 5 - ESTUDOS REALIZADOS COM PRÉ-TRATAMENTO DE INÓCULO PARA PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO

Inóculo	Pré-tratamento estudado	Substrato	Tipo de reator	Rendimento máximo de hidrogênio (mol H ₂ mol ⁻¹ de substrato)	Pré-tratamento ótimo	Referência
Lodo de digestor	Básico, ácido 2-bromoetano sulfônico e iodopropano	Sacarose	Batelada	6,12	Base	Zhu e Béland (2006)
Grânulo metanogênico de UASB	Ácido, choque-térmico e clorofórmio	Glicose	Batelada	1,3	Clorofórmio 2,5 %	Hu e Chen (2007)
Lodo de decantador secundário	Choque térmico, reaeração, ácido e básico	Glicose	Batelada	1,96	Reaeração	Ren <i>et al.</i> (2008)
Lodo estabilizado	Ácido, básico, choque-térmico, areração e clorofórmio	Glicose	Batelada	1,8	Choque-térmico	Wang e Wan (2008a)
Lodo de UASB (abatedouro de aves/ dejetos de suinocultura)	Auto fermentação, choque-térmico, ácido	Sacarose	Contínuo	2,1 (Auto-fermentação) 2,0 (outros - abatedouro de aves)	Todos	Penteado (2012)
Lodo anaeróbio de tratamento de esgoto municipal	Calor, ácido, básico	Sacarose	Batelada	4,62	Calor	De Sá <i>et al.</i> (2013)
Lodo granular anaeróbio de UASB	Choque-térmico, clorofórmio, ácido, básico e choque físico	Vinhaça (mandioca)	Batelada	65,3 mL H ₂ g ⁻¹ SSV	Nenhum	Luo <i>et al.</i> (2010)
Lodo de UASB (fábrica de derivados de soja)	Ácido, base, choque térmico, calor seco e dessecação, congelamento e descongelamento	Glicerol	Batelada	5,27 (% mol.g ⁻¹ de glicerol)	Choque-térmico	Rossi <i>et al.</i> (2011)

3.3.3 Influência do substrato

Durante o processo de produção de hidrogênio diversos tipos de resíduos industriais e domésticos ricos em matéria carbonácea podem ser utilizados como substrato (REIS, 2010).

Para os materiais orgânicos serem potencialmente úteis como substrato para produção de hidrogênio, eles devem ser não apenas abundante e prontamente disponíveis, mas, também, baratos e altamente biodegradáveis (GUO *et al.*, 2010; KUMAR; KOTHARI; SINGH, 2015).

Os açúcares simples, tais como glicose, sacarose e lactose são prontamente biodegradáveis e preferidos para a produção de hidrogênio. No entanto, são matérias-primas caras, sendo assim, a utilização de resíduos orgânicos como substrato é uma alternativa conveniente (KAPDAN; KARGI, 2006).

Segundo Ginkel, Sung, e Lay (2001), em um intervalo apropriado o aumento da concentração de substrato pode aumentar a capacidade de bactérias produtoras de hidrogênio durante a produção fermentativa, no entanto, essa produção pode diminuir com concentrações de substrato em níveis mais elevados.

Kyazze *et al.* (2005) avaliaram o efeito da concentração do substrato (sacarose) no intervalo de 10 a 50 g L⁻¹. Para isso, utilizaram um reator CSTR operado a uma temperatura de 35 °C, como inóculo foi utilizado lodo de biodigestor anaeróbio para tratamento de águas residuais. A produção de H₂ contínua e estável foi obtida a partir das concentrações de sacarose (10-40 g L⁻¹), o aumento da concentração de substrato levou a uma diminuição no rendimento de H₂, de 1,7 mol H₂.mol hexose⁻¹ (sacarose 10 g L⁻¹) para 0,8 mol H₂.mol hexose⁻¹ (sacarose 50 g L⁻¹).

Chen e Lin (2003), também utilizaram sacarose como substrato para avaliar o desempenho da produção de hidrogênio em reator CSTR, o inóculo foi coletado do tanque de aeração da estação de tratamento de esgoto municipal. Os autores obtiveram o máximo rendimento de 4,52 mol H₂.mol substrato⁻¹.

Dhar *et al.* (2015), utilizaram açúcar do suco de beterraba como substrato e lodo de digestor anaeróbio como inóculo para produção de hidrogênio através de um processo integrado de *dark fermentation* e célula de eletrólise microbiana (MEC), o máximo rendimento obtido a partir de *dark fermentation* foi 3,2 mol H₂.mol hexose⁻¹ para a relação substrato/inóculo de 2 e 4 g de DQO/g de SSV.

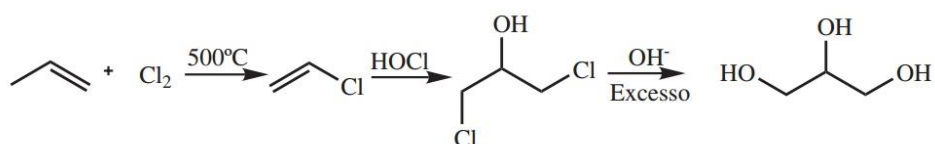
Roy *et al.* (2014), utilizaram biomassa de alga pré-tratada como substrato para produção de hidrogênio, como inóculo utilizaram cultura mista coletada de biodigestor anaeróbio de indústria de destilaria. O trabalho foi conduzido em batelada em biorreator com revestimento duplo, volume de trabalho de 250 mL e temperatura controlada a 60 °C. Os autores obtiveram 2,68 mol H₂.mol hexose⁻¹ como rendimento máximo.

O glicerol, resíduo da produção de biodiesel, também pode ser utilizado como substrato e vem sendo alvo dos pesquisadores que buscam rotas alternativas para a produção de hidrogênio, a valorização do coproduto da produção de biodiesel bem como, a redução de possíveis danos ao meio ambiente devido ao acúmulo deste resíduo.

3.3.3.1 Glicerol

O glicerol foi primeiramente descoberto em 1779 por Scheele, pelo aquecimento de uma mistura de óxido de chumbo com azeite de oliva. Ocorre naturalmente em formas combinadas, como os glicerídeos, em todos os óleos graxos animais e vegetais, e é recuperado quando estes óleos são saponificados no processo de manufatura de sabões, quando são esterificados com metanol (ou outro álcool) para a produção de metil (alquil) ésteres, ou quando estes óleos ou gorduras são hidrolisados para obtenção de ácidos graxos. Desde 1949, o glicerol também tem sido produzido comercialmente pela síntese do propileno (FIGURA 4) (APPLEBY, 2006).

FIGURA 4 - ROTA DE PRODUÇÃO DE GLICERINA A PARTIR DO PROPILENO



FONTE: MOTA; SILVA; GONÇALVES, 2009.

O termo glicerol aplica-se ao componente químico puro 1,2,3-propanotriol. O termo glicerina aplica-se aos produtos comerciais purificados, normalmente contendo pelo menos 95% de glicerol. Vários níveis e designações de glicerina estão disponíveis comercialmente. Eles diferem um pouco em seu conteúdo de glicerol e

em outras características, tais como cor, odor e impurezas (APPLEBY, 2006). Na TABELA 6 estão listadas algumas características do glicerol.

TABELA 6 - PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO GLICEROL

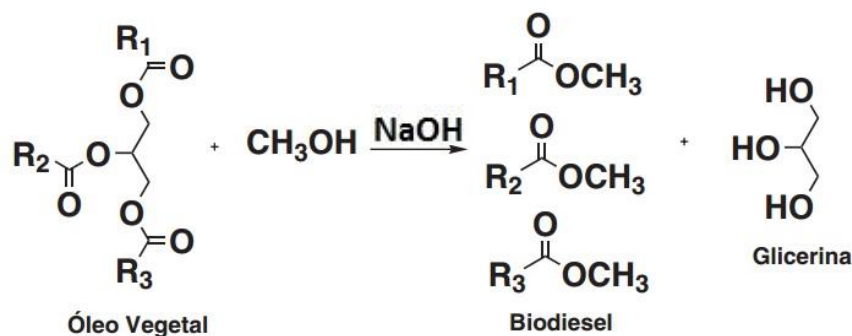
Peso molecular	92,09
Densidade específica 25°C	1,25 g/mL
Viscosidade (20°C)	1499 mPa·s
Ponto de ebulição (101,3 KPa)	290°C
Ponto de fusão	18,17°C
Ponto de inflamação	204°C
Tensão superficial 20°C	63,4 mN/m
Calor específico (glicerol 99,94%) 26°C	2,435 J/g
Calor de vaporização 55°C	88,12 J/mol
Calor de dissolução	5,8 KJ/mol
Calor de formação	667,8 KJ/mol
Condutividade térmica	0,28 W/(m·K)

FONTE: APPLEBY, (2006); NICROM (2013).

3.3.3.2 Glicerol gerado no processo de produção de biodiesel

Também pode-se aplicar o termo glicerina para definir o principal coproduto do processo de produção do biodiesel (FIGURA 5).

FIGURA 5 - PRODUÇÃO DE BODIESEL A PARTIR DA TRANSESTERIFICAÇÃO DE ÓLEOS VEGETAIS COM METANOL, USANDO CATÁLISE BÁSICA



FONTE: adaptado de MOTA; SILVA; GONÇALVES, 2009.

O biodiesel é um substituto parcial do diesel, ou seja, é utilizado em uma mistura de diesel/biodiesel numa proporção de 7% (B7). Em 2013 (B5) o total de biodiesel consumido no Brasil chegou a 2,9 bilhões de litros. Até outubro de 2015 a produção totalizou 3,3 milhões de metros cúbicos, 19,7% superior em comparação com o volume acumulado em 2014 (BIODIESEL BR, 2016).

A glicerina bruta é o coproduto líquido da usina de biodiesel e o volume desse coproduto corresponde a aproximadamente 10% do volume total de biodiesel produzido (DASARI *et al.*, 2005). A crescente disponibilidade de glicerina bruta refletiu no mercado mundial, implicando na queda do preço em vista da quantidade gerada e considerando que a glicerina bruta era inviável para a maioria dos mercados consumidores, necessitando sempre de processos de purificação.

O estabelecimento de padrões de qualidade para a glicerina proveniente das usinas de biodiesel é uma tarefa difícil, sendo o parâmetro mais importante o teor de glicerol. A glicerina bruta pode ter qualquer teor de glicerol, sua pureza pode variar bastante dependendo da eficiência do processo de produção ou mesmo das etapas de tratamento e purificação (MOTA; SILVA; GONÇALVES, 2009; SEQUINEL, 2013).

Utilizar a glicerina como matéria-prima/substrato, sem que haja a necessidade de purificação, é uma alternativa interessante tanto para a valorização desse coproduto, quanto para a redução de possíveis danos ao meio ambiente devido a seu acúmulo.

O aproveitamento da glicerina bruta vem sendo alvo de pesquisadores que buscam rotas alternativas para a produção de hidrogênio. A glicerina pode ser considerada uma matéria-prima interessante para a produção de hidrogênio inclusive pela estequiometria química da reação envolvida: um mol de glicerol pode produzir até quatro mols de H₂ (MEZALIRA, 2011).

Selembo *et al.* (2009), obtiveram 0,31 mol H₂.mol glicerina⁻¹, utilizando inóculo tratado termicamente e glicerina bruta como substrato em reator batelada. De Sá *et al.* (2013), utilizaram glicerina bruta como substrato para a produção de hidrogênio em reator batelada (vidro de soro) e lodo anaeróbio de tratamento de esgoto municipal como inóculo, atingiu um rendimento de 0,80 mol H₂.mol⁻¹ glicerina.

Chookaew, O-Thong, e Prasertsan (2014), utilizaram glicerina bruta como substrato para a produção de hidrogênio em reator batelada e *Klebsiella sp.* como inóculo, obtiveram um rendimento de 0,27 mol H₂.mol glicerina⁻¹.

Chookaew, O-Thong, e Prasertsan (2015), avaliaram dois processos fermentativos de forma consecutiva: *dark fermentation* e *foto fermentation*, os autores utilizaram glicerol bruto como substrato e obtiveram máximo rendimento de 6,42 mmol H₂. g DQO sendo que o rendimento obtido para cada processo foram 5,74 mmol H₂. g DQO e 0,68 mmol H₂. g DQO para *dark fermentation* e *foto fermentation* respectivamente.

No entanto, o tema “substrato” ainda é bastante incipiente, uma vez que para cada substrato existem uma variedade de inóculo que pode ser utilizado, diferentes reatores, bem como a variação em fatores como temperatura, pH e agitação.

3.3.4 Influência do pH

A influência do pH sobre a fermentação de hidrogênio é bastante controversa. Em geral, o pH é considerado um parâmetro fundamental devido aos seus efeitos sobre a atividade das enzimas hidrogenases, vias metabólicas, bem como, a hidrólise do substrato (DE GIOANNIS *et al.*, 2013).

Vários estudos sobre a faixa ideal de pH para a produção de hidrogênio fermentativo têm sido realizados, porém, na maioria das vezes os resultados são inconsistentes devido às diferenças entre substrato utilizado, inóculo e tipo de reator (LUO *et al.*, 2010). Sendo assim, numerosos estudos da literatura relatam os resultados de fermentação onde apenas o pH inicial foi ajustado, sem outro controle ao longo do processo (DE GIOANNIS *et al.*, 2013).

Lee *et al.* (2008), avaliaram o efeito dos pHs 5,50, 6,00, 6,50 e 7,00 na fermentação de resíduos de uma cozinha vegetariana para a produção de hidrogênio em condições termofílicas, a 55°C, e observaram que quando o pH foi mantido em 5,50 não houve produção de H₂, já em pH 6,00 observou-se a maior produção volumétrica específica de H₂, com 0,48 mmol H₂/ g SSV/h, o maior rendimento foi de 0,57 mmol H₂/g DQO em 7,00. Quando o pH foi controlado em 6,00, 6,50 e 7,00 observou-se o predomínio da formação do ácido butírico.

Zhao e Yu (2008), avaliaram o efeito do pH na produção anaeróbica de hidrogênio em reator UASB para tratamento de águas residuais, utilizando água residual sintética a base de sacarose. Os autores avaliaram pHs variando de 6,10 a 9,50 e observaram que a produção volumétrica de hidrogênio aumentou de 106 para 144 mL/L h⁻¹ com o aumento do pH de 6,10 para 7,00, em seguida, diminuiu para 89

mL/L h⁻¹ quando o pH foi aumentado para 8,00. A produção volumétrica de hidrogênio voltou a aumentar quando o pH subiu para 9,00 (137 mL/L h⁻¹) mas reduziu para 65 mL/L h⁻¹ em pH 9,50. Os autores relataram que esse comportamento pode ser explicado pela presença de algumas bactérias produtoras de hidrogênio que preferem ambientes alcalinos, por exemplo, *Eubacterium multiforme* e *Penibacillus polymyxa* que são capazes de crescer em uma faixa de pH de 9,0 a 9,5 mas ficam inativas a um pH inferior a 6,0 (CAI; LIU; WEI, 2004).

Mu, Yu, e Wang (2006) avaliaram o efeito do pH na produção anaeróbica de hidrogênio em reator UASB utilizando água residual sintética a base de sacarose como fonte de carbono. Os autores avaliaram pHs variando de 3,40 a 6,30 e observaram que a produção volumétrica de hidrogênio aumentou de 61 para 145 mL/L h⁻¹ com o aumento do pH 3,40 para 4,20, em seguida, diminuiu para 89 mL/L h⁻¹ quando o pH foi aumentado para 6,3. O rendimento de hidrogênio teve um comportamento semelhante ao observado para produção volumétrica, aumentando de 0,68 mol H₂ mol⁻¹ glicose para 1,61 mol H₂ mol⁻¹ glicose com o aumento do pH de 3,40 para 4,20, em seguida, diminuiu para 1,00 mol H₂ mol⁻¹ glicose quando o pH atingiu o valor de 6,30.

CHEN *et al.* (2005), avaliaram o efeito do pH na produção anaeróbica de hidrogênio em reator operado em batelada a uma temperatura de 37 °C, utilizando *Clostridium butyricum* como inóculo e sacarose como fonte de carbono. Os autores avaliaram pHs variando de 5,0 a 6,5 e observaram que o crescimento celular e a produção de hidrogênio foi inibida a um pH de 5,0. O maior rendimento de hidrogênio foi observado em pH 5,5, já a operação a pH 6,0 atingiu a taxa de produção de hidrogênio mais elevada do que para os outros valores de pH. Sendo assim, os autores concluíram que para esse estudo a atividade ótima para a produção de hidrogênio foi utilizando o pH na faixa de 5,5 e 6,0.

3.3.5 Influência da temperatura

A temperatura é um dos fatores mais importantes que influenciam a atividade de bactérias produtoras de hidrogênio e a produção fermentativa de hidrogênio, pois, está intimamente ligada com os parâmetros cinéticos de reação (Wang; Wan, 2009; REIS, 2010).

Alguns estudos destacam a faixa mesofílica (30-40°C) como sendo o intervalo de temperatura em que se nota alta atividade das bactérias produtoras de hidrogênio. Num intervalo apropriado, o aumento da temperatura poderia aumentar a capacidade das bactérias produtoras de hidrogênio durante a produção de hidrogênio fermentativo, já temperaturas em níveis mais elevados poderiam diminuí-la a níveis crescentes, por isso, é necessário verificar qual a melhor faixa de atuação (REIS, 2010; PENTEADO, 2012).

Lee, Lin e Chang (2006), analisaram a influência da temperatura na produção de hidrogênio em reator CIGSB, utilizando lodo de estação de tratamento de águas residuais como inóculo. Os autores observaram que a temperatura ótima para a produção de hidrogênio nesse reator foi de 40°C com uma produção volumétrica de hidrogênio de 7,66 L H₂ h⁻¹ L⁻¹ e rendimento de 3,88 mol H₂ mol⁻¹ sacarose.

Wang e Wan (2008b), avaliaram o efeito da temperatura variando de 20 a 55°C na produção de hidrogênio por fermentação em reator batelada, utilizaram lodo de tratamento de esgoto como inóculo, glicose como principal fonte de carbono e pH inicial de 7,00. Os autores observaram que a degradação do substrato mais eficiente para a produção de hidrogênio aumenta com o aumento de temperatura de 20°C para 40°C. Obtendo a máxima eficiência de degradação de substrato de 98,1%, e o máximo potencial de produção de hidrogênio de 269,9 mL, com rendimento de 275,1 ml H₂ g⁻¹ glicose.

Xiao *et al.* (2013), avaliaram quatro temperaturas para a produção de hidrogênio (30, 34, 37 e 40°C), utilizando glicose como principal fonte de carbono e *Klebsiella pneumoniae* como inóculo. Observaram que a máxima produção de hidrogênio foi de 5.363,8 ml / L com o pH inicial de 6,00 e temperatura de 37°C.

Sabe-se que, o aumento da temperatura favorece as reações químicas, porém, em temperaturas muito altas pode ocorrer a desnaturação de enzimas, interferindo na produção de hidrogênio (REIS, 2010).

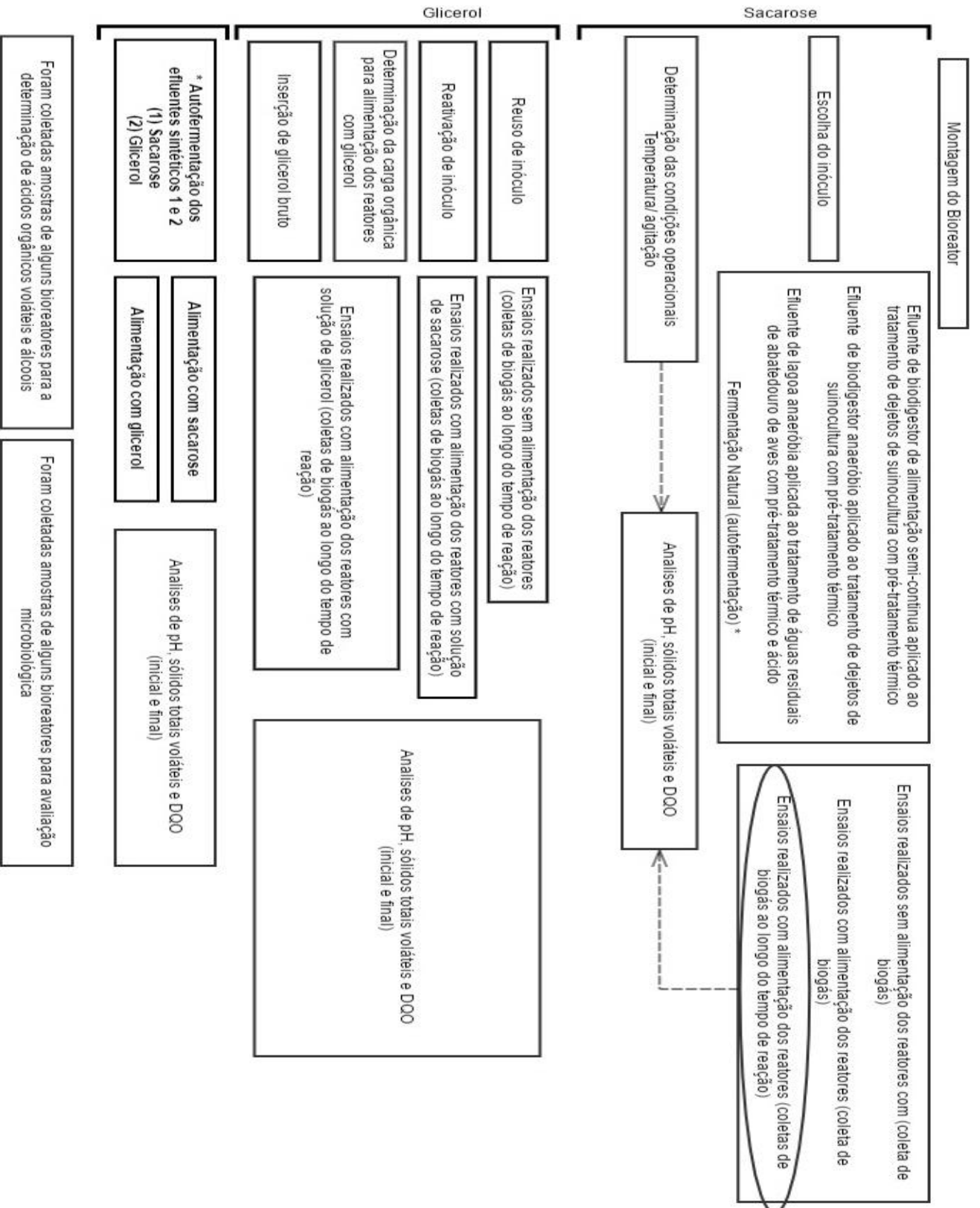
4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Catálise e Produção de Biocombustíveis da Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina, de acordo com o fluxograma apresentado na FIGURA 6.

4.1 MONTAGEM DO REATOR

Os reatores utilizados para a produção de bio-H₂ foram operados em batelada, constituídos de um frasco em vidro borossilicato de 250 mL transparente, tampa de rosca com furo para encaixe de septo, septo de silicone e dois dispositivos para punção. O septo de silicone foi acoplado à tampa e em seguida foi puncionado utilizando os escalpes, estabelecendo a tampa do frasco composto de duas mangueiras, para amostragem e para alimentação do reator quando necessária.

FIGURA 6 - FLUXOGRAMA EXPERIMENTAL



4.2 SUBSTRATO

No decorrer do trabalho foram utilizados cinco substratos diferentes, sendo eles: efluente sintético 1, efluente sintético 2, sacarose, glicerol P.A, e blendas de glicerol bruto (resíduo do processo de produção de biodiesel) e glicerol P.A.

Nas TABELAS 7 e 8 estão descritas a composição dos efluentes sintéticos 1 e 2 (adaptado de LIMA; ZAIAT, 2012).

TABELA 7 - COMPOSIÇÃO DO EFLUENTE SINTÉTICO 1

Composto	Concentração (mg/L)
Sacarose (DQO de 2000 mg L ⁻¹)	1781,24
Uréia	11,51
Fosfato de potássio monobásico	5,36
Fosfato de potássio dibásico	1,3
Fosfato de sódio dibásico 12H ₂ O	2,76
Cloreto de cálcio diidratado	2,06
Nitrato de níquel	0,5
Sulfato ferroso 7.H ₂ O	2,5
Cloreto férrico 6.H ₂ O	0,25
Cloreto de cobalto hexaidratado	0,04

FONTE: adaptado de LIMA; ZAIAT (2012)

TABELA 8 - COMPOSIÇÃO DO EFLUENTE SINTÉTICO 2

Composto	Concentração (mg/L)
Glicerol (DQO 1000 mg L ⁻¹)	769,00
Uréia	11,51
Fosfato de potássio monobásico	5,36
Fosfato de potássio dibásico	1,3
Fosfato de sódio dibásico 12H ₂ O	2,76
Cloreto de cálcio diidratado	2,06
Nitrato de níquel	0,5
Sulfato ferroso 7.H ₂ O	2,5
Cloreto férrico 6.H ₂ O	0,25
Cloreto de cobalto hexaidratado	0,04

4.3 INÓCULO

Foram utilizados os seguintes tipos de inóculos: efluente de biodigestor de alimentação semi-continua aplicado ao tratamento de dejetos de suinocultura (UFPR-Palotina) com pré-tratamento térmico (BT); efluente oriundo de biodigestor anaeróbio aplicado ao tratamento de dejetos de suinocultura de fazenda localizada na zona rural do município de Palotina-Paraná com pré-tratamento térmico (ST); amostra de lagoa anaeróbia aplicada ao tratamento de águas residuais do abatedouro de aves de uma agroindústria localizada no oeste do Paraná com pré-tratamento térmico (AT); amostra de lagoa anaeróbia aplicada ao tratamento de águas residuais do abatedouro de aves de uma agroindústria localizada no oeste do Paraná com pré-tratamento ácido (AA); autofermentação dos efluentes sintéticos 1 (AF1) e 2 (AF2).

O pré-tratamento térmico foi realizado por meio do aumento da temperatura da amostra, que consistiu em levar uma amostra do inóculo para aquecimento em banho-maria a 100°C durante 1 hora (MOHAN; BABU; SARMA, 2008). Já o pré-tratamento ácido foi realizado adicionando ácido clorídrico (HCl) 1 mol L⁻¹ até que o pH se estabilizasse em 3,0 mantendo esse valor por 24 horas (WANG; WAN, 2008a) com posterior ajuste de pH para 5,5 pela adição de hidróxido de sódio (NaOH) 1 mol L⁻¹.

Os inóculos adquiridos por autofermentação foram obtidos por fermentação natural dos efluentes sintéticos 1 e 2. Os efluentes foram deixados sobre a bancada do laboratório em béquer semiaberto durante três dias. Em seguida foram colocados em frasco reator, o pH foi ajustado (entre 5,5, e 6,0) com a adição de HCl 1 mol L⁻¹ ou NaOH 1 mol L⁻¹ e os frascos foram fechados e submetidos à atmosfera de N₂ (100%) durante 3 minutos.

Em seguida os reatores foram mantidos em agitador orbital a 35°C e 150 RPM durante 7 dias. Durante esse período foi feita a alimentação dos reatores a cada 48 horas com adição de: solução de sacarose 4 g L⁻¹ (efluente sintético 1); solução de glicerol P.A. com DQO 1000 mgO₂ L⁻¹ (efluente sintético 2).

Passados 7 dias, os efluentes foram centrifugados a 11.000 RPM durante 5 min e os pellets formados foram ressuspensos do mesmo modo nos efluentes sintéticos 1 e 2 e o processo descrito anteriormente foi repetido por mais 7 dias.

Ao final, amostras de biogás de ambos os reatores foram coletadas e levadas para análise em CG a fim de verificar a presença ou ausência de H₂. Os efluentes

foram centrifugados a 11.000 RPM durante 5 min e os pellets formados foram utilizados como inóculo para as reações descritas a seguir no tópico 4.6.

Alguns ensaios utilizaram inóculo AT enriquecido com sacarose para aumento da biomassa. Para esses ensaios o enriquecimento foi realizado utilizando frasco reator contendo 200 mL de inóculo, pH ajustado (entre 5,5, e 6,0) com a adição de HCl 1 mol L⁻¹ ou NaOH 1 mol L⁻¹, frascos fechados e submetidos à atmosfera de N₂ (100%) durante 3 minutos.

Em seguida os reatores foram mantidos em agitador orbital a 35°C e 150 RPM durante 7 dias, durante esse período foi feita a alimentação dos reatores a cada 48 horas com adição de solução de sacarose 4 g L⁻¹. Passados 7 dias, os inóculos foram centrifugados a 11.000 RPM durante 5 min e os pellets formados foram ressuspensos em efluente sintético 1.

O processo descrito anteriormente foi repetido por mais 3 vezes. Ao final, amostras de biogás de ambos os reatores foram coletadas e levadas para análise em CG a fim de verificar a presença ou ausência de H₂. Os inóculos foram centrifugados a 11.000 RPM durante 5 min e os pellets formados foram utilizados como inóculo enriquecido.

4.4 ENSAIOS PRELIMINARES UTILIZANDO SACAROSE E EFLUENTE SINTÉTICO 1 COMO SUBSTRATO

4.4.1 Avaliação dos inóculos quanto ao potencial para a produção de H₂

Os ensaios iniciais para escolha do inóculo estão descritos na TABELA 9. Todos os ensaios foram realizados com volume de *headspace* de 105 mL e 200 mL de meio reacional em que o pH foi ajustado (entre 5,5, e 6,0) com a adição de HCl 1 mol L⁻¹ ou NaOH 1 mol L⁻¹. Os reatores foram fechados e submetidos à atmosfera de N₂ (100%) durante 3 minutos em seguida mantidos em agitador orbital.

TABELA 9 - DESCRIÇÃO DOS ENSAIOS DE ESCOLHA DO INÓCULO

Ensaio	Inóculo	Proporção de inóculo (% V/V) ⁴	Substrato	Alimentação ³	Condições operacionais (Temperatura/ agitação)	Coleta de biogás (dia)
1	ST	50 ¹	Ef. sint. 1	Não	35 °C/ 150 RPM	7
2	BT	100	Sacarose ²	Não	35 °C/ 150 RPM	7
3	BT	10 ¹	Ef. sint. 1	Não	35 °C/ 150 RPM	7
4	BT	50 ¹	Ef. sint. 1	Sacarose	35 °C/ 150 RPM	11
5	AT	100	Sacarose ²	Sacarose	35 °C/ 150 RPM	11
6	BT	50 ¹	Ef. sint. 1	Sacarose	35 °C/ 150 RPM	1, 2, 7 e 11
7	AT	100	Sacarose ²	Sacarose	35 °C/ 150 RPM	1, 2, 7 e 11

¹: 200 mL do efluente foi centrifugado a 3000 RPM durante 30 minutos, o pellet formado foi ressuspensionado em efluente sintético 1; ²: mesma concentração empregada no efluente sintético 1; ³: 5 mL de solução de sacarose (4 g L⁻¹) a cada 48 horas; ⁴: proporção de inóculo em relação ao volume de meio reacional.

A cada alimentação, o volume de meio reacional foi mantido em 200 mL a partir da retirada de uma alíquota contendo o mesmo volume a ser adicionado. O biogás coletado ao longo dos ensaios foi armazenado em ampola gasométrica e levado para análise em cromatógrafo à gás (CG).

4.4.2 Avaliação da eficiência do pré tratamento do inóculo

Os ensaios descritos na TABELA 10 tiveram como objetivo determinar o pré-tratamento de inóculo que seria utilizado nas próximas etapas do presente estudo. Para este fim, realizou-se um novo ensaio utilizando inóculo com pré-tratamento ácido para fins de comparação com o ensaio 7 cujo pré-tratamento empregado foi o térmico.

TABELA 10 - DESCRIÇÃO DOS ENSAIOS DE DETERMINAÇÃO DO PRÉ-TRATAMENTO

Ensaio	Inóculo	Proporção de inóculo (% V/V) ⁵	Substrato	Alimentação ⁴	Condições operacionais (Temperatura/ agitação)	Coleta de biogás (dia)
7	AT	100	Sacarose ³	Sim	35 °C/ 150 RPM	7
8	AA ¹	20 ²	Ef. sint. 1	Sim	35 °C/ 150 RPM	7

¹: inóculo enriquecido com sacarose para aumento da biomassa; ²: 200 mL do inóculo AA enriquecido foi centrifugado a 11.000 RPM durante 5 minutos, o pellet formado foi ressuspensionado em efluente sintético 1; ³: mesma concentração empregada no efluente sintético 1; ⁴: 5 mL de solução de sacarose (4 g L⁻¹) a cada 48 horas; ⁵: proporção de inóculo em relação ao volume de meio reacional.

Os ensaios foram realizados com volume de *headspace* de 105 mL e 200 mL de meio reacional em que o pH foi ajustado (entre 5,5, e 6,0) com a adição de HCl 1

mol L⁻¹ ou NaOH 1 mol L⁻¹. Os reatores foram fechados e submetidos à atmosfera de N₂ (100%) durante 3 minutos em seguida mantidos em agitador orbital.

A cada alimentação, o volume de meio reacional foi mantido em 200 mL a partir da retirada de uma alíquota contendo o mesmo volume a ser adicionado. O biogás coletado ao longo dos ensaios foi armazenado em ampola gasométrica e levado para análise em cromatógrafo à gás (CG).

4.4.3 Determinação das condições operacionais – temperatura/ agitação

Na TABELA 11 estão descritos os ensaios realizados com o objetivo de determinar as condições operacionais (temperatura e agitação) que seriam adotadas nas próximas etapas do presente estudo.

Os ensaios foram realizados com volume de *headspace* de 105 mL e 200 mL de meio reacional em que o pH foi ajustado (entre 5,5, e 6,0) com a adição de HCl 1 mol L⁻¹ ou NaOH 1 mol L⁻¹. Os reatores foram fechados e submetidos à atmosfera de N₂ (100%) durante 3 minutos e em seguida mantidos em agitador orbital (ensaios 9 e 11) e estufa (ensaios 10 e 12).

TABELA 11 - DESCRIÇÃO DOS ENSAIOS PARA DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES OPERACIONAIS

Ensaio	Inóculo	Proporção de inóculo (%) ³	Substrato	Alimentação ²	Temperatura (°C)	Agitação (RPM)
9	AT	100	Sacarose ¹	Sim	35	150 RPM
10	AT	100	Sacarose ¹	Sim	35	s/a
11	AT	100	Sacarose ¹	Sim	28	150 RPM
12	AT	100	Sacarose ¹	Sim	28	s/a

¹: mesma concentração empregada no efluente sintético 1; ²: 5 mL de solução de sacarose (4 g L⁻¹) a cada 48 horas; ³: proporção de inóculo em relação ao volume de meio reacional; s/a: sem agitação.

A cada alimentação, o volume de meio reacional foi mantido em 200 mL a partir da retirada de uma alíquota contendo o mesmo volume a ser adicionado.

O biogás foi coletado após 7 dias de reação, armazenado em ampola gasométrica e levado para análise em cromatógrafo à gás (CG).

4.5 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE H₂ UTILIZANDO COMO SUBSTRATO O EFLUENTE SINTÉTICO 2, QUE CONTÉM GLICEROL COMO FONTE DE CARBONO

4.5.1 Reuso de inóculo

Nos ensaios descritos na TABELA 12 foram utilizados como inóculo os meios reacionais utilizados em ensaios anteriores.

TABELA 12 - DESCRIÇÃO DOS ENSAIOS REALIZADOS COM REUSO DE INÓCULO

Ensaio	Inóculo ¹	Proporção de inóculo (% V/V) ²	Substrato	Alimentação	Condições operacionais (Temperatura/agitação)	Coleta de biogás (dia)
13	Ensaio 7	20	Ef. sint. 2	Não	35 °C/ 150 RPM	1, 2, 7, 9, 11
14	Ensaio 9	20	Ef. sint. 2	Não	35 °C/ 150 RPM	1, 2, 7, 9, 11
15	Ensaio 11	20	Ef. sint. 2	Não	35 °C/ 150 RPM	1, 2, 7, 9, 11
16	Ensaio 12	20	Ef. sint. 2	Não	35 °C/ 150 RPM	1, 2, 7, 9, 11
17	Ensaio 13	20	Ef. sint. 2	Não	35 °C/ 150 RPM	1, 2, 7, 9, 11

¹: meios reacionais foram centrifugados separadamente (11.000 RPM/ 5 minutos), os pellets formados foram ressuspensos em efluente sintético 2; ²: proporção de inóculo em relação ao volume de meio reacional.

Os ensaios 13 a 17 foram feitos a partir da reutilização dos meios reacionais nos quais constatou-se a presença de H₂. Nos ensaios 13 a 16 utilizou-se meios reacionais contendo inóculo AT adaptado ao meio com sacarose, já no ensaio 17 utilizou-se o inóculo do ensaio 13 adaptado ao meio com glicerol. Para isso os meios foram centrifugados durante 5 minutos a 11.000 RPM e o pellet formado foi utilizado como inóculo.

Os ensaios foram realizados com volume de *headspace* de 105 mL e 200 mL de meio reacional em que o pH foi ajustado (entre 5,5, e 6,0) com a adição de HCl 1 mol L⁻¹ ou NaOH 1 mol L⁻¹. Os reatores foram fechados e submetidos à atmosfera de N₂ (100%) durante 3 minutos e em seguida mantidos em agitador orbital.

A cada alimentação, o volume de meio reacional foi mantido em 200 mL a partir da retirada de uma alíquota contendo o mesmo volume a ser adicionado. O biogás coletado foi armazenado em ampola gasométrica e levado para análise em cromatógrafo à gás (CG).

4.5.2 Reativação do inóculo

O objetivo do ensaio de reativação foi verificar se o inóculo ficaria inviabilizado após uma reação onde não foi observado a produção de H₂, ou se ainda estaria favorável ao uso após reativação com sacarose. Para isso utilizou-se novamente um substrato contendo sacarose como fonte de carbono (efluente sintético 1); meio reacional de um ensaio no qual a presença de H₂ não foi observada (ensaio 17) e outro onde foi observada a presença de H₂ para fins de comparação (ensaio 13), os ensaios estão descritos na TABELA 13.

TABELA 13 - DESCRIÇÃO DOS ENSAIOS REALIZADOS COM REUSO DE INÓCULO

Ensaio	Inóculo ¹	Proporção de inóculo (% V/V) ³	Substrato	Alimentação ²	Condições operacionais (Temperatura/agitação)	Coleta de biogás (dia)
18	Ensaio 13	20	Ef. sint. 1	Sim	35 °C/ 150 RPM	1, 2, 7, 9 e 11
19	Ensaio 17	20	Ef. sint. 1	Sim	35 °C/ 150 RPM	1, 2, 7, 9 e 11

¹: meios reacionais foram centrifugados separadamente (11.000 RPM/ 5 minutos), os pellets formados foram ressuspensos em efluente sintético 1; ²: 5 mL de solução de sacarose (4 g L⁻¹) a cada 48 horas; ³: proporção de inóculo em relação ao volume de meio reacional.

Os meios reacionais 13 e 17 foram centrifugados durante 5 minutos a 11.000 RPM e o pellet formado foi utilizado como inóculo. Os ensaios foram realizados com 200 mL de meio reacional em que o pH foi ajustado (entre 5,5, e 6,0) com a adição de HCl 1 mol L⁻¹ ou NaOH 1 mol L⁻¹, e 105 mL de volume de *headspace*.

Os reatores foram fechados e submetidos à atmosfera de N₂ (100%) durante 3 minutos em seguida mantidos em agitador orbital. A cada alimentação, o volume de meio reacional foi mantido em 200 mL a partir da retirada de uma alíquota contendo o mesmo volume a ser adicionado. O biogás coletado foi armazenado em ampola gasométrica e levado para análise em cromatógrafo à gás (CG).

4.5.3 Determinação da carga orgânica para alimentação dos reatores com glicerol

Os ensaios tiveram como objetivo definir qual a quantidade de carga orgânica que seria utilizada na alimentação dos reatores nos próximos ensaios. Para isso dois ensaios foram realizados conforme descrito na TABELA 14.

TABELA 14 - DESCRIÇÃO DOS ENSAIOS DE VARIAÇÃO DE CARGA ORGANICA PARA ALIMENTAÇÃO DOS REATORES COM GLICEROL

Ensaio	Inóculo/ Proporção (% V/V) ²	Substrato	Alimentação	Condições operacionais (Temperatura/ agitação)	Coleta de biogás (dia)
20	AT ¹ - 20	Ef. sint. 2	Glicerol P.A. DQO= 1.000 mgO ₂ L ⁻¹	35 °C/ 150 RPM	1, 2, 7, 9, 11
21	AT ¹ - 20	Ef. sint. 2	Glicerol P.A. DQO= 200 mgO ₂ L ⁻¹	35 °C/ 150 RPM	1, 2, 7, 9, 11

¹: inóculo enriquecido como descrito no item 4.3; ²: proporção de inóculo em relação ao volume de meio reacional.

Os ensaios foram realizados com volume de *headspace* de 105 mL e 200 mL de meio reacional em que o pH foi ajustado (entre 5,5, e 6,0) com a adição de HCl 1 mol L⁻¹ ou NaOH 1 mol L⁻¹. Os reatores foram fechados e submetidos à atmosfera de N₂ (100%) durante 3 minutos e em seguida mantidos em agitador orbital.

A alimentação dos reatores foi feita com adição de 5 mL de solução de glicerol P.A a cada 48 horas. O biogás coletado foi armazenado em ampola gasométrica e levado para análise em cromatógrafo à gás (CG).

4.5.4 Estudo da inserção de glicerol bruto na alimentação dos reatores

Foram avaliadas algumas misturas de glicerol bruto e glicerol P.A. para a alimentação dos biorreatores, identificadas da seguinte forma: misturas A e B (3:1) e misturas A e B (1:1), sendo compostas por glicerol P.A/ glicerol bruto nas proporções 3:1 e 1:1 respectivamente. Os ensaios para alimentação dos reatores, resultantes destas misturas, estão descritos na TABELA 15.

TABELA 15 - DESCRIÇÃO DOS ENSAIOS UTILIZANDO GLICEROL PURO E BRUTO PARA ALIMENTAÇÃO DOS REATORES

Ensaio	Inóculo	Proporção de inóculo (% V/V) ²	Substrato	Alimentação	Condições operacionais (Temperatura/ agitação)	Coleta de biogás (dia)
22	AT ¹	20	Ef. sint. 2	Mistura A (3:1)	35 °C/ 150 RPM	1, 2, 7, 9, 11
23	AT ¹	20	Ef. sint. 2	Mistura A (1:1)	35 °C/ 150 RPM	1, 2, 7, 9, 11
24	AT ¹	20	Ef. sint. 2	Mistura B (3:1)	35 °C/ 150 RPM	2, 7, 11
25	AT ¹	20	Ef. sint. 2	Mistura B (1:1)	35 °C/ 150 RPM	2, 7, 11

¹: inóculo enriquecido como descrito no item 4.3; ²: proporção de inóculo em relação ao volume de meio reacional.

Para as misturas A utilizou-se glicerol bruto sem nenhum pré-tratamento, para as misturas B utilizou-se glicerol bruto com pH ajustado para 6,00 e evaporação de metanol a 60 °C durante 15 minutos.

Todos os ensaios foram realizados com volume de *headspace* de 105 mL e 200 mL de meio reacional em que o pH foi ajustado (entre 5,5, e 6,0) com a adição de HCl 1 mol L⁻¹ ou NaOH 1 mol L⁻¹. Os reatores foram fechados e submetidos à atmosfera de N₂ (100%) durante 3 minutos e em seguida mantidos em agitador orbital.

A alimentação dos reatores foi feita com adição de 5 mL de solução da mistura de glicerol puro e bruto¹ com DQO de 200 mgO₂ L⁻¹ a cada 48 horas, totalizando uma inserção total teórica de 1000 mgO₂ L⁻¹. O volume total de meio reacional (200 mL) não foi alterado, pois, foram retiradas alíquotas de mesmo volume.

O biogás coletado permaneceu armazenado em ampolas gasométricas para posterior análise em cromatógrafo à gás (CG).

4.6 AUTOFERMENTAÇÃO DOS EFLUENTES SINTÉTICO 1 E 2

Os ensaios descritos na TABELA 16 foram realizados utilizando inóculo obtido a partir da fermentação natural dos efluentes sintéticos 1 e 2, preparados conforme descrito anteriormente no tópico 4.3.

Todos os ensaios foram realizados com volume de *headspace* de 105 mL e 200 mL de meio reacional em que o pH foi ajustado (entre 5,5, e 6,0) com a adição de HCl 1 mol L⁻¹ ou NaOH 1 mol L⁻¹. Os reatores foram fechados e submetidos à atmosfera de N₂ (100%) durante 3 minutos e em seguida mantidos em agitador orbital.

TABELA 16 - DESCRIÇÃO DOS ENSAIOS UTILIZANDO AUTOFERMENTAÇÃO DO EFLUENTE SINTÉTICO 1 (AF1) E EFLUENTE SINTÉTICO 2 (AF2) COMO INÓCULO

Ensaio	Inóculo	Proporção de inóculo (% V/V) ¹	Substrato	Alimentação	Condições operacionais (Temperatura/agitação)	Coleta de biogás (dia)
26	AF 1	20	Ef. sint. 1	Sacarose	35 °C/ 150 RPM	1, 2, 7, 9, 11
27	AF 2	20	Ef. sint. 2	Mistura A (3:1)	35 °C/ 150 RPM	1, 2, 7, 9, 11
28	AF 2	20	Ef. sint. 2	Mistura A (1:1)	35 °C/ 150 RPM	1, 2, 7, 9, 11
29	AF 2	20	Ef. sint. 2	Mistura B (3:1)	35 °C/ 150 RPM	2, 7, 11
30	AF 2	20	Ef. sint. 2	Mistura B (1:1)	35 °C/ 150 RPM	2, 7, 11

¹: proporção de inóculo em relação ao volume de meio reacional.

¹ Foram realizadas análises de DQO do glicerol bruto e os resultados foram compatíveis com do glicerol puro, por isso os cálculos das misturas foram baseados na DQO teórica.

A alimentação do reator 26 foi feita com adição de 5 mL de solução de sacarose (4 g L^{-1}), dos reatores 27 a 30 foi feita com a adição de 5 mL de solução da mistura de glicerol puro e bruto¹ com DQO de $200 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$ a cada 48 horas, totalizando uma inserção total teórica de $1000 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$.

O volume total de meio reacional dos reatores (200 mL) não foi alterado, pois, foram retiradas alíquotas de mesmo volume.

As misturas A e B foram compostas por glicerol P.A e glicerol bruto nas proporções 3:1 e 1:1. Para as misturas A utilizou-se glicerol bruto sem nenhum pré-tratamento, para as misturas B utilizou-se glicerol bruto com pH ajustado para 6,00 e evaporação de metanol a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 15 minutos.

O biogás coletado foi armazenado em ampola gasométrica e levado para análise em cromatógrafo à gás (CG).

4.7 CARACTERIZAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS E ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

As variáveis físico-químicas do meio reacional foram avaliadas a partir de alíquotas das fases líquida e gasosa retiradas no início e fim das reações. A demanda química de oxigênio (DQO), sólidos totais voláteis (STV) e pH foram realizadas de acordo com *Standard methods for the examination of water and wastewater* (1995).

Foram coletadas amostras de alguns reatores para a determinação de ácidos orgânicos voláteis e álcoois, realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE, em cromatógrafo Shimadzu® equipado com bomba LC 20AT, forno CTO 20^a, auto injetor SIL 20^a, detectores UV-Vis SPD 20^a e detector de índice refrativo RID 10^a, CBM 20^a e software LC Solution (Shimadzu®). A coluna utilizada para a análise dos ácidos foi Aminex HPx - 87H 300 mm x 7,8 mm; com as condições operacionais: temperatura do forno: $64 \text{ }^\circ\text{C}$, fluxo: 0,5 mL, detector UV ajustado em 210 nm e fase móvel solução aquosa de ácido sulfúrico 0,005% V/V. A mesma coluna foi utilizada para análise dos álcoois; com as condições operacionais: temperatura do forno: $47 \text{ }^\circ\text{C}$, fluxo: 0,8 mL e fase móvel solução aquosa de ácido sulfúrico 0,005% V/V. O preparo da amostra foi realizado a partir de uma alíquota de 2 mL, acidificada com 80 μL de ácido sulfúrico 2M e esta solução foi filtrada em membrana de acetato de celulose com porosidade de 0,2 μm .

¹ Foram realizadas análises de DQO do glicerol bruto e os resultados foram compatíveis com do glicerol puro, por isso os cálculos das misturas foram baseados na DQO teórica.

Algumas análises de ácidos orgânicos voláteis e álcoois foram realizadas em cromatógrafo a gás Thermo Scientific modelo Trace GC Ultra, equipado com injetor Split/splitless e detector de ionização de chama (DIC) de alta frequência, acoplado a um amostrador modelo Triplus, configurado para amostragem *headspace*, com seringa de 2,5 mL. O software ChromQuest Enterprise 4.2 foi utilizado para controlar a interface de trabalho do equipamento. A coluna utilizada foi ZEBRON ZB-WAX, de 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, fase estacionária da coluna polietilenoglicol. Temperatura do injetor: 250 °C, razão de split: 10; temperatura do forno: 35 °C (0'), rampa a 2 °C min⁻¹ até 75 °C (0'); a 30 °C min⁻¹ até 120 °C (1'); a 35 °C min⁻¹ até 170 °C (2'); a 10 °C min⁻¹ até 250 °C (4'); a 40 °C min⁻¹ até 50 °C. Gás de arraste: hélio 1,6 mL min⁻¹, temperatura do detector: 260 °C. As condições de amostragem por *headspace* foram: temperatura de aquecimento da amostra: 100 °C, por 13 minutos; temperatura da seringa: 90 °C; volume injetado: 500 µL; tempo de lavagem da seringa com N₂ (3 minutos).

Para a determinação da composição dos gases do *headspace* dos biorreatores, a coleta do biogás foi realizada com auxílio de seringa de vidro, o mesmo foi transferido para ampolas gasométricas de 35 mL com auxílio de um adaptador. O biogás ficou armazenado nas ampolas até o momento da análise.

A análise foi realizada por cromatografia em fase gasosa utilizando CG Thermo Finnigan modelo Trace GC, equipado com detector de condutividade térmica (DCT) e coluna Poropak 30 m x 0,320 mm. O gás de arraste utilizado foi argônio com vazão de 2,734 mL.min⁻¹, temperatura do injetor foi de 130 °C, *split* com fluxo de 41 mL.min⁻¹ e volume de injeção de 1,0 µL. A temperatura do forno foi programada em: inicial 45 °C (10 min); final 130 °C (0 min); rampas 15 °C/min iniciando em 10 minutos. A coleta do gás foi realizada em ampolas gasométricas para posterior análise no CG.

Ao final da reação também foram retiradas amostras para avaliação microbiológica de alguns biorreatores. A identificação foi feita através da coloração de Gram utilizando o kit para coloração de Gram Laborclin[®], e microscopia óptica comum através de objetiva de imersão utilizando microscópio Primo Star ZEISS[®] adaptado com câmera Mikroskop kamera Axiomac Cerc5s e software AxioVision Release 4.8.2 para captura de imagens.

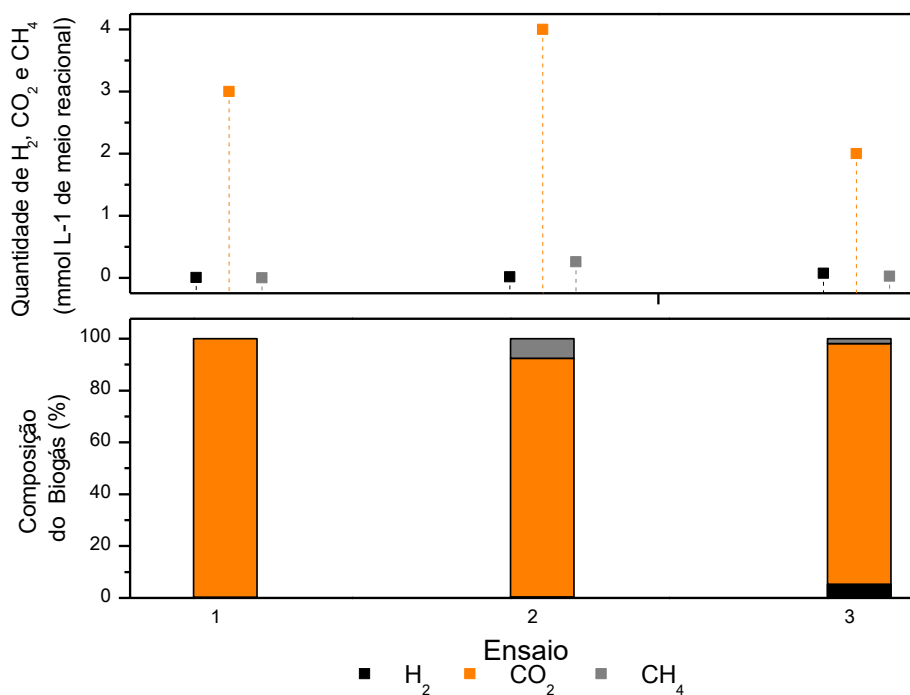
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ENSAIOS PRELIMINARES UTILIZANDO SACAROSE E EFLUENTE SINTÉTICO 1 COMO SUBSTRATO

5.1.1 Avaliação dos inóculos quanto ao potencial para a produção de H₂

Nessa primeira etapa experimental foram avaliados os ensaios descritos na TABELA 9, a fim de analisar o potencial de produção de H₂ de três inóculos: ST, BT 100% e BT 10%. Os resultados de composição do biogás (mmol) e fração molar (%) dos ensaios 1, 2 e 3 estão descritos na FIGURA 7.

FIGURA 7 - COMPOSIÇÃO DO BIOGÁS (%) E QUANTIDADE DE MATÉRIA (MMOL) EM TERMOS DE H₂, CO₂ E CH₄ PARA OS ENSAIOS 1,2 E 3; TEMPO DE REAÇÃO: 48 HORAS.



Os resultados obtidos para este conjunto de ensaios (1,2 e 3) apresentam baixa produção de H₂, com o maior rendimento observado para o ensaio 3 (0,07 mmol H₂ L⁻¹ meio reacional), sendo que os ensaios 1 e 2 resultaram em 0,004 e 0,01 mmol H₂ L⁻¹ meio reacional respectivamente. Apenas no ensaio 1 não observou-se a presença de metano (CH₄).

Tratando-se de fração molar do biogás, observou-se 5,3% de H₂ para o ensaio 3 utilizando fase sólida de BT como inóculo, para os ensaios 1 e 2 foi observada a presença de H₂ em concentrações ainda menores: 0,3 e 0,4% respectivamente.

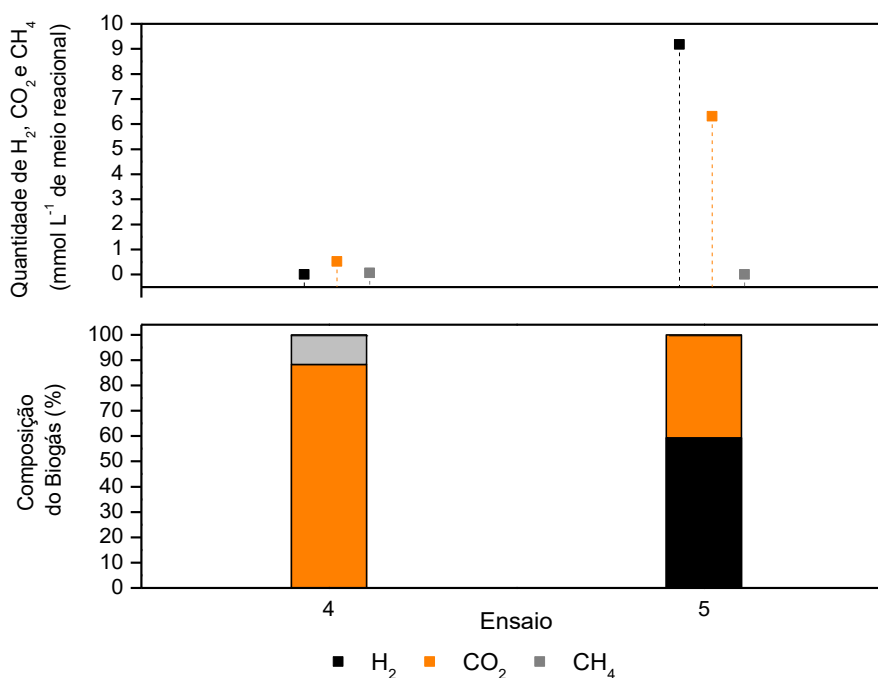
A baixa produção de H₂ pode ter sido consequência da utilização de inóculos muito diluídos. Sabe-se que a saída de biodigestores anaeróbios contém microrganismos produtores de biogás. Entretanto, na literatura encontram-se diversos trabalhos que utilizam lodos granulados provenientes de uma fração concentrada de biodigestores (fundo), como exemplo: De Sá *et al.* (2013) e Zhu e Béland (2006); ambos os trabalhos utilizaram lodo anaeróbio como inóculo para produção de hidrogênio e obtiveram o máximos rendimentos de 4,62 e 6,12 mol H₂ mol⁻¹ sacarose, respectivamente.

No presente estudo o referido inóculo não é lodo propriamente dito, trata-se do efluente do biodigestor, ou seja, uma fração líquida onde o inóculo encontra-se diluído. Apenas no ensaio 3 onde obteve-se o melhor rendimento, o inóculo estava concentrado, visto que foi realizada a etapa prévia de centrifugação. Ainda neste caso o resultado observado foi bastante inferior ao encontrado na literatura (1,77 mol H₂ mol⁻¹ substrato (LUO *et al.*, 2011); 1,7 mol H₂ mol⁻¹ substrato (CHAGANTI; KIM; LALMAN, 2012).

Portanto, uma hipótese a ser considerada é a baixa concentração de microrganismos, sugerindo a necessidade de empregar uma estratégia de enriquecimento desses inóculos para um possível aumento da biomassa. Outra hipótese a ser considerada é a baixa concentração de substrato ao longo da reação. Sabendo que os microrganismos requerem fontes de carbono para seu metabolismo, considerou-se a possibilidade dos ensaios serem feitos com alimentação dos reatores durante o tempo de duração da reação para manter a concentração de substrato elevada.

Sendo assim, os resultados obtidos para os ensaios 4 e 5 (alimentados com solução de sacarose) estão demonstrados na FIGURA 8.

FIGURA 8 - COMPOSIÇÃO DO BIOGÁS (%) E QUANTIDADE DE MATÉRIA (MMOL) EM TERMOS DE H₂, CO₂ E CH₄ PARA OS ENSAIOS 4 E 5. ENSAIOS COM ALIMENTAÇÃO DOS REATORES, TEMPO DE REAÇÃO: 11 DIAS.



Os resultados apresentados na FIGURA 8 mostram que houve produção de H₂ apenas para o ensaio 5 e esta mostrou-se maior em relação aos resultados obtidos nos primeiros ensaios, sendo 9,2 mmol H₂ L⁻¹ meio reacional totalizando 59,3% de H₂ em termos de fração molar. Ao contrário do ensaio 5, no ensaio 4 não ocorreu a presença de H₂, no entanto nota-se a presença de CH₄ (0,07 mmol CH₄ L⁻¹ meio reacional).

Em vista disso, outras duas hipóteses podem ser consideradas: a primeira sugere que para o inóculo BT o pré-tratamento empregado não eliminou completamente as arqueas metanogênicas. A segunda hipótese considera o tempo de coleta do biogás que, nesta etapa de triagem, foi realizada somente ao final do experimento, ou seja, mesmo para esse inóculo é possível que tenha ocorrido produção de H₂ no início da reação e este ter sido consumido para produção de CH₄.

Na literatura encontram-se estudos onde atinge-se produção elevada de H₂ a partir de 48 horas (SU *et al.*, 2010). Para verificar esta hipótese é necessário avaliar a composição do biogás desde o início e ao longo do tempo de reação.

5.1.1.1 Ensaios realizados com coletas ao longo do tempo de reação

A partir dessa etapa, parâmetros como pH (inicial e final), STV e DQO foram monitorados a fim de verificar o comportamento nos reatores em relação a geração de ácidos, e quando possível observou-se também aumento ou remoção da DQO. É importante salientar que no decorrer do trabalho esses parâmetros não foram ajustados, apenas monitorados, exceto pH inicial.

Sendo assim, para os ensaios 6 e 7 realizados com alimentação dos reatores e coletas ao longo do tempo de reação (dias 1, 2 7 e 9), os resultados de pH obtidos ao início e fim da reação, STV inicial e DQO inicial para ambos os ensaios estão descritos na TABELA 17.

TABELA 17 - RESULTADOS DE pH OBTIDOS NO INÍCIO E FIM DE CADA REAÇÃO, STV INICIAL E DQO INICIAL DOS ENSAIOS 6 E 7

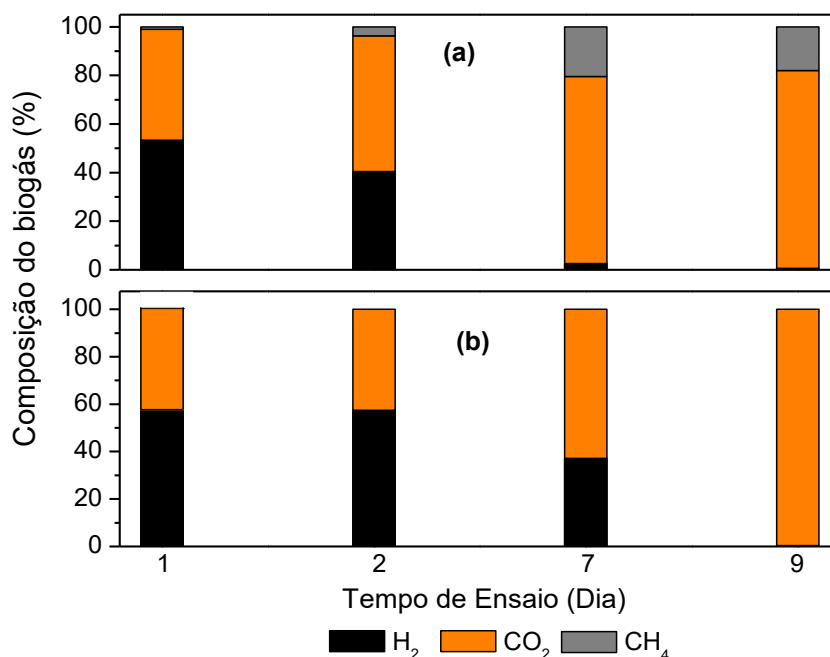
Ensaio	pH inicial/ final	STV (g L ⁻¹) Inicial	DQO (g de O ₂ L ⁻¹) Inicial
6	5,6/ 3,8	1,86	12,58
7	5,6/ 2,7	1,42	13,56

A elevada concentração de DQO inicial observada para ambos os ensaios se dá em virtude da amostra de lagoa anaeróbia, pois, a DQO referente a sacarose adicionada ao meio reacional é de 2 g de O₂ L⁻¹.

Em relação ao pH, nota-se uma diminuição considerável para ambos os ensaios. O pH tem efeito direto com a produção de H₂ devido a sua relação com a atividade das enzimas hidrogenase e nitrogenase e está relacionado aos caminhos metabólicos (ocorre de forma simultânea a produção de ácidos orgânicos) bem como, com a hidrólise dos substrato (LAY, 2001; DE GIOANNIS *et al.*, 2013; LOVATO, 2014). Sendo assim, o abaixamento do pH pode estar relacionado a produção de H₂.

Na FIGURA 9 estão demonstrados os resultados de composição do biogás (%) para os ensaios 6 e 7.

FIGURA 9 - COMPOSIÇÃO DO BIOGÁS AO LONGO DO TEMPO DE REAÇÃO PARA OS ENSAIOS 6 (A) E 7 (B). ENSAIOS COM ALIMENTAÇÃO DOS REATORES.



Para o ensaio 6 o maior rendimento de H₂ (6,3 mmol L⁻¹ meio reacional) foi obtido em 24 horas de reação é correspondente a 53,4% de H₂ no biogás. Após 48 horas, embora a composição de H₂ no biogás ainda seja significativa (40,4%) a quantidade de H₂ calculada diminui para 2,3 mmol L⁻¹, o que está relacionado ao grande volume de amostra coletado, pois, a cada coleta são retirados 25 mL de biogás do *headspace*, interferindo no equilíbrio da reação.

Para o ensaio 7 obtém-se 8,3 mmol H₂ L⁻¹ meio reacional em 24 horas, num biogás composto por 57,7% de H₂, após 48 horas ainda se observa um biogás com elevado percentual de H₂ (57,4%), no entanto, a quantidade de H₂ calculada diminui para 6,4 mmol H₂ L⁻¹ meio reacional, devido as mesmas circunstâncias citadas para o ensaio 6.

Por outro lado, não significa que a interferência ocasionada pela remoção do H₂ acumulado é de todo negativa. LAMED; LOBOS; SU, 1988, avaliaram a cinética de acumulação de H₂ na fase gasosa de culturas agitadas e não agitadas de *C thermocellum* YS, utilizando células em repouso com a adição de cloranfenicol (inibidor da síntese de proteínas) para inibição do crescimento celular permitindo que as células continuem metabolicamente ativas. Os autores concluíram que o acúmulo de H₂ na fase gasosa reduz a taxa de evolução de H₂ a partir do meio reacional, e

que, a taxa inicial de acúmulo de H_2 pode ser restaurada após o H_2 da fase gasosa ter sido removido com um arraste de N_2 .

Deste modo, entende-se que o acúmulo de H_2 pode contribuir para a inibição de sua produção, sugerindo que seja feita a retirada de H_2 do *headspace*. Mas para que isso ocorra sem prejuízo para a reação deve-se coletar o H_2 acumulado com o auxílio de corrente de N_2 .

Assim sendo, da forma como foi conduzido os ensaios no presente estudo, observa-se que para ambos obteve-se um biogás rico em H_2 nos primeiros dias de reação e o percentual de H_2 foi diminuindo com o passar dos dias.

É interessante ressaltar que não houve produção de CH_4 durante o experimento 7, indicando que o pré-tratamento aplicado atende o objetivo proposto. Diferente do ensaio 6 (inóculo BT), onde observa-se novamente a presença de CH_4 , sugerindo mais uma vez que para este tipo de inóculo o pré-tratamento empregado não elimina completamente as arqueas metanogênicas, que ocorre possivelmente pelo fato de algumas bactérias metanogênicas serem formadoras de esporos e terem sobrevivido ao tratamento térmico empregado.

Ainda sobre o ensaio 6, nota-se que o decréscimo no percentual de H_2 é acompanhado do aumento de CH_4 , que teve seu máximo rendimento (20,47% CH_4) no dia 7, mesmo ponto em que o rendimento de H_2 diminuiu bruscamente (2,5% H_2). Este evento pode estar relacionado a ação de bactérias hidrogenotróficas que convertem o H_2 e CO_2 produzidos na etapa anterior em CH_4 , sendo assim, ao passo que a produção de H_2 diminui, observa-se o aumento da produção de CH_4 mesmo em baixas condições de pH, pois, segundo Foresti (1998), o pH ideal para a biodigestão anaeróbia (processo no qual o CH_4 é produzido durante a etapa de metanogênese) é de 6 a 8.

Nesses ensaios, os percentuais de H_2 obtidos representam biogás típico de fermentação anaeróbia descritos na literatura. O-thong, Prasertsan e Birkeland (2009), realizaram experimentos em batelada para produção de H_2 em ensaios conduzidos a 60 °C e agitação de 200 RPM, utilizando lodo anaeróbio proveniente de biodigestor de uma fábrica de óleo de palma como inóculo, sacarose como substrato e pH inicial de 5,5. Obtiveram biogás contendo 58% de H_2 e rendimento de 1,96 mol H_2 L⁻¹ de substrato.

Diante dos resultados obtidos, o inóculo escolhido para utilização nas próximas etapas foi efluente oriundo de lagoa anaeróbia aplicada ao tratamento de

águas residuais de abatedouro de aves, por apresentarem resultados significativos de produção de H_2 , não apresentar CH_4 em nenhum dos ensaios até então, e por fim, devido a disponibilidade e facilidade de obtenção.

5.1.2 Avaliação da eficiência do pré tratamento do inóculo

Para esta etapa testou-se um pré-tratamento diferente do utilizado anteriormente, o pré-tratamento ácido (AA) e os resultados obtidos para este ensaio foram comparados com o obtido para o ensaio 7 (AT). Os resultados de pH obtidos ao início e fim da reação, STV inicial e DQO inicial para ambos os ensaios estão descritos na TABELA 18.

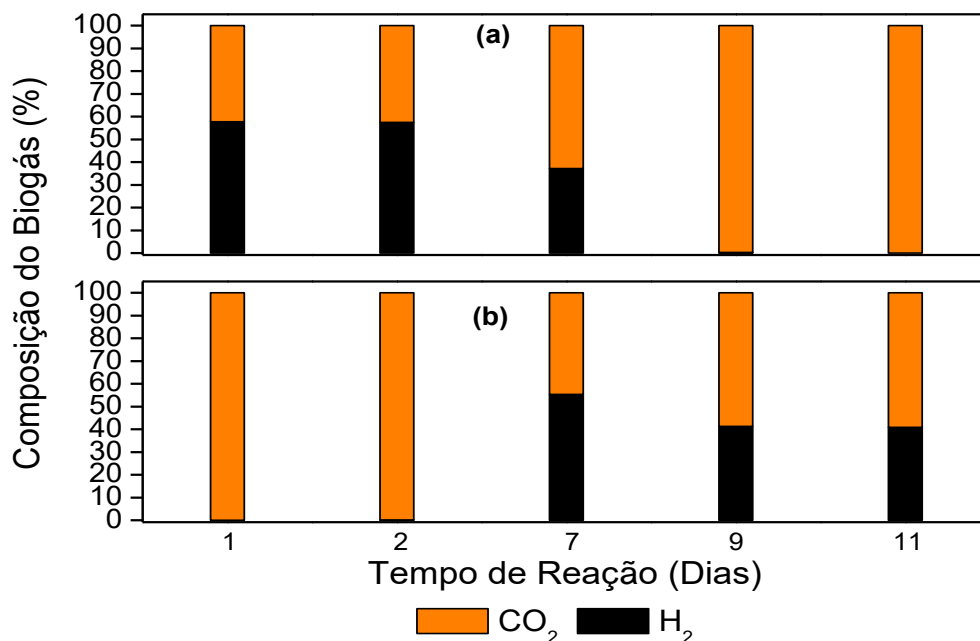
TABELA 18 - RESULTADOS DE pH OBTIDOS NO INÍCIO E FIM DE CADA REAÇÃO, STV INICIAL E DQO INICIAL DOS ENSAIOS 7 E 8

Ensaio	pH inicial/ final	STV ($g L^{-1}$) Inicial	DQO ($g de O_2 L^{-1}$) Inicial
7	5,6/ 2,7	1,42	13,56
8	5,8/ nd	0,49	11,19

nd: não determinado.

Assim como ocorrido nos ensaios anteriores, para o ensaio 8 também observou-se concentração de DQO inicial elevada. Não foi possível monitorar o pH final do ensaio 8, no entanto, deduz-se que a diminuição do pH pode ter ocorrido tal qual foi observado no ensaio 7, devido a presença de H_2 , sugerindo que ocorreu a formação de ácidos orgânicos. Os resultados de produção de H_2 podem ser observados na FIGURA 10.

FIGURA 10 - COMPOSIÇÃO DO BIOGÁS (%) AO LONGO DO TEMPO DE REAÇÃO PARA OS INÓCULOS AT (A) E AA (B) (ENSAIOS 7 E 8 RESPECTIVAMENTE). ENSAIOS COM ALIMENTAÇÃO DOS REATORES



Como resultado, tanto para o pré-tratamento térmico quanto para o ácido não houve produção de CH₄, sugerindo que ambos os pré-tratamentos atendem o objetivo proposto.

Para o ensaio 7, conforme já foi exposto anteriormente, a produção de H₂ iniciou-se nas primeiras 24 horas de reação com o máximo rendimento de 57% de H₂ (8,3 mmol H₂ L⁻¹ meio reacional) e o elevado percentual de H₂ permaneceu até o sétimo dia. Já para o ensaio 8 os resultados exibiram maior fase de adaptação ao novo ambiente, não sendo observada significativa produção de H₂ nos dias 1 e 2. Ao sétimo dia de reação notou-se a produção de 1,8 mmol H₂ L⁻¹ meio reacional, obtendo um biogás composto de 55,4% de H₂. Nos dias 9 e 11 o biogás produzido permaneceu com 40,0 e 41,3% de H₂ respectivamente.

Ao contrário do ensaio 7, onde foi verificada a diminuição da produção de H₂ ao longo do tempo, no ensaio 8 a produção aumentou expressivamente do segundo dia de reação para o sétimo dia (0,01 para 1,8 mmol H₂ L⁻¹ meio reacional) corroborando com os resultados observados por Lamed, Lobos, e Su (1988) discutido no tópico anterior, e comprovando que a remoção do H₂ acumulado não interfere negativamente.

O pré-tratamento do inóculo tem como principal objetivo cessar a atividade das bactérias produtoras de CH₄ que consomem H₂. Existem vários métodos de pré-

tratamento, citados na literatura, dentre eles destacam-se: tratamento com ácido, base, choque-térmico, aeração, clorofórmio e térmico (GINKEL; SUNG; LAY, 2001; WANG; WAN, 2008a).

De Sá *et al.* (2013) avaliaram o efeito dos pré-tratamentos ácido, básico e térmico a fim de inibir bactérias metanogênicas em lodo anaeróbio. Os autores também observaram que todos os pré-tratamentos testados foram eficazes na seleção de microrganismos produtores de hidrogênio, todavia, o tratamento térmico apresentou melhor resultado em relação ao rendimento máximo de hidrogênio.

Vale ressaltar que o pré-tratamento aqui chamado de “térmico” (igualmente chamado de choque-térmico por vários autores) pode ser confundido com outro pré-tratamento de choque-térmico que também é muito utilizado em estudos de produção de H₂. Choque-térmico também consiste em elevar a temperatura do inóculo até 100 °C, no entanto, permanece a essa temperatura por apenas 15 minutos, em seguida resfria-se a temperatura ambiente dentro de poucos minutos (WANG; WAN, 2008a; ROSSI *et al.*, 2011).

O-Thong *et al.* (2009) avaliaram o efeito de cinco pré-tratamentos (ácido; base; ácido 2-bromoethanesulfonic (BESA); choque de carga e choque-térmico), nesse caso o que os autores chamam de choque-térmico é o mesmo pré-tratamento empregado no presente estudo (100 °C por 1h), os referidos autores adotaram choque de carga e choque-térmico como melhores resultados e concluíram que o choque de carga seria mais estável para produção de H₂ a longo prazo por conter alta diversidade microbiana.

Mu, Yu, e Wang (2007) avaliaram três pré-tratamentos: ácido, básico e térmico, obtiveram o maior rendimento de H₂ (2,00 mol H₂ mol⁻¹ de substrato) com o pré-tratamento térmico.

Devido à relativa simplicidade e curta duração do tratamento térmico em relação ao ácido, e considerando vantajoso que a produção de H₂ foi observada logo no primeiro dia de reação, optou-se por continuar a utilizar o pré-tratamento térmico.

5.1.3 Determinação das condições operacionais – temperatura/ agitação

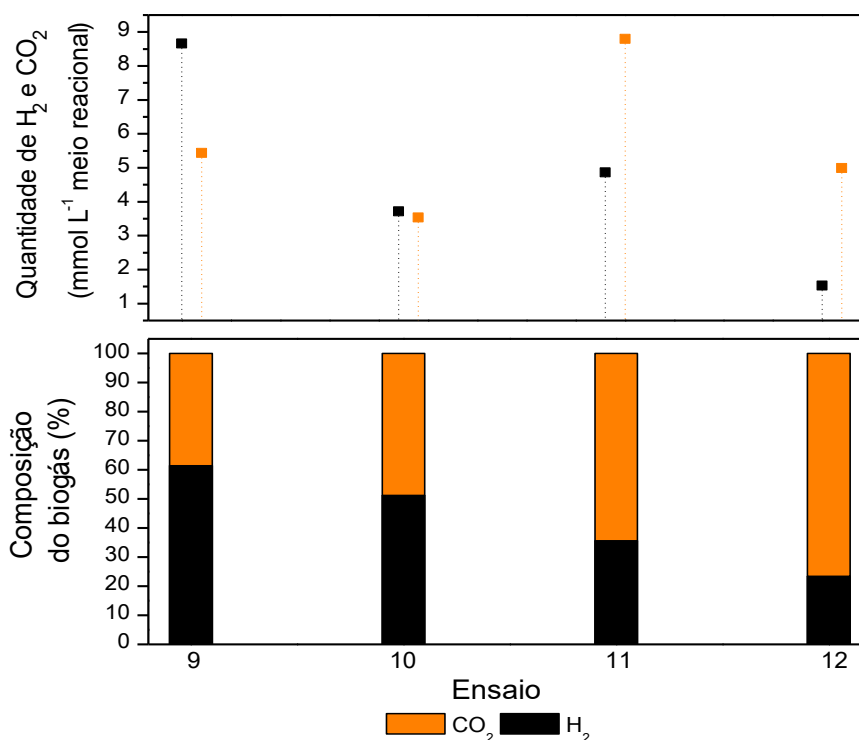
Temperatura é um fator importante para a digestão anaeróbia, pois, está intimamente ligada com parâmetros cinéticos de reação (REIS, 2010). A temperatura pode ser agrupada sob uma das seguintes categorias: psicrófila (0 - 20 °C),

mesofílica (20 – 42 °C) e termofílica (42 – 75 °C). As alterações de temperatura são bem toleradas por bactérias anaeróbias, desde que não exceda o limite superior que é definido pela temperatura no qual a taxa de decomposição começa a exceder a de crescimento (RAJESHWARI *et al.*, 2000). Ou seja, a fase de declínio, esse limite de temperatura varia de acordo com a faixa de temperatura que o microrganismo tolera.

Outro parâmetro bastante utilizado em estudos que avaliam a produção de hidrogênio em batelada é a agitação dos reatores. Diversos estudos para produção de hidrogênio utilizam agitação orbital para manter a movimentação do material no biorreator e promover a transferência de substrato para as células suspensas. O-Thong *et al.* (2009) utilizaram agitação orbital de 200 RPM a 60 °C; De Sá *et al.* (2013) utilizaram agitação orbital de 100 RPM a 35 °C e Neves (2009), avaliou a produção de hidrogênio com agitação de 150 RPM e temperaturas de 30 e 37 °C.

No presente trabalho as temperaturas avaliadas foram 28 e 35 °C, agitação orbital de 150 RPM e sem agitação orbital. Os resultados de quantidade de matéria (mmol) e fração molar do biogás (%) estão expostos na FIGURA 11.

FIGURA 11 - PRODUÇÃO DE H₂ E CO₂ (mmol) E COMPOSIÇÃO DO BIOGÁS (%) PARA OS ENSAIOS 9 (35 °C – 150 RPM), 10 (35 °C – SEM AGITAÇÃO), 11 (28 °C – 150 RPM) E 12 (28 °C – SEM AGITAÇÃO).



Nota-se que os resultados em termos de mmol de H₂ obtidos para os ensaios com agitação orbital de 150 RPM foram superiores aos obtidos para os de ensaios sem agitação. Em termos percentual de H₂ os resultados obtidos para os reatores conduzidos a temperatura de 35 °C mostraram-se superiores em relação a porcentagem de H₂.

O maior rendimento em mmol e percentual de H₂ foi obtido para o ensaio 9 operado a 35 °C com agitação orbital de 150 RPM (8,6 mmol L⁻¹ meio reacional), correspondendo a 61,4% de H₂ no biogás. Para o ensaio 10 (35 °C - sem agitação) os resultados obtidos foram de 3,7 mmol L⁻¹ de reação, correspondendo a 51,2% de H₂. Os resultados obtidos para os ensaios 11 (28 °C - 150 RPM) e 12 (28 °C - sem agitação) foram de 4,9 e 1,5 mmol L⁻¹ meio reacional, correspondendo a 35,6 e 23,4% de H₂ respectivamente.

Lay (2000), relatou que o aumento da velocidade de agitação do reator de 100 a 700 RPM promoveu um aumento de 2,3 vezes na produção de hidrogênio. No presente estudo os menores rendimentos (mmol) foram observados nos reatores que permaneceram em repouso, de acordo com Rabelo (2014) isso ocorre possivelmente porque a transferência de substrato pode ter sido comprometida.

Em relação a temperatura, alguns estudos destacam a faixa entre 25 – 60 °C como sendo o intervalo de temperatura em que se nota alta atividade das bactérias produtoras de hidrogênio (WANG; WAN, 2009). No entanto, grande parte dos estudos para produção de H₂ são feitos em temperatura mesofílicas: 30 °C (ROY *et al.*, 2014); 37 °C (CHEN *et al.*, 2005); 40 °C (LEE; LIN; CHANG, 2006); 35 °C (CHU; TUNG; LIN, 2013; WANG; WAN, 2008b).

Diante dos resultados obtidos, as condições operacionais adotadas para os próximos ensaios foram temperatura de 35°C e agitação de 150 RPM.

5.2 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE H₂ UTILIZANDO COMO SUBSTRATO O EFLUENTE SINTÉTICO 2, QUE CONTÉM GLICEROL COMO FONTE DE CARBONO

5.2.1 Reuso de inóculo

Para os ensaios iniciais utilizando glicerol como fonte de carbono utilizou-se efluente sintético 2 como substrato, reuso de inóculo e coletas ao longo do tempo sem alimentação dos reatores.

Os resultados de composição do biogás observados para esses ensaios variaram desde a presença de H₂ e CO₂, presença apenas de CO₂, presença de CO₂ e CH₄, até a ausência de atividade fermentativa caracterizada pela total ausência de produção de quaisquer gases. Os ensaios que produziram H₂ foram os ensaios 13 (FIGURA 12) e 15 (FIGURA 13).

FIGURA 12 - COMPOSIÇÃO DO BIOGÁS (%) E PRODUÇÃO DE H₂ E CO₂ (mmol) AO LONGO DO TEMPO PARA O ENSAIO 13. ENSAIO SEM ALIMENTAÇÃO DOS REATORES

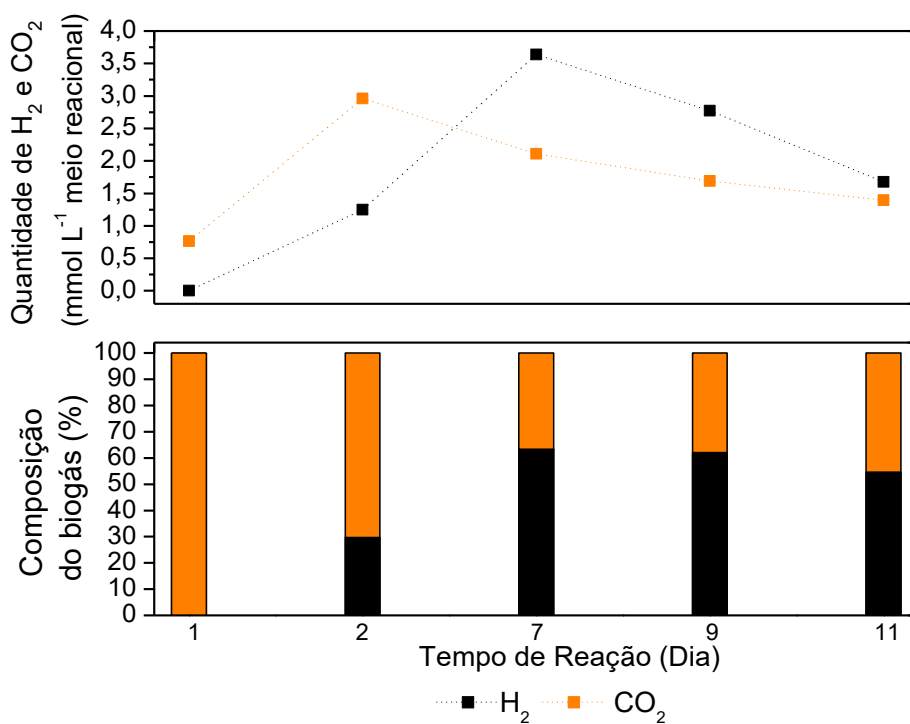
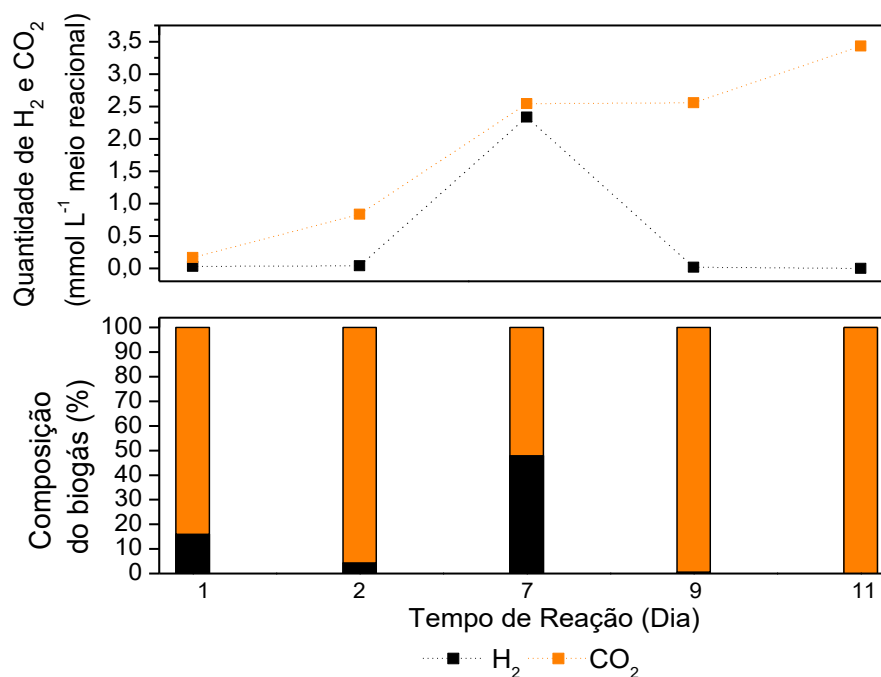


FIGURA 13 - COMPOSIÇÃO DO BIOGÁS E PRODUÇÃO DE H₂ E CO₂ AO LONGO DO TEMPO PARA O ENSAIO 15.



Nota-se que o início da produção de H₂ para o ensaio 13, ocorreu em 48 horas de reação (1,2 mmol H₂ L⁻¹ meio reacional) obtendo um biogás composto por 29,7% de H₂. Observou-se produção de biogás com os maiores percentuais de H₂ a partir do sétimo dia de reação, característica que permanece até o último dia (3,6 mmol H₂ L⁻¹ meio reacional, 63,3% de H₂ no sétimo dia).

Para o ensaio 15 nota-se a produção de H₂ a partir de 24 horas de reação (0,03 mmol H₂ L⁻¹ meio reacional), no entanto, apenas no sétimo dia observou-se um biogás com elevado percentual de H₂ (47,9%). Nos ensaios 14, 16 e 17 não obteve-se produção de H₂. No ensaio 14 notou-se que houve atividade fermentativa devido a presença de CO₂ durante todo o tempo de duração da reação, porém, não foi observada a presença de atividade de bactérias produtoras de H₂ ou CH₄.

No ensaio 16, no primeiro dia de reação houve produção de CH₄, correspondendo a 15,8% do biogás, nos dias seguintes notou-se apenas a presença de CO₂. No ensaio 17 não foi observado atividade fermentativa até o sétimo dia de reação, nos dias 9 e 11 notou-se a presença apenas de CO₂ no biogás.

Na TABELA 19 é possível observar os resultados de pH e DQO obtidos no início e fim de cada reação e STV inicial para os ensaios 13 a 17.

TABELA 19 - RESULTADOS DE pH E DQO OBTIDOS NO INÍCIO E FIM DE CADA REAÇÃO E STV INICIAL DOS ENSAIOS 13 A 17.

Ensaio	pH	STV (g L ⁻¹)	DQO (g O ₂ L ⁻¹)
	inicial/ final	Inicial	inicial/ final
13	5,5/ 4,5	0,12	33,5/ 35,8
14	5,8/ 4,4	0,30	19,2/ 18,8
15	5,7/ 2,9	0,28	24,5/ nd
16	5,6/ 5,1	0,63	31,5/ 33,8
17	5,8/ 5,4	0,16	nd/ 13,8

nd: não determinado.

Como pode ser observado na TABELA 19, a redução do pH está relacionada com a ausência ou presença de H₂. Discretas alterações no pH são observadas para as reações onde não há produção de H₂ (ensaios 16 e 17) e alterações significativas onde há presença (ensaios 13 e 15). A correlação entre produção de H₂ e rotas metabólicas estabelecidas pelos microrganismos pode ser observada através da identificação cromatográfica dos ácidos voláteis presentes na fase líquida dos reatores (TABELA 20).

TABELA 20 - RESULTADOS DE CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS OBTIDOS PARA O ENSAIO 13 (DIAS 0 E 2) E 15 (DIAS 0, 7 E 11).

Ensaio	pH	Ácido láctico (mg/L)	Ácido fórmico (mg/L)	Ácido acético (mg/L)	Ácido propiônico (mg/L)	Ácido butírico (mg/L)
	inicial/ final					
13 inicial		0	<LQ	0	0	63,43
13 (dia 2)	5,5/ 4,5	35.569	55.005	37.139	35.470	113.522
15 (dia 7)		13.946	0	80.513	0	371.640
15 (dia 11)	5,7/ 2,9	<LQ	<LQ	49,01	0	241,04

<LQ= abaixo do limite de quantificação.

Os maiores rendimentos teóricos de hidrogênio estão associados ao acetato como produto final da fermentação. No entanto, na prática os maiores rendimentos de hidrogênio estão associados a mistura do acetato e butirato como produtos finais; já os menores rendimentos estão associados ao propionato, álcoois, ácido láctico, visto que as conversões envolvem mais que uma rota metabólica (LEVIN; PITT; LOVE, 2004).

Observa-se que para o ensaio 13 (inicial) está presente o ácido butírico, relacionado com as rotas produtoras de H₂. É importante lembrar que o inóculo utilizado nesse ensaio foi obtido do ensaio 7, no qual houve um dos maiores

rendimentos de H₂ obtidos até então. No segundo dia de reação (ponto onde ocorreu maior rendimento de H₂) nota-se a presença de todos os ácidos analisados, sendo ácido butírico e fórmico predominantes. Ácido láctico e propiônico estão relacionados às rotas com menor produção de H₂ e estão presentes nesse ensaio em menores concentrações.

Diferente do ensaio 13, não foi observada a presença de ácidos orgânicos no início do ensaio 15. Todavia, no sétimo dia de reação (ponto onde ocorreu maior rendimento de H₂) conforme já era esperado ocorreu a formação dos ácidos acético e butírico, semelhante ao ocorrido no ensaio 13 (dia 2), bem como, de ácido láctico, que pode estar relacionado a baixa produção de H₂ e posterior inibição da produção.

De acordo com Noike *et al.* (2002), há duas explicações possíveis que envolvem bactérias produtoras de hidrogênio e bactérias produtoras de ácido láctico, uma delas é a competição por substrato ocasionando na produção simultânea de H₂ e ácido láctico, fato observado no presente estudo. A outra hipótese é a inibição ocasionada pelas bactérias produtoras de ácido láctico por excretarem substâncias que inibem as bactérias produtoras de H₂.

Os ácidos orgânicos voláteis também interferem diretamente nos resultados obtidos para DQO (TABELA 19). Os ácidos voláteis gerados pela reação podem fazer com que a DQO do meio reacional permaneça próxima do valor da DQO inicial, mesmo nos casos em que a matéria orgânica presente no efluente tenha sido consumida. Isto ocorre devido ao fato de que a DQO dos ácidos soma-se a DQO da matéria orgânica inicialmente presente no efluente. A TABELA 21 apresenta a DQO teórica dos ácidos orgânicos avaliados nesse estudo. Entretanto, aumentos expressivos da DQO como os apresentados nestes 2 ensaios não devem ser esperados, visto que a concentração destes ácidos gerados no meio reacional é pouco expressiva para refletir tal aumento.

TABELA 21 - REAÇÕES USADAS PARA CÁLCULO DA DQO TEÓRICA DE CADA METABÓLITO E O FATOR QUE RELACIONA A MASSA DA SUBSTÂNCIA COM O EQUIVALENTE EM DQO.

Produtos	Equação	DQO (g O ₂ g ⁻¹ substância)
Ácido láctico	$C_3H_6O_6 + 4,5 O_2 \rightleftharpoons 6CO_2 + 4H_2O$	1,07
Ácido fórmico	$CH_2O_2 + 0,5 O_2 \rightleftharpoons CO_2 + H_2O$	0,35
Ácido acético	$C_2H_4O_2 + 2 O_2 \rightleftharpoons 2 CO_2 + 2 H_2O$	1,07
Ácido propiônico	$C_3H_6O_2 + 3,5 O_2 \rightleftharpoons 3 CO_2 + 3 H_2O$	1,51
Ácido butírico	$C_4H_8O_2 + 5 O_2 \rightleftharpoons 4 CO_2 + 4 H_2O$	1,82

FONTE: PENTEADO, 2012.

Apenas no ensaio 14, onde não foi observado a presença de nenhum ácido orgânico em estudo, ocorreu a remoção da DQO. De acordo com Fernandes (2008), a baixa eficiência de remoção de DQO está relacionado ao fato da produção de hidrogênio ocorrer na etapa inicial da digestão anaeróbia, quando substratos complexos são convertidos a substâncias mais simples que não estão completamente reduzidas como o ácido acético.

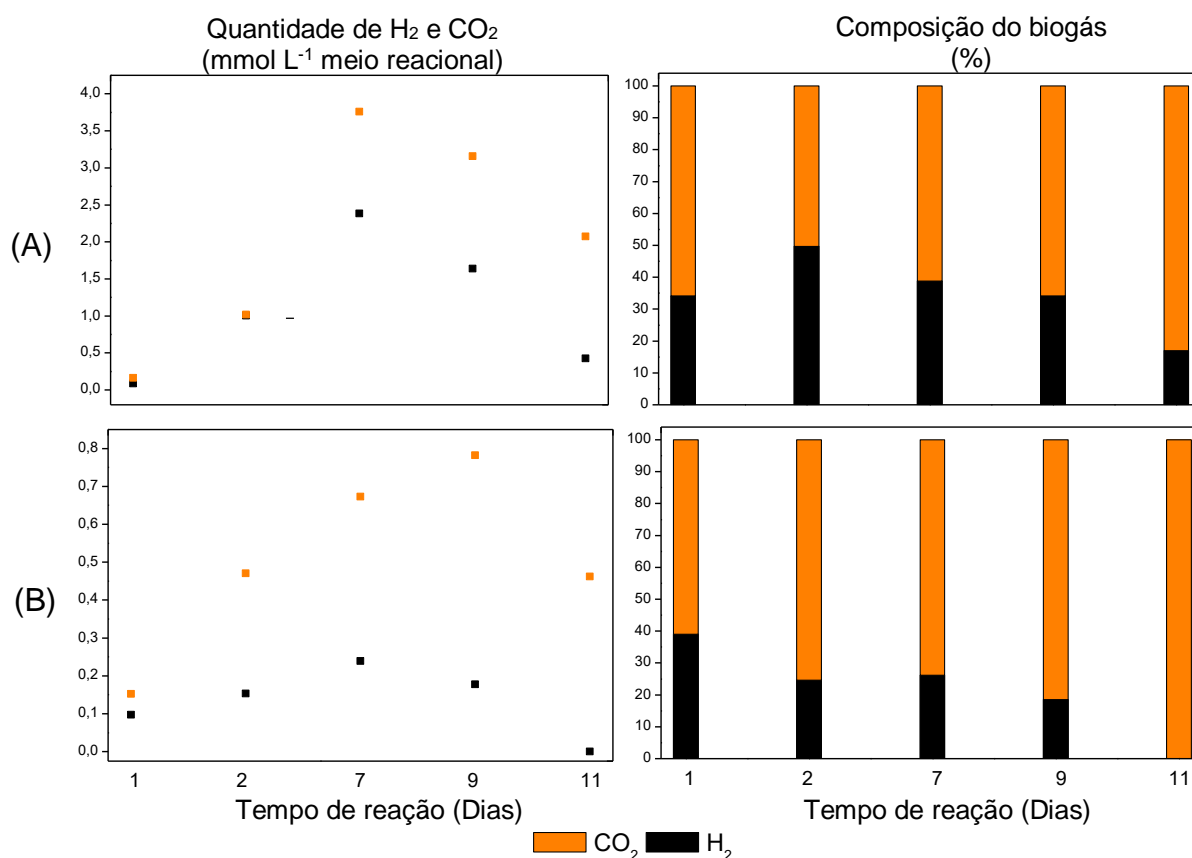
A partir da compreensão dos resultados dos ensaios 13 a 17, entende-se que a reutilização do inóculo é viável. Deste modo, a etapa de alimentação com sacarose pode ser considerada como uma forma de enriquecimento de inóculo para aumento da biomassa de interesse.

5.2.2 Reativação do inóculo

O teste de reativação foi feito para verificar se o inóculo do reator que não produziu H₂ operado com substrato contendo glicerol ficaria inviabilizado ou seria possível sua reativação utilizando substrato contendo carboidrato simples (sacarose), já que são mais facilmente metabolizáveis.

Os resultados obtidos para o ensaio 18 no qual utilizou-se um inóculo que anteriormente produziu H₂ estão expostos na FIGURA 14 (A), para o ensaio 19 que utilizou inóculo de reator que não produziu H₂ anteriormente, os resultados estão expostos na FIGURA 14 (B).

FIGURA 14 - COMPOSIÇÃO DO BIOGÁS E PRODUÇÃO DE H₂ E CO₂ AO LONGO DO TEMPO PARA OS ENSAIOS 18 E 19



Observa-se para o ensaio 18 que houve produção de H₂ desde o primeiro dia de reação alimentada com sacarose. A produção de H₂ teve início com 0,08 mmol H₂ L⁻¹ meio reacional em 24 horas, foi possível identificar o aumento da produção de H₂ com o passar dos dias, pois, no sétimo dia de reação obteve-se um rendimento de 2,4 mmol H₂ L⁻¹ meio reacional, no entanto, não é possível afirmar a quantidade de H₂ calculada ao longo do tempo de reação, pois, como já foi discutido anteriormente as coletas foram feitas retirando-se uma porção significativa de biogás (25 mL), o que pode ter interferido no equilíbrio da reação podendo gerar um resultado equivocado. O biogás produzido do primeiro ao nono dia apresentou-se com percentual de H₂ variando de 34 a 49%.

Observa-se que no ensaio 19, assim como no ensaio anterior houve produção de H₂ e CO₂ desde o primeiro dia de reação alimentada com sacarose, nota-se uma tendência parecida com o observado no ensaio 18, porém, obtendo-se menores rendimentos de H₂, possivelmente pelo fato do inóculo precisar de mais tempo de

adaptação. O rendimento máximo de H₂ também foi obtido no sétimo dia de reação (0,2 mmol H₂ L⁻¹ meio reacional). A composição do biogás obtidos do primeiro ao nono dia de reação variou de 18 a 39% de H₂, no último dia (dia 11) não foi observado produção de H₂.

Para melhor compreensão do desempenho dos reatores os resultados de pH e DQO obtidos no início e fim de cada reação e STV inicial (ensaios 18 e 19) estão demonstrados na TABELA 22. Para o ensaio 18 também foi avaliado a produção de ácidos voláteis (ponto 0 e 2 dias), no entanto, nenhum dos ácidos voláteis em estudo foram detectados (TABELA 28).

TABELA 22 - RESULTADOS DE pH E DQO OBTIDOS NO INÍCIO E FIM DE CADA REAÇÃO E STV INICIAL DOS ENSAIOS 18 E 19.

Ensaio	pH inicial/ final	STV (g L ⁻¹) Inicial	DQO (g O ₂ L ⁻¹) Inicial	DQO (g O ₂ L ⁻¹) Total ¹ / final
18	5,8/ 3,2	0,45	28,2	51,7/ nd
19	5,5/ 4,5	1,35	31,9	55,4/ 46,8

¹: DQO inicial + DQO (teórica) adicionada durante os cinco dias de alimentação (alimentação: solução de sacarose 4,7 g O₂ L⁻¹ a cada 48 horas); nd: não determinado.

A maior alteração de pH observada para o ensaio 18 é característica de produção de ácidos orgânicos que embora não tenham sido detectados na análise realizada para o dia 2, uma diversidade de ácidos que não foram analisados podem ser formados durante a reação de biodigestão. Para o resultado de DQO nota-se para o ensaio 19 a remoção de 15,6%, para o ensaio 18 a DQO final não foi determinada.

A partir da compreensão dos resultados dos ensaios 18 e 19, entende-se que é possível a reativação do inóculo no caso da produção ter sido suspensa. Deste modo, assim como a reutilização do inóculo, a reativação também caracteriza-se como uma forma de enriquecimento, no qual um inóculo viável é alimentado com um substrato prontamente metabolizável pelas bactérias para que haja o aumento da biomassa de interesse.

5.2.3 Avaliação da carga orgânica para alimentação dos reatores com glicerol

Sabe-se que em níveis elevados, a concentração de substrato pode influenciar negativamente na taxa de produção de H₂, inibindo a atividade das bactérias produtoras de hidrogênio.

Dessa forma, os próximos ensaios foram realizados de forma a avaliar duas concentrações de carga orgânica (glicerol) aplicada durante a alimentação dos reatores. Para isso, no ensaio 20 a cada alimentação foi adicionado ao reator solução de glicerol com DQO de 1000 mgO₂ L⁻¹ já no reator 21 a solução de glicerol adicionada continha uma DQO de 200 mgO₂ L⁻¹

Para o ensaio 20, no primeiro dia de reação não foi observado atividade de bactérias fermentativas, a partir do dia 2 observou-se a presença de CO₂ e apenas nesse dia notou-se a presença de H₂ em concentração muito baixa, quase nula (0,001 mmol).

Para o ensaio 21, no primeiro dia de reação também não notou-se atividade de bactérias fermentativas, a partir do dia 2 observa-se a presença de CO₂, a produção de H₂ ocorreu nos dias 7 e 11 com 0,02 e 1,3 mmol H₂ L⁻¹ meio reacional respectivamente, no dia 11 também observou-se a presença de 1,9 mmol CH₄ L⁻¹ meio reacional, neste dia a composição do biogás foi de 22,7% de H₂; 44,2% de CO₂ e 33,1% de CH₄.

Para melhor compreensão dos resultados descritos acima, os resultados de pH e DQO obtidos no início e fim de cada reação e STV inicial (ensaios 20 e 21) estão demonstrados na TABELA 23. Para o ensaio 21, também foi avaliado a produção de ácidos voláteis (ponto 0 e 11 dias).

TABELA 23 - RESULTADOS DE pH E DQO OBTIDOS NO INÍCIO E FIM DE CADA REAÇÃO E STV INICIAL DOS ENSAIOS 20 E 21.

Ensaio	pH inicial/ final	STV (g L ⁻¹)	DQO (g O ₂ L ⁻¹)	DQO (g O ₂ L ⁻¹)
		Inicial	Inicial	total ³ / final
20	5,6/ 5,4	0,24	34,3 ¹	39,6/ 34,4
21	5,6/ 5,1	0,24	34,3 ²	35,3/ 17,0

¹: alimentado a cada 48 horas com solução de glicerol contendo 1,0 g O₂ L⁻¹; ²: alimentado a cada 48 horas com solução de glicerol contendo 0,2 g O₂ L⁻¹; ³: DQO inicial + DQO (teórica) adicionada durante os cinco dias de alimentação.

Nota-se que, a baixa alteração do pH de ambos os ensaios indica que não houve produção de ácidos orgânicos, esse fato foi confirmado par o ensaio 21 com a análise de ácidos orgânicos voláteis (dia 11) que não mostrou a ocorrência de nenhum ácido em análise.

Os ensaios 20 e 21 foram conduzidos com alimentação dos reatores, sendo que a cada alimentação há um incremento de DQO. Ao final dos ensaios considerando a DQO total (inicial + teórica), ocorreu a remoção de DQO de 13,0 e 51,8% nos ensaios 20 e 21 respectivamente.

A remoção da DQO observada nos ensaios 20 e 21 possivelmente está relacionada a metanogênese que ocorreu ao final desse ensaio.

A partir da compreensão dos resultados dos ensaios 20 e 21, nota-se que no reator onde a adição de glicerol foi de $0,2 \text{ g O}_2 \text{ L}^{-1}$ obteve-se a melhor resposta em relação a atividade dos microrganismos, embora tenha ocorrido produção de CH_4 . Deste modo, os ensaios a seguir foram alimentados com substratos contendo $0,2 \text{ g O}_2 \text{ L}^{-1}$.

5.2.4 Inserção de glicerol bruto na alimentação dos reatores

O glicerol bruto foi inserido na alimentação dos reatores em misturas contendo 3:1 (glicerol P.A/ bruto) e 1:1 (glicerol P.A/ bruto), para os ensaios 22 e 23 respectivamente. Para ambos os ensaios houve produção apenas de CO_2 , não sendo observada a produção H_2 nem de CH_4 .

Algumas hipóteses podem ser elencadas diante da ausência de produção de H_2 nos ensaios 22 e 23, a primeira hipótese é que o metanol contido no glicerol bruto esteja inibindo a atividade das bactérias produtoras de H_2 , a segunda hipótese é que o pH da mistura de glicerol esteja influenciando negativamente na atividade das bactérias produtora de H_2 , pois, o pH da mistura adicionada foi de 10 para a mistura de 3:1 e 11 para a mistura de 1:1.

A influência do pH sobre a fermentação de hidrogênio é bastante controversa. Lee *et al.* (2008), avaliaram o efeito dos pHs 5,50, 6,00, 6,50 e 7,00 na fermentação de resíduos de uma cozinha vegetariana para a produção de hidrogênio em condições termofílicas, a 55°C , e observaram que quando o pH foi mantido em 5,50 não houve produção de H_2 , já em pH 6,00 observou-se a maior produção volumétrica específica de H_2 , com $0,48 \text{ mmol H}_2/\text{g SSV/h}$, o maior rendimento foi de $0,57 \text{ mmol H}_2/\text{g DQO}$ em 7,00. Na fase aquosa, quando o pH foi controlado em 6,00, 6,50 e 7,00 observou-se o predomínio da formação do ácido butírico.

Mu, Yu, e Wang (2006) avaliaram o efeito do pH na produção anaeróbia de hidrogênio em reator UASB utilizando água residual sintética a base de sacarose como fonte de carbono. Os autores avaliaram pHs variando de 3,40 a 6,30 e observaram que o rendimento de hidrogênio aumentou de $0,68 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1}$ glicose para $1,61 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1}$ glicose com o aumento do pH de 3,40 para 4,20, em seguida, diminuiu para $1,00 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1}$ glicose quando o pH atingiu o valor de 6,30.

A fim de eliminar as interferências citadas acima, o glicerol bruto foi tratado para possível eliminação do metanol e o pH da mistura de glicerol foi ajustado para valor semelhante ao valor do início da reação (pH 6,00). Os ensaios foram repetidos utilizando misturas de glicerol para a alimentação dos reatores nas mesmas proporções que nos ensaios supra citados, no entanto, utilizando essa mistura de glicerol tratada (ensaios 24 e 25) e três coletas do biogás (dias 2, 7 e 11).

Para ambos os ensaios ocorreu a produção de CO₂ durante todo o tempo de duração do ensaio. No entanto a produção de H₂ só foi observada no segundo dia para ambos os ensaios, enquanto que a produção CH₄ não foi observada.

Para o ensaio 24 obteve-se uma quantidade baixa de H₂ (0,07 mmol H₂ L⁻¹ meio reacional) enquanto que para CO₂ foi produzido 19,9 mmol H₂ L⁻¹ meio reacional nesse mesmo dia, nos dias seguintes não ocorreu produção de H₂. Sendo assim, para o ensaio 24 obteve-se um biogás composto por 0,4% de H₂ e 99,6% de CO₂ no segundo dia de reação.

Para o ensaio 25 a produção de H₂ no segundo dia de reação foi maior do que para o ensaio 24, sendo produzido 1,0 mmol H₂ L⁻¹ meio reacional e de CO₂ 0,9 mmol CO₂ L⁻¹ meio reacional, sendo assim obteve-se um biogás composto por 50,5% de H₂ e 49,5% de CO₂.

Para melhor compreensão dos resultados descritos acima, os resultados de pH e DQO obtidos no início e fim de cada reação e STV inicial (ensaios 22 a 25) estão demonstrados na TABELA 24. Para o ensaio 23 (ponto 2) e 25 (ponto 0 e 2), também foi avaliado a produção de ácidos voláteis que serão discutidos posteriormente (TABELA 28).

TABELA 24 - RESULTADOS DE pH E DQO OBTIDOS NO INÍCIO E FIM DE CADA REAÇÃO E STV INICIAL DOS ENSAIOS 20 E 21.

Ensaio	pH	STV (g L ⁻¹)	DQO (g O ₂ L ⁻¹)	DQO (g O ₂ L ⁻¹)
	inicial/ final	Inicial	Inicial	Total ¹ / final
22	5,5/ 5,9	0,43	17,2	18,2/ 16,0
23	5,5/ 5,5	0,43	17,2	18,2/ 19,2
24	5,5/ 5,9	0,66	17,2	18,2/ 7,1
25	5,5/ 5,5	0,66	17,2	18,2/ 5,2

¹: DQO inicial + DQO (teórica) adicionada durante os cinco dias de alimentação (alimentação: solução de misturas de glicerol P.A. e glicerol bruto contendo 0,2 g O₂ L⁻¹ a cada 48 horas).

Nota-se para os ensaios 23 e 25 que não houve alteração do pH do meio reacional, para os ensaios 22 e 24 observa-se um discreto aumento. Na análise de ácidos orgânicos voláteis (TABELA 28) do ensaio 23 (dia 2), notou-se a presença

apenas de ácido acético ($15,4 \text{ mg L}^{-1}$), já para o ensaio 25 inicialmente notou-se a presença dos ácidos fórmico, butírico, acético e propiônico em baixas concentrações (dia 0), já para o dia 2, observou-se o aumento na concentração de ácido fórmico, enquanto os ácidos butírico, acético e propiônico não foram detectados. Nota-se também a remoção de DQO para a maioria dos ensaios.

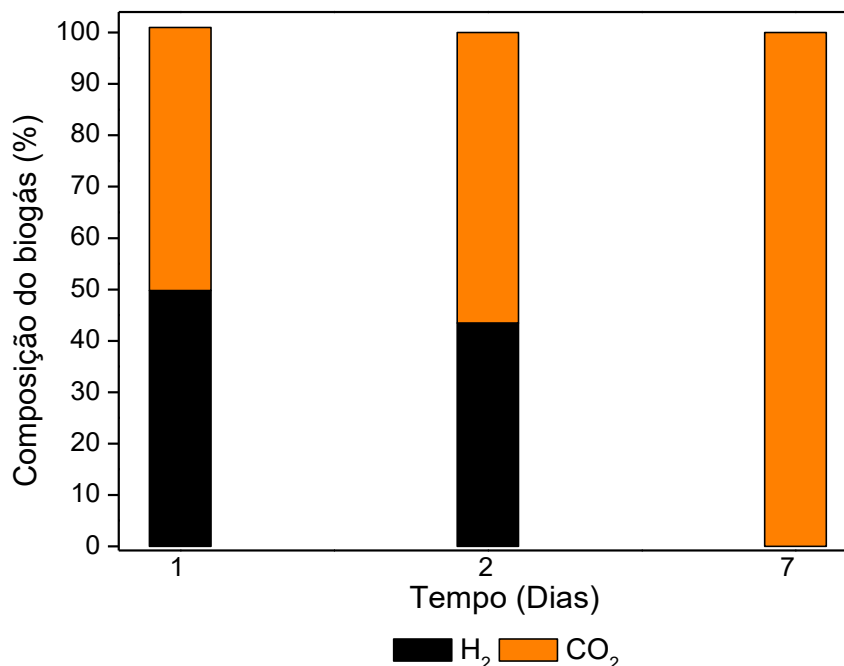
Diante dos resultados obtidos nos ensaios com inserção de glicerol bruto, entende-se que o glicerol bruto contém substâncias que interferem no desempenho da reação como o excesso de metanol e de resíduo de catalisador, compreende-se que essas interferências podem ser minimizadas com tratamentos do glicerol bruto, no entanto, novos ensaios devem ser realizados para a otimização da reação.

5.3 RESULTADOS OBTIDOS UTILIZANDO INÓCULO DE AUTOFERMENTAÇÃO DOS EFLUENTES SINTÉTICO 1 E 2

Tendo em vista as dificuldades para obtenção de resultados reprodutíveis e estabilidade na produção de H_2 utilizando como fonte de carbono o glicerol, foram realizados ensaios onde a biomassa foi gerada por fermentação natural de meio sintético contendo glicerol, ou seja, adaptada a este substrato. Para fins de comparação com um controle positivo, realizou-se também a fermentação natural de efluente sintético contendo sacarose.

Os resultados obtidos para autofermentação do efluente sintético 1 (sacarose) estão expostos na FIGURA 15.

FIGURA 15 - COMPOSIÇÃO DO BIOGÁS PARA O ENSAIO 26 (AUTOFERMENTAÇÃO DE EFLUENTE SINTÉTICO 1 - SUBSTRATO SACAROSE).



Para o ensaio 26, observa-se a produção de H₂ nos primeiros dias de reação, obtendo-se um biogás composto por 49,5 e 43,5% de H₂ em 24 e 48 horas de reação respectivamente (1,0 e 2,3 mmol H₂ L⁻¹ meio reacional), não ocorreu a produção de H₂ nos dias 7, 9 e 11.

Para os ensaios conduzidos a partir da autofermentação do efluente sintético 2, observou-se resultados semelhantes aos obtidos para os ensaios anteriores onde realizou-se a inserção de misturas de glicerol na alimentação dos reatores. Para os ensaios 27 e 28 alimentados com misturas contendo 3:1 (glicerol P.A/ bruto) e 1:1 (glicerol P.A/ bruto) respectivamente, ocorreu a produção apenas de CO₂, não sendo observada a produção H₂ nem de CH₄.

Considerando as hipóteses elencadas no tópico 5.2.4, realizou-se o tratamento no glicerol bruto a fim de eliminar a interferência do excesso de metanol e do pH elevado. Os ensaios foram repetidos utilizando essa mistura de glicerol tratada (ensaios 29 e 30) realizando três coletas de biogás (dias 2, 7 e 11).

Com a alimentação utilizando glicerol com tratamento para eliminação de metanol e ajuste de pH, obteve-se resultados com produção de H₂ para ambos os ensaios. Para o ensaio 29 obteve-se um biogás contendo 21,8% de H₂ (0,3 mmol H₂ L⁻¹ meio reacional). Para o ensaio 30, notou-se que a produção de H₂ ocorreu em 48 horas de reação, no entanto corresponde apenas 0,7% do biogás.

Para melhor compreensão dos resultados descritos acima, os resultados de pH e DQO obtidos no início e fim de cada reação e STV inicial (ensaios 26 a 30) estão demonstrados na TABELA 25. Para o ensaio 29, também foi avaliado a produção de ácidos voláteis (ponto 0 e 2 dias) e não foi detectado a presença dos ácidos analisados.

TABELA 25 - RESULTADOS DE pH E DQO OBTIDOS NO INÍCIO E FIM DE CADA REAÇÃO E STV INICIAL DOS ENSAIOS 20 E 21.

Ensaio	pH	STV (g L ⁻¹)	DQO (g O ₂ L ⁻¹)	DQO (g O ₂ L ⁻¹)
	inicial/ final	Inicial	Inicial	Total ³ / final
26	5,7/ 3,3	0,53	18,8 ¹	42,3/ 42,2
27	5,7/ 5,5	0,04	32,7 ²	33,7/ 23,2
28	5,7/ 5,9	0,04	32,7 ²	33,7/ 25,9
29	5,8/ 5,5	0,28	17,2 ²	18,2/ nd
30	5,8/ 5,1	0,28	17,2 ²	18,2/ 11,5

¹: alimentado a cada 48 horas com solução de sacarose 4 g L⁻¹; ²: alimentado a cada 48 horas com solução de misturas de glicerol P.A. e glicerol bruto contendo 0,2 g O₂ L⁻¹; ³: DQO inicial + DQO (teórica) adicionada durante os cinco dias de alimentação; nd: não determinado.

A redução de pH do ensaio 26 e a baixa remoção de DQO estão de acordo com os resultados discutidos anteriormente onde ocorreu a produção de H₂.

Já para os ensaios 27 a 30 observa-se a baixa alteração do pH do meio reacional. Nota-se também a remoção da DQO, assim como foi observado para os ensaios anteriores com a inserção da mistura de glicerol P.A e glicerol bruto, bem como, para esses ensaios também não ocorreu a produção de CH₄ que resulta na remoção desses parâmetros.

Diante dos resultados obtidos para autofermentação de efluente sintético, nota-se que a autofermentação do efluente sintético 1 (sacarose) apresentou resultados semelhantes aos resultados obtidos nos ensaios contendo inóculo AT.

Já a autofermentação do efluente sintético 2 (glicerol), não apresentou-se conveniente visto que utilizando o inóculo AT a produção foi mais elevada. No entanto, entende-se que na ausência de inóculo AT o inóculo obtido a partir da autofermentação do efluente sintético 2 pode ser enriquecido para aumento da biomassa de interesse, visto que, apresentou produção de H₂ e ausência da produção de CH₄, cumprindo com o objetivo proposto para esse ensaio. Todavia, para que sua utilização seja viável o inóculo deve ser enriquecido e a reação deve ser otimizada.

5.4 CORRELAÇÃO ENTRE ÁCIDOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS E ROTAS METABÓLICAS

A análise de ácidos orgânicos voláteis e álcoois foi realizada somente para ensaios selecionados, a TABELA 26 apresenta um resumo desses ensaios.

TABELA 26 - RESUMO DOS ENSAIOS DE PRODUÇÃO DE H₂ PARA OS QUAIS FOI REALIZADA A ANÁLISE DE ÁCIDOS VOLÁTEIS.

Ensaio	Inóculo	Condições operacionais	Substrato	Alimentação	Composição do Biogás
6	BT	35°C, 150 RPM	Ef. sint. 1	Sacarose	53,4% H ₂
7	AT	35°C, 150 RPM	Sacarose	Sacarose	57% H ₂
13	Reuso (ensaio 7)	35°C, 150 RPM	Ef. sint. 2	Não	70% H ₂
14	Reuso (ensaio 9)	35°C, 150 RPM	Ef. sint. 2	Não	100% CO ₂
15	Reuso (ensaio 11)	35°C, 150 RPM	Ef. sint. 2	Não	47,9 H ₂
18	Reuso (ensaio 13)	35°C, 150 RPM	Ef. sint. 1	Sacarose	49 % H ₂
21	AT	35°C, 150 RPM	Ef. sint. 2	Glicerol	22% H ₂ 33% CH ₄
23	AT	35°C, 150 RPM	Ef. sint. 2	Mistura Glicerol ¹	100% CO ₂
25	AT	35°C, 150 RPM	Ef. sint. 2	Mistura Glicerol ¹	50,5% H ₂
27	AF 2	35°C, 150 RPM	Ef. sint. 2	Mistura Glicerol ¹	100% CO ₂
29	AF 2	35°C, 150 RPM	Ef. sint. 2	Mistura Glicerol ¹	21,8% H ₂

¹ Mistura de glicerol P.A. e glicerol bruto.

Nas TABELAS 27 e 28 estão descritos todos resultados obtidos para as análises de ácidos orgânicos voláteis e álcoois (quando presente).

É importante lembrar que para os ensaios onde houve a produção de H₂ os resultados de pH obtidos ao final da reação apresentaram-se abaixo dos obtidos no início da reação, já para os ensaios onde não ocorreu a produção de H₂ o pH manteve-se igual ou um pouco acima do inicial, mostrando-se de acordo com o esperado, pois, a diminuição dos valores de pH é resultado da alta acidificação do meio o que é indicativo da produção de ácidos orgânicos, típicos das rotas metabólicas de bactérias fermentativas para produção de H₂.

TABELA 27 - RESULTADOS DE ÁCIDOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS E ALCOÓIS PARA OS ENSAIOS 6 E 7.

Ácido e álcoois (mg L ⁻¹)	Ensaio 6 inicial/ final	Ensaio 7 inicial/ final
Ác. Acético	88,0/ 1572,0	<LQ/ 843,0
Ác. Propiônico	<LQ/ 77,0	<LQ
Ác. Isobutírico	<LQ/ 60,0	<LQ
Ác. Butírico	107,0/ 1031,0	86,0/ 461,0
Ác. Isovalérico	<LQ/ 49,0	<LQ
Ác. Isocapróico	24,0/ 166,0	<LQ
Ác. Capróico	24,0/ 166,0	<LQ
Etanol	<LQ/ 160,0	202,0/ <LQ
n-propanol	<LQ/ 4,0	<LQ
Acetona	<LQ/ 9,0	<LQ

<LQ abaixo do limite de quantificação

A correlação entre produção de H₂ e rotas metabólicas estabelecidas pelos microrganismos através da identificação cromatográfica dos ácidos e álcoois mostra que para ensaio 6 (TABELA 27), no qual ocorreu formação de H₂ e CH₄, foram observados ao final da reação alta produção dos ácidos acético e butírico, relacionados à produção de H₂, no entanto, também observa-se a formação dos ácidos capróico, isocapróico e isovalérico, além de etanol, n-propanol e acetona, apontando para rotas de consumo de H₂, o que de fato nota-se a partir do sétimo dia de ensaio.

No caso do ensaio 7 (TABELA 27), no qual não ocorreu produção de CH₄, os únicos ácidos detectados ao final da reação foram acético e butírico, o que indica rotas favoráveis a produção de H₂ para este ensaio.

Como já foi citado, na prática, os maiores rendimentos teóricos de H₂ os maiores rendimentos de hidrogênio estão associados a mistura do acetato e butirato como produtos finais; já os menores rendimentos estão associados ao propionato, álcoois, ácido láctico.

Para compreender melhor as rotas metabólicas adotadas pelas bactérias fermentativas no presente estudo, algumas amostras foram coletadas dos ensaios conduzidos utilizando glicerol como substrato para análise de ácidos orgânicos voláteis (TABELA 28). Foram escolhidos o dia 0 (inicial) para verificar a ocorrência dos ácidos no início da reação, alguns pontos foram escolhidos de acordo com o maior

percentual de H₂ obtidos no ensaio, e outros foram escolhidos devido à ausência de produção de H₂.

Para os ensaios com inóculo AT onde ocorreu produção de H₂ foram analisados os ensaios: 13 (dias 0 e 2), 15 (dias 0, 7 e 11), 18 (dias 0 e 2) e 21 (dias 0 e 11), os ensaios analisados onde a produção de H₂ não foi observada foram os ensaios 14 e 23 (dia 2).

Observa-se que no início do ensaio 13 já encontra-se ácido butírico em baixa concentração, após 48 horas de reação nota-se o aumento de 72% na concentração de ácido butírico, bem como a presença de todos os ácidos analisados, sendo ácido butírico predominante. Ácido láctico e propiônico estão relacionados às rotas com menor produção de H₂ e estão presentes nesse ensaio em menores concentrações.

No início do ensaio 15 não foi observada a presença de ácidos orgânicos. No sétimo dia de reação, conforme já era esperado ocorreu a formação dos ácidos acético e butírico em proporções semelhante ao ocorrido no ensaio 13 (dia 2), bem como, de ácido láctico em menor concentração, que pode estar relacionado a baixa produção de H₂ e posterior inibição da produção. De acordo com Noike et al. (2002) bactérias produtoras de ácido láctico competem por substrato com bactérias produtoras de hidrogênio, sendo assim, essa pode ser uma das causas tanto da baixa produção, quanto da diminuição a partir do sétimo dia de reação. No 11º dia de reação não havia mais produção de H₂, ocorreu a diminuição da concentração dos ácidos detectados no 7º dia, permanecendo apenas butírico e acético que haviam sido observados anteriormente em maiores concentrações.

No ensaio 18 foi detectado os ácidos butírico e acético em concentrações abaixo do limite de quantificação, ensaio 23 também foi detectado acético abaixo do limite de quantificação. Já nos ensaios 14 e 21 não foi detectada a presença de nenhum ácido.

Para o ensaio 25 a reação iniciou-se com a presença dos ácidos fórmico (abaixo do limite de quantificação), butírico, acético e propiônico. No decorrer da reação (ponto 2), foi detectado apenas a presença de ácido fórmico, cuja concentração aumentou expressivamente (406 mg L⁻¹), já os outros ácidos presentes no início da reação não foram detectados.

TABELA 28 - RESULTADOS DE ÁCIDOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS E PRODUÇÃO DE H₂ (QUANTIDADE DE MATÉRIA E PERCENTUAL) PARA ALGUNS ENSAIOS CONDUZIDOS COM SUBSTRATO CONTENDO GLICÉROL

Ensaio	Ponto de coleta	mmol H ₂ L ⁻¹ meio reacional	% H ₂ no biogás	Ácidos (mg L ⁻¹)				
				Fórmico	Lático	Butírico	acético	propiónico
13	Dia 0	-	-	<LQ	0	65,9	0	0
13	Dia 2	1,2	29,7	55,0	35,6	113,5	37,1	35,5
14	Dia 2	0	0	0	0	0	0	0
15	Dia 0	-	-	0	0	0	0	0
15	Dia 7	2,3	47,9	0	13,9	371,6	80,5	0
15	Dia 11	0	0	<LQ	<LQ	241,0	49,1	0
18	Dia 0	-	-	0	0	0	0	0
18	Dia 2	1,0	49,7	0	0	<LQ	<LQ	0
21	Dia 0	-	-	0	0	0	0	0
21	Dia 11	1,3	22,7	0	0	0	0	0
23	Dia 2	0	0	0	0	0	<LQ	0
25	Dia 0	-	-	<LQ	0	58,7	28,2	30,2
25	Dia 2	1,0	50,5	406,4	0	0	0	0
27	Dia 2	0	0	368,9	0	0	0	0
29	Dia 0	-	-	0	0	0	0	0
29	Dia 2	0	0	0	0	0	0	0

<LQ abaixo do limite de quantificação.

Os ensaios de autofermentação do efluente sintético 2 avaliados, foram os ensaios 27 e 29. No ensaio 27 foi detectado apenas ácido fórmico, não houve produção de H₂ para este ensaio. Para o ensaio 29 não foi detectada a presença de nenhum ácido, nesse ponto ocorreu a produção de H₂ em baixa concentração (0,3 mmol H₂ L⁻¹ meio reacional).

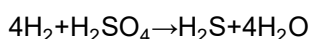
O baixo rendimento de H₂ no presente estudo pode estar relacionado as rotas metabólicas adotadas pelas bactérias de cultura mista. Várias rotas metabólicas podem ser adotadas. Dentre essas rotas várias delas utilizam o hidrogênio produzido na fase acidogênica para produção de outros metabólitos ocasionando no baixo rendimento de H₂, como as bactérias homoacetogênicas, sulfetogênicas e produtoras de ácido láctico.

Embora a presença de ácido acético possa estar relacionada a produção de H₂, quando ocorre o aumento desse ácido juntamente com o declínio da produção e H₂ indica atividade de bactérias homoacetogênicas que utilizam o H₂ para a produção de ácido acético.

Ao que tudo indica, o tratamento térmico empregado para inibir a metanogênese no presente estudo pode ter contribuído também para a inibição de bactérias homoacetogênicas, visto que, não foi observado o aumento na concentração de ácido acético juntamente com a diminuição da produção de H₂, no entanto, nem todos os ensaios foram avaliados a nível de concentração de ácidos voláteis.

Segundo Rabelo (2014) *Clostridium spp.* são versáteis na utilização de substrato, podendo estar relacionadas não somente com a produção de H₂ como observado por outros autores como Maintinguer *et al.* (2011) e Ratti *et al.* (2013), como também ao consumo, por serem relacionadas ao metabolismo homoacetogênico (SAADY, 2013).

A sulfetogênese ocorre quando sulfato é reduzido para a formação de sulfeto, as bactérias redutoras de sulfato são capazes de utilizar uma variedade de substratos incluindo hidrogênio (equação 21).



21

No presente estudo não foi quantificado a presença de sulfeto de hidrogênio (H₂S), não sendo possível concluir sobre o consumo de H₂ pelas bactérias redutoras de sulfato.

Alguns resultados já discutidos anteriormente foram compilados nas TABELAS 29 e 30, nas quais estão expostos resultados de pH, STV e DQO separados de acordo com a produção de H₂.

TABELA 29 - RESULTADOS DE pH, STV E DQO DE ENSAIOS QUE OBTIVERAM RENDIMENTO DE H₂ ACIMA DE 1,5 MMOL H₂ L⁻¹ MEIO REACIONAL.

Ensaio	pH (inicial/ final)	STV (g L ⁻¹) (inicial)	DQO (g O ₂ L ⁻¹) (inicial/ final)	H ₂ (mmol H ₂ L ⁻¹ meio reacional)
6	5,6/ 3,8	1,86	12,58/ nd	6,3 ²
7	5,6/ 2,7	1,42	13,56/ nd	8,3
8	5,8/ nd	0,49	11,19/ nd	1,8
13	5,5/ 4,5	0,12	33,5/ 35,8	3,6
15	5,7/ 2,9	0,28	24,5/ nd	2,3
18	5,8/ 3,2	0,45	51,7/ nd	2,4
26	5,7/ 3,3	0,53	42,3 ¹ / 42,2	2,3

¹: DQO total= DQO inicial + DQO (teórica) adicionada durante os cinco dias de alimentação; ²: Além de H₂ e CO₂, ocorreu a produção de CH₄; nd: não determinado.

TABELA 30 - RESULTADOS DE pH, STV E DQO DE ENSAIOS QUE OBTIVERAM RENDIMENTO DE H₂ ABAIXO DE 1,5 MMOL H₂ L⁻¹ MEIO REACIONAL.

Ensaio	pH (inicial/ final)	STV (g L ⁻¹) (inicial)	DQO (g O ₂ L ⁻¹) (inicial/ final)	H ₂ (mmol H ₂ L ⁻¹ meio reacional)
14	5,8/ 4,5	0,30	19,2/ 18,8	0
16	5,6/ 5,1	0,63	31,5/ 33,8	0 ²
20	5,6/ 5,4	0,24	39,6 ¹ / 34,4	0,001
21	5,6/ 5,1	0,24	35,3 ¹ / 17,0	1,3 ²
23	5,5/ 5,5	0,43	18,2 ¹ / 19,2	0
24	5,5/ 5,9	0,66	18,2 ¹ / 7,1	0,07
25	5,5/ 5,5	0,66	18,2 ¹ / 5,2	1,0
28	5,7/ 5,9	0,04	33,7 ¹ / 25,9	0
29	5,8/ 5,5	0,28	18,2 ¹ / nd	0,3
30	5,8/ 5,1	0,28	18,2 ¹ / 11,5	0,01

¹: DQO total= DQO inicial + DQO (teórica) adicionada durante os cinco dias de alimentação; ²: Além de H₂ e CO₂, ocorreu a produção de CH₄; nd: não determinado.

5.5 AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE ENSAIOS DE PRODUÇÃO DE H₂

A TABELA 31 apresenta o resumo dos inóculos, substratos e das condições de ensaio para os casos onde foi realizada a avaliação microbiológica através da coloração de Gram e da morfologia dos microrganismos.

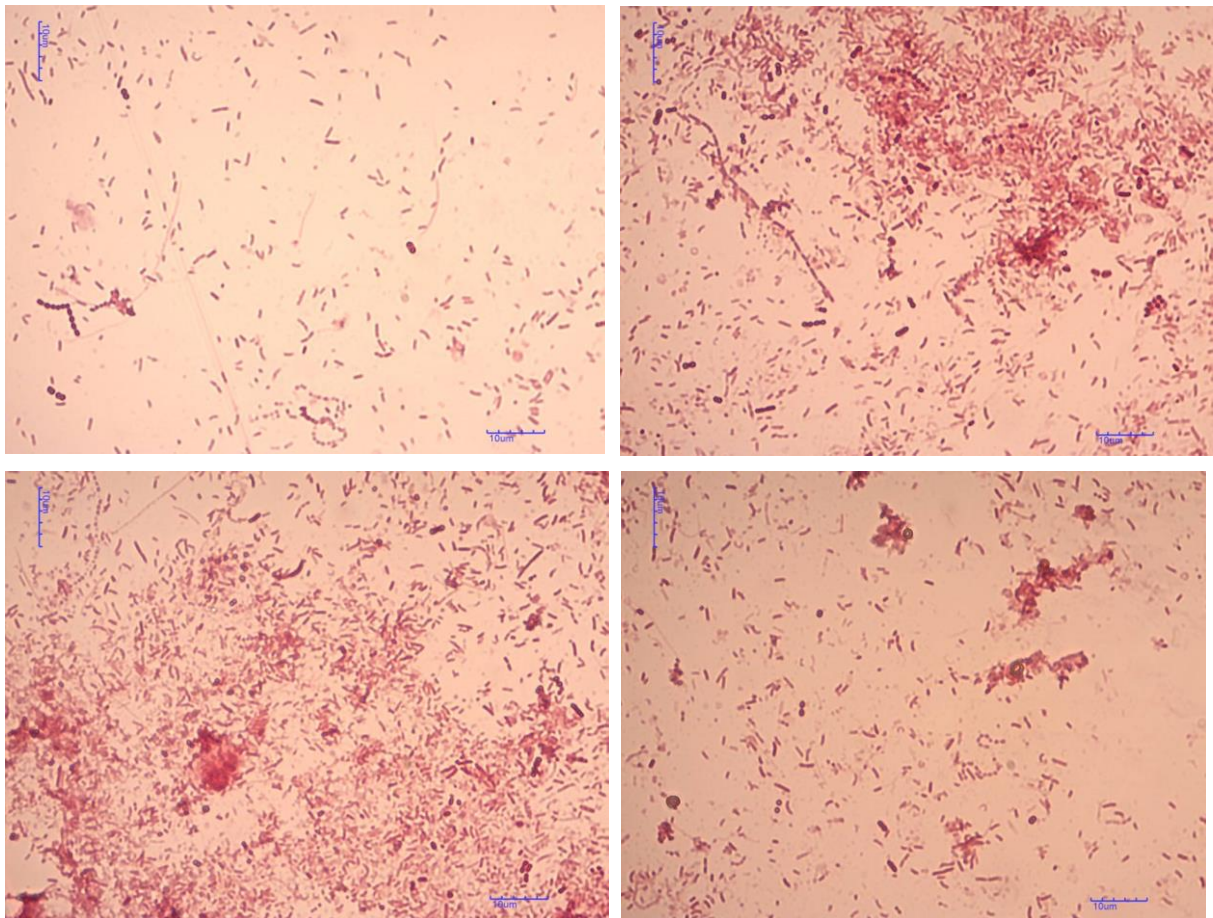
TABELA 31 - RESUMO DOS ENSAIOS DE PRODUÇÃO DE H₂ PARA OS QUAIS FOI REALIZADA A AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA.

Ensaio	Inóculo	Condições operacionais	Substrato	Alimentação	Composição do Biogás
7	AT	35°C, 150 RPM	Sacarose	Sacarose	57% de H ₂
12	AT	28°C s/a	Sacarose	Sacarose	48% de H ₂
13	Reuso (ensaio 7)	35°C, 150 RPM	Ef. sintético 2	Não	70% de H ₂
21	AT	35°C, 150 RPM	Ef. sintético 2	Glicerol	22% de H ₂ 33% de CH ₄
26	AF 1	35°C, 150 RPM	Ef. sintético 1	Sacarose	43% de H ₂

s/a: sem agitação.

Além dos ensaios descritos na tabela acima, realizou-se também a avaliação do inóculo proveniente de abatedouro de aves, sem pré tratamento (FIGURA 16).

FIGURA 16- COLORAÇÃO DE GRAM DE AMOSTRAS DE EFLUENTE DE LAGOA ANAERÓBIA APLICADA AO TRATAMENTO DE ÁGUAS RESIDUAIS DE ABATEDOURO DE AVES, SEM PRÉ-TRATAMENTO.

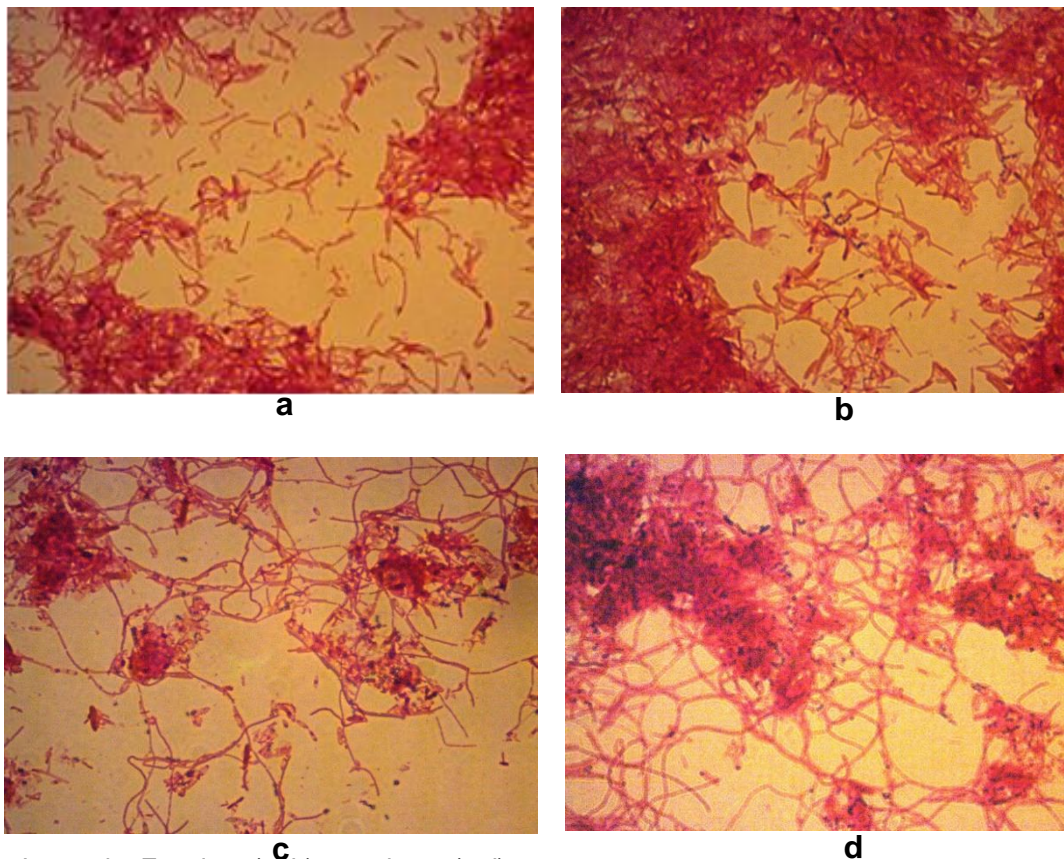


A coloração de Gram identificada para este inóculo apresentou como resultado que de modo geral a maioria das bactérias presentes no efluente são gram negativas (G-), foram observados poucas bactérias gram positivas (G+). Considerando a morfologia, as poucas bactérias G+ observadas possuem características morfológicas de cocos, já em relação as G-, a maioria das bactérias observadas apresentam-se como bacilos de diferentes tamanhos, alguns estreptobacilos, estreptococos e cocos.

A observação de diversidade de formas ao microscópio deve ser notada nos casos onde se utiliza consórcios microbianos, que é o principalmente o caso do inóculo proveniente de lagoa anaeróbia de tratamento de efluentes.

Para ensaios cujo inóculo foi do tipo AT em reatores onde ocorreu somente produção de H₂ e CO₂ foram observados muitos bacilos e estreptobacilos gram negativos (G-) e poucos cocos gram positivos (G+) (FIGURA 17).

FIGURA 17 - COLORAÇÃO DE GRAM REFERENTE AOS ENSAIOS 7 E 12



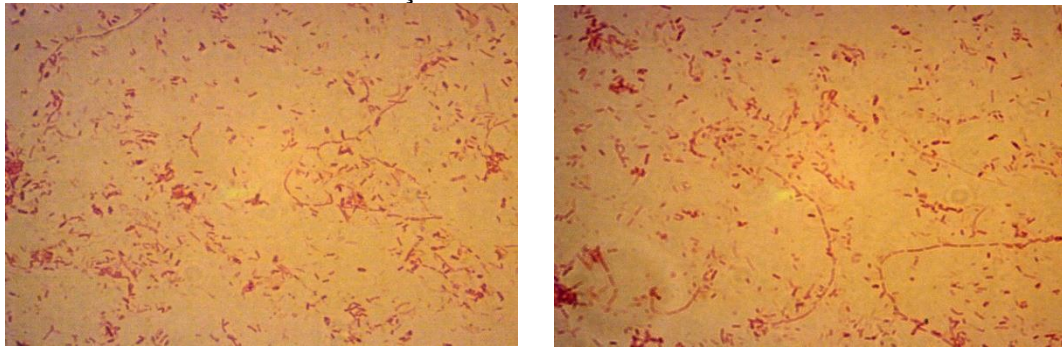
Legenda: Ensaio 7 (a, b); ensaio 12 (c,d).

Ao utilizar como inóculo lodo granular de reator USAB do tratamento de água residuária de abatedouro de aves, Lovato (2012) identificou por microscopia óptica

por contraste de fase o predomínio de bacilos. Utilizando este mesmo tipo de inóculo, Santos (2012) identificou além de bacilos, endósporos e filamentos; os autores não fizeram outras caracterizações e no caso do trabalho de Santos (2012) foram obtidos resultados de 32 a 40% de H₂ no biogás, sendo o restante da fração gasosa somente CO₂ enquanto Lovato (2014) obteve além de H₂ e CO₂, a presença de CH₄.

Na avaliação microbiológica de reator onde se usou este mesmo inóculo e houve produção de CH₄ (ensaio 21) notou-se a presença de bacilos e estreptobacilos G- (FIGURA 18) em menores quantidades do que o observado nos ensaios 7 e 12 (FIGURA 16).

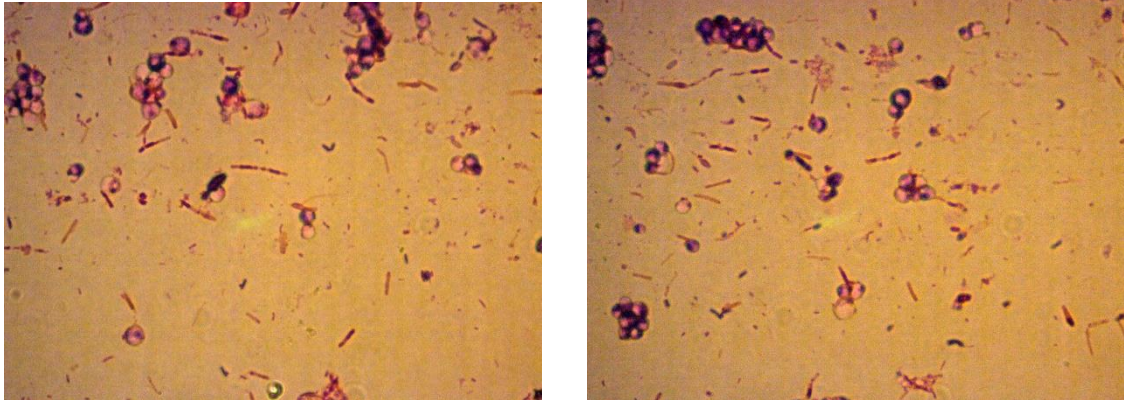
FIGURA 18 - COLORAÇÃO DE GRAM REFERENTE AO ENSAIO 21



Estas observações e as relatadas pelos autores supracitados indicam a presença de microrganismos produtores de H₂, bem como de CH₄, com morfologia de bacilos. Embora esta morfologia seja relatada na literatura associada à produção de H₂, sem CH₄, como é o caso de bactérias da família *Enterobacteriaceae* e *Clostridiaceae* (NEVES, 2009). Deve-se considerar ainda que, uma vez que arqueas podem apresentar-se também como bacilos, G- ou G+, uma diferenciação precisa seria possível através de outras técnicas, como por exemplo, moleculares. Com relação aos perfis de coloração de Gram dos casos citados acima, notou-se a presença de G-, o que não é condizente com as características de *Clostridium*, já que estas bactérias são associadas a coloração G+.

Na avaliação microbiológica do ensaio 26 (FIGURA 19) referente a autofermentação do efluente sintético 1 (sacarose), nota-se bacilos G- e G+, bem como, formas que podem ser associadas a leveduras G+, já que leveduras tem forma esférica e tamanho de 5 a 10 vezes maior que bactérias, o que é compatível com as imagens observadas.

FIGURA 19 - COLORAÇÃO DE GRAM REFERENTE AO ENSAIO DE AUTOFERMENTAÇÃO DO EFLUENTE SINTÉTICO 1 (ENSAIO 26)

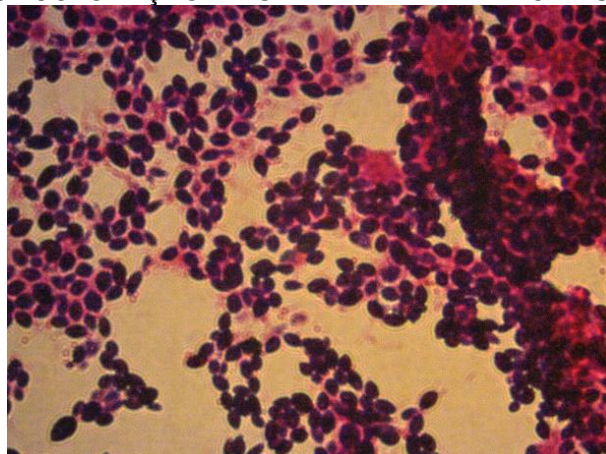


Nestes ensaios obteve-se produção de H_2 entre 40 e 43% sendo o restante da fração gasosa CO_2 somente. Fernandes (2008), utilizando inóculo proveniente de fermentação natural relata a presença de microrganismos tanto G+ como G-, nas formas de bacilos, leveduras e endósporos.

Leite *et al.* (2008), observaram em inóculo proveniente de autofermentação baixa diversidade microbiológica com predomínio das formas de bacilo, cocos e filamentos além de esporos (que só podem ser observados por contraste de fase). Os mesmos autores observaram por coloração de Gram tanto G- como G+, enquanto no presente trabalho observou-se somente G-, para autofermentação.

Nos ensaios com inóculo AT utilizando como substrato glicerol P.A., formas equivalentes a leveduras também estão presentes (FIGURA 20). Nestes ensaios, ocorreu a produção de 27,9% de H_2 no biogás (ensaios 13), notou-se predomínio de leveduras G+ envolvidas por bacilos G-, além de bacilos livres.

FIGURA 20 - COLORAÇÃO DE GRAM REFERENTE AO ENSAIO 13



É possível afirmar que a presença de leveduras não implicou em prejuízo para produção de H_2 para qualquer dos inóculos testados, pois, tanto para o inóculo de autofermentação como para o AT, houve produção de H_2 mesmo com a presença de leveduras.

Não foi possível associar a produção de CH_4 , gás indesejado neste processo, a qualquer forma notada nestes ensaios (leveduras, bacilos, cocos) conforme relatos apresentados acima e também as observações que se seguem: no uso de inóculo AT para o substrato glicerol, obteve-se formação de CH_4 e de H_2 mas os microrganismos predominantes foram bacilos (e estreptobacilos) G-.

De um modo geral, foi possível perceber através da avaliação microbiológica que a presença de bacilos G- (compatível com características de enterobactérias), esteve associada à produção de H_2 e que esta produção não foi inibida por microrganismos na forma de cocos ou de leveduras. Pode-se dizer ainda que microrganismos G- produtores de CH_4 estiveram presentes em alguns ensaios.

6 CONCLUSÃO

O inóculo proveniente de lagoa anaeróbia aplicada ao tratamento de águas residuais de abatedouro de aves foi o inóculo com maior potencial para produção de Bio-H₂, produzindo apenas H₂ e CO₂.

O pré-tratamento térmico mostrou-se eficiente para o inóculo em estudo, proporcionando a inibição da metanogênese e possibilitando a obtenção de biogás rico em H₂ e isento de CH₄.

O enriquecimento do inóculo utilizando a alimentação com solução de sacarose é uma estratégia simples e eficiente para a proliferação do inóculo e para sua reativação, e produção de Bio-H₂. Os melhores resultados foram obtidos quando os ensaios foram conduzidos a 35 °C e 150 RPM e estão relacionados as rotas do acetato e butirato.

O maior rendimento de H₂ utilizando sacarose como substrato foi de 8,3 mmol H₂ L⁻¹ meio reacional, 61,4% de H₂, com alimentação dos reatores com solução de sacarose (4 g L⁻¹) a cada 48 horas. Utilizando glicerol P.A. como substrato o maior rendimento de H₂ foi de 3,6 mmol H₂ L⁻¹ meio reacional, 63,3% de H₂, sem alimentação dos reatores. Utilizando glicerol P.A. como substrato e alimentação com mistura de glicerol P.A. e glicerol bruto o máximo rendimento foi de 1,0 mmol H₂ L⁻¹ meio reacional, 50,5% de H₂, utilizando a mistura na proporção 1:1 e glicerol bruto com tratamento para retirada de metanol e ajuste de pH para 6,0.

Os resultados dos ensaios utilizando sacarose como fonte de carbono mostraram-se reprodutíveis, mas no uso do glicerol houve dificuldade na obtenção de reprodutibilidade e estabilidade de produção de Bio-H₂.

A produção de H₂ em ensaios sem adição de inóculo AT ocorreu apenas para autofermentação do efluente sintético 1 (sacarose), sendo produzido 2,3 mmol H₂ L⁻¹ meio reacional, correspondente a 43,5% do biogás. A autofermentação do efluente sintético 2 (glicerol) não mostrou-se viável nas condições em que foram conduzidos os ensaios no presente estudo.

De um modo geral, é possível a produção de Bio-H₂ via *dark fermentation* utilizando efluentes de tratamento de resíduos agroindustriais como inóculo e tendo como fonte de substrato sacarose e glicerol. Se otimizado esse processo pode tornar-se uma alternativa promissora para a geração de energia limpa, sendo também uma oportunidade de aliar tratamento de efluentes com geração de energia.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Realização de experimentos sob condições controladas: em reator aneróbio com volume maior (entre 3-5 L); inóculo imobilizado em suporte; determinação do volume de gás produzido; amostragem de volume mínimo, de modo a não interferir no equilíbrio gasoso; monitoramento da fração líquida ao longo do tempo.

Estudar a realização do enriquecimento do inóculo com meio contendo glicerol, para favorecer a adaptação dos microrganismos a este substrato energético, de modo que sua posterior utilização possa ser melhor metabolizada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, D.; SANTOS, D. O. S. **Estudo da produção de biohidrogênio em ANSBBR com recirculação da fase líquida tratando água residuária sintética – efeito da carga orgânica**. 183p. Dissertação (Mestrado em Ciências) Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2012.
- ALVES, H. J.; BLEY JUNIOR, C.; NIKLEVICZ, R. R.; NIKLEVICZ, R. R.; FRIGO, E. P.; FRIGO, M. S. COIMBRA-ARAÚJO, C. H. Overview of hydrogen production technologies from biogas and the applications in fuel cells. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, p. 5215–5225, 2013.
- APPLEBY, D. B. Glicerol. In: KNOTHE *et al.* **Manual do Biodiesel**. Tradução de Luiz Pereira Ramos. São Paulo: Edgard Blücher, p. 295-309, 2006.
- AUTHAYANUN, S.; ARPORNWICHANOP, A.; PAENGJUNTUEK, W.; ASSABUMRUNGRAT, S. Thermodynamic study of hydrogen production from crude glycerol autothermal reforming for fuel cell applications. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, n. 13, p. 6617–6623, 2010.
- BIODIESEL BR – Portal do Biodiesel, 2016. Fabricantes de biodiesel esperam novo aumento da mistura só em 2017. Disponível em: <<http://www.biodieselbr.com/noticias/usinas/info/fabricantes-biodiesel-esperam-novo-aumento-mistura-2017-110116.htm>> Acesso em: 30 de Maio de 2016.
- CAI, M.; LIU, J.; WEI, Y. Enhanced biohydrogen production from sewage sludge with alkaline pretreatment. **Environmental Science & Thecnology**, v. 38, n. 11, p. 3195–3202, 2004.
- CHAGANTI, S. R.; KIM, D. H.; LALMAN, J. A. Dark fermentative hydrogen production by mixed anaerobic cultures: Effect of inoculum treatment methods on hydrogen yield. **Renewable Energy**, v. 48, p. 117–121, 2012.
- CHANG, S.; LI, J. Z.; LIU, F. Evaluation of different pretreatment methods for preparing hydrogen-producing seed inocula from waste activated sludge. **Renewable Energy**, v. 36, n. 5, p. 1517–1522, 2011.
- CHEN, C. C.; LIN, C. Y. Using sucrose as a substrate in an anaerobic hydrogen-producing reactor. **Advances in Environmental Research**, v. 7, n. 3, p. 695–699, 2003.
- CHEN, W.; TSENG, Z.; LEE, K.; CHANG, J. Fermentative hydrogen production with CGS5 isolated from anaerobic sewage sludge. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 30, n. 10, p. 1063–1070, 2005.
- CHOOKAEW, T.; O-THONG, S.; PRASERTSAN, P. Statistical optimization of medium components affecting simultaneous fermentative hydrogen and ethanol production from crude glycerol by thermotolerant *Klebsiella sp.* TR17. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 2, p. 751–760, 2014.

CHOOKAEW, T.; O-THONG, S.; PRASERTSAN, P. Biohydrogen production from crude glycerol by two stage of dark and photo fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 40, n. 24, p. 7433–7438, 2015.

CHU, C.-Y.; TUNG, L.; LIN, C.-Y. Effect of substrate concentration and pH on biohydrogen production kinetics from food industry wastewater by mixed culture. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 35, p. 15849–15855, 2013.

CRUZ, F. E. DA. **Produção de hidrogênio em refinarias de petróleo : avaliação exérgica e custo de produção**. 184p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, 2010.

CUI, Y.; GALVITA, V.; RIHKO-STRUCKMANN, L.; LORENZ, H.; SUNDMACHER, K. Steam reforming of glycerol: The experimental activity of $\text{La}_{1-x}\text{Ce}_x\text{NiO}_3$ catalyst in comparison to the thermodynamic reaction equilibrium. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 90, n. 1-2, p. 29–37, 2009.

DASARI, M. A.; KIATSIMKUL, P. P.; SUTTERLIN, W. R.; SUPPES, G. J. Low-pressure hydrogenolysis of glycerol to propylene glycol. **Applied Catalysis A: General**, v. 281, n. 1-2, p. 225–231, 2005.

DHAR, B. R.; ELBESHISHY, E.; HAFEZ, H.; LEE, H. S. Hydrogen production from sugar beet juice using an integrated biohydrogen process of dark fermentation and microbial electrolysis cell. **Bioresource Technology**, v. 198, p. 223–230, 2015.

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

FORESTI, E. **Notas da aula de Processos e Operações em Tratamento de Resíduos SHS-705**. Pós Graduação em Hidráulica e Saneamento na Escola de Engenharia de São Carlos, 1998.

GINKEL, S. V; SUNG, S.; LAY, J. J. Biohydrogen production as a function of pH and substrate concentration. **Environmental science & technology**, v. 35, n. 24, p. 4726–30, 2001.

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

GUO, X. M.; TRABLY, E.; LATRILLE, E.; CARRRE, H.; STEYER, J. P. Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: A review. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, n. 19, p. 10660–10673, 2010.

HALLENBECK, P. C.; GHOSH, D. Advances in fermentative biohydrogen production: the way forward? **Trends in Biotechnology**, v. 27, n. 5, p. 287–297, 2009.

HU, B.; CHEN, S. Pretreatment of methanogenic granules for immobilized hydrogen fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 32, n. 15 SPEC. ISS., p. 3266–3273, 2007.

HUNG, C. H.; CHANG, Y. T.; CHANG, Y. J. Roles of microorganisms other than Clostridium and Enterobacter in anaerobic fermentative biohydrogen production systems - A review. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 18, p. 8437–8444, 2011.

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

KYAZZE, G.; MARTINEZ-PEREZ, M. DINSDALE, R.; PREMIER, G. C.; HAWKES, F. R.; GUWY, A. J.; HAWKES, D. L. Influence of substrate concentration on the stability and yield of continuous biohydrogen production. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 93, n. 5, p. 971–979, 2006.

KUMAR, V.; KOTHARI, R.; SINGH, S. Dark Fermentation: a green way to produce hydrogen and methane. **International Journal of Science, Technology & Society**, v. 1, p. 39–42, 2015.

LAMED, R. J.; LOBOS, J. H.; SU, T. M. Effects of Stirring and Hydrogen on Fermentation Products of Clostridium thermocellum. **Applied and environmental microbiology**, v. 54, n. 5, p. 1216–1221, 1988.

LAY, J. J. Modeling and optimization of anaerobic digested sludge converting starch to hydrogen. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 68, n. 3, p. 269–278, 2000.

LAY, J. J. Biohydrogen generation by mesophilic anaerobic fermentation of microcrystalline cellulose. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 74, n. 4, p. 280–287, 2001.

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

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

LEE, Z. K.; LI, S. L.; LIN, J. S.; Wang, Y. H.; KUO, P. C.; CHENG, S. S. Effect of pH in fermentation of vegetable kitchen wastes on hydrogen production under a thermophilic condition. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, n. 19, p. 5234–5241, 2008.

LEITE, J. A. C.; FERNANDES, B. S.; POZZI, E.; BARBOZA, M.; ZAIAT, M. Application of an anaerobic packed-bed bioreactor for the production of hydrogen and organic acids. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, n. 2, p. 579–586, 2008.

LERNER, K. L.; LERNER, B. W. **World of Microbiology and Immunology**. 701p. ed. Thomson Gale, 2003.

LEVIN, D. B.; PITT, L.; LOVE, M. Biohydrogen production: Prospects and limitations to practical application. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 29, n. 2, p. 173–185, 2004.

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

LOVATO, G. **Produção de biohidrogênio em ANSBBR tratando efluente do processo de produção de biodiesel - efeito da carga orgânica e do tempo de enchimento**. 246p. Dissertação (Mestrado em Ciências) Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2014.

LUO, G.; KARAKASHEV, D.; XIE, L.; ZHOU, Q.; ANGELIDAKI, I. Long-term effect of inoculum pretreatment on fermentative hydrogen production by repeated batch cultivations: Homoacetogenesis and methanogenesis as competitors to hydrogen production. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 108, n. 8, p. 1816–1827, 2011.

LUO, G.; XIE, L.; ZOU, Z.; WANG, W.; ZHOU, Q. Evaluation of pretreatment methods on mixed inoculum for both batch and continuous thermophilic biohydrogen production from cassava stillage. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 3, p. 959–964, 2010.

MACIEL, A. A.; CRUZ, K. S. T. C.; ALVES, F. Análise da geração do biogás de uma pequena central termoelétrica instalada em uma estação de tratamento de efluentes no município de Sabará, MG. **NBC-Periódico Científico do Núcleo de Biociências**, v. 5, n. 10, p. 16–24, 2015.

MAINTINGUER, S. I.; FERNANDES, B. S.; DUARTE, I. C. S. SAAVEDRA, N. K.; ADORNO, M. A. T.; VARESCHE, M. B. A. Fermentative hydrogen production with xylose by *Clostridium* and *Klebsiella* species in anaerobic batch reactors. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, n. 21, p. 13508–13517, 2011.

MEZALIRA, D. Z. **Preparação e caracterização de materiais com propriedades catalíticas para a obtenção de hidrogênio e carbono nanoestruturado a partir da decomposição do etanol e do glicerol**. 258p. Tese (Doutorado em Química), 2011.

MME - Ministério de Minas e Energia. **Roteiro para Estruturação da Economia do Hidrogênio no Brasil**. Disponível em: <www.mme.gov.br> Acesso em: 30 de Maio de 2016.

MOAT, A. G.; FOSTER, J. W.; SPECTOR, M. P. **Microbial physiology**. 4º ed. 734p. ed. Wiley-Liss, 2002.

MOTA, C. J. A.; SILVA, C. X. A. DA; GONÇALVES, V. L. C. Gliceroquímica: novos produtos e processos a partir da glicerina de produção de biodiesel. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 639–648, 2009.

MU, Y.; YU, H. Q.; WANG, G. Evaluation of three methods for enriching H₂-producing cultures from anaerobic sludge. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 4, p. 947–953, 2007.

MU, Y.; YU, H. Q.; WANG, Y. The role of pH in the fermentative H₂ production from an acidogenic granule-based reactor. **Chemosphere**, v. 64, n. 3, p. 350–358, 2006.

NEVES, L. M. V. **Produção de biohidrogênio por bactérias a partir de resíduos fermentescíveis**. 108p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química e Bioquímica) Faculdade de Ciência e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, 2009.

NOIKE, T.; TAKABATAKE, H.; MIZUNO, O.; OHBA, M. Inhibition of hydrogen fermentation of organic wastes by lactic acid bacteria. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 27, n. 11-12, p. 1367–1371, 2002.

ONU - Organização das Nações Unidas. **Adoption of the paris agreement**, 2015. Disponível em: < <http://unfccc.int/resource/docs/2015/cop21/eng/l09r01.pdf> > Acesso em: 30 de Maio de 2016.

O-THONG, S.; PRASERTSAN, P.; BIRKELAND, N. K. Evaluation of methods for preparing hydrogen-producing seed inocula under thermophilic condition by process performance and microbial community analysis. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 2, p. 909–918, 2009.

PARIZZI, J. B. **Utilização avançada da capacidade excedente de sistemas de transmissão CCAT para produção de oxigênio e hidrogênio**. 208p. Tese (Doutorado em Engenharia Elétrica) Universidade Federal de Santa Maria, 2008.

PENDYALA, B.; CHAGANTI, S. R.; LALMAN, J. A.; SHANMUGAM, S. R.; HEATH, D. D.; LAU, P. C. K. Pretreating mixed anaerobic communities from different sources: Correlating the hydrogen yield with hydrogenase activity and microbial diversity. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 17, p. 12175–12186, 2012.

PENTEADO, E. **Influência da origem e do pré-tratamento do inóculo na produção de hidrogênio a partir de águas residuárias em biorreatores anaeróbios**. 165p. Dissertação (Mestrado em Ciências), Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2012.

PÉREZ, R. S. **Produção de hidrogênio a partir da reforma em fase líquida do glicerol: Avaliação econômica e logística**. 166p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2014.

RABELO, C. A. B. S. **Avaliação de consórcio microbiano obtido a partir de lodo de estação de tratamento de efluentes de indústria de papel e celulose visando à produção de H₂ a partir de celulose**. 108p. Dissertação (Mestrado em Ciências), Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2014.

RAJESHWARI, K.V.; BALAKRISHNAN, M.; KANSAL, A.; LATA, K.; KISHORE, V. V. N. State-of-the-art of anaerobic digestion technology for industrial wastewater treatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 4, p. 135–156., 2000.

RATTI, R. P.; BOTTA, L. S.; SAKAMOTO, I. K.; VARESCHE, M. B. A. Microbial diversity of hydrogen-producing bacteria in batch reactors fed with cellulose using leachate as inoculum. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 23, p. 9707–9717, 2013.

REIS, C. M. **Efeito da velocidade ascensional e do tempo de detenção hidráulica na produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fluidizado**. 112p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal de São Carlos, 2010.

REN, N. Q.; GUO, W. Q.; WANG, X. J. XIANG, W. S.; LIU, B. F.; WANG, X. Z.; DING, J.; CHEN, Z. B. Effects of different pretreatment methods on fermentation types and dominant bacteria for hydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, n. 16, p. 4318–4324, 2008.

ROSSI, D. M.; COSTA, J. B.; SOUZA, E. A.; PERALBA, M. D. C. R.; SAMIOS, D.; AYUB, M. A. Z. Comparison of different pretreatment methods for hydrogen production using environmental microbial consortia on residual glycerol from biodiesel. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, n. 8, p. 4814–4819, 2011.

ROY, S.; KUMAR, K.; GHOSH, S.; DAS, D. Thermophilic biohydrogen production using pre-treated algal biomass as substrate. **Biomass and Bioenergy**, v. 61, p. 157–166, 2014.

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

SÁ, L. R. V.; CAMMAROTA, M. C.; DE OLIVEIRA, T. C.; OLIVEIRA, E. M. M.; MATOS, A.; FERREIRA-LEITÃO, V. S. Pentoses, hexoses and glycerin as substrates for biohydrogen production: An approach for Brazilian biofuel integration. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 7, p. 2986–2997, 2013.

SAADY, N. M. C. Homoacetogenesis during hydrogen production by mixed cultures dark fermentation: Unresolved challenge. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 30, p. 13172–13191, 2013.

SELEMBO, P. A.; PEREZ, J. M.; LLOYD, W. A.; LOGAN, B. E. Enhanced hydrogen and 1,3-propanediol production from glycerol by fermentation using mixed cultures. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 104, n. 6, p. 1098–1106, 2009.

SEQUINEL, R. **Caracterização físico-química da glicerina proveniente de usinas de biodiesel e determinação de metanol residual por CG com amostragem por Headspace estático**. 104p. Tese (Doutorado em Química) Universidade estadual Paulista, 2013.

SHOW, K. Y.; LEE, D. J.; TAY, J. H.; LIN, C. Y.; CHANG, J. S. Biohydrogen production: Current perspectives and the way forward. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 20, p. 15616–15631, 2012.

SILVA, F. T. M.; MOREIRA, L. R.; DE SOUZA FERREIRA, J.; BATISTA, F. R. X.; CARDOSO, V. L. Replacement of sugars to hydrogen production by *Rhodobacter capsulatus* using dark fermentation effluent as substrate. **Bioresource Technology**, v. 200, p. 72–80, 2016.

SPERLING, M.V. Princípios do Tratamento Biológico de Águas Residuárias - **Princípios Básicos do Tratamento de Esgotos**. DESA/UFMG, Belo Horizonte, v. 2 212p. 1996.

SU, H.; CHENG, J.; ZHOU, J.; SONG, W.; CEN, K. Hydrogen production from water hyacinth through dark- and photo- fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, n. 17, p. 8929–8937, 2010.

TANISHO, S.; ISHIWATA, Y. Continuous hydrogen production from molasses by fermentation using urethane foam as a support of flocks. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 20, n. 7, p. 541–545, 1995.

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**, v. 99, n. 1, p. 59–67, 2008.

WANG, J. L.; WAN, W. Comparison of different pretreatment methods for enriching hydrogen-producing bacteria from digested sludge. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, n. 12, p. 2934–2941, 2008a.

WANG, J.; WAN, W. Effect of temperature on fermentative hydrogen production by mixed cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, n. 20, p. 5392–5397, 2008b.

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

WU, K. J.; CHANG, C. F.; CHANG, J. S. Simultaneous production of biohydrogen and bioethanol with fluidized-bed and packed-bed bioreactors containing immobilized anaerobic sludge. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 7, p. 1165–1171, 2007.

XIAO, Y.; ZHANG, X.; ZHU, M.; TAN, W. Effect of the culture media optimization, pH and temperature on the biohydrogen production and the hydrogenase activities by *Klebsiella pneumoniae* ECU-15. **Bioresource Technology**, v. 137, p. 9–17, 2013.

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

ZAHEDI, S.; SALES, D.; ROMERO, L. I.; SOLERA, R. Dark fermentation from real solid waste. Evolution of microbial community. **Bioresource Technology**, v. 151, p. 221–226, 2014.

ZHAO, Q. B.; YU, H. Q. Fermentative H₂ production in an upflow anaerobic sludge blanket reactor at various pH values. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 5, p. 1353–1358, 2008.

ZHU, H.; BÉLAND, M. Evaluation of alternative methods of preparing hydrogen producing seeds from digested wastewater sludge. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 31, n. 14, p. 1980–1988, 2006.