



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**



**Investigação da produção de hidrogênio por fotofermentação empregando  
cultura pura e co-cultura**

**Rafaela Gonçalves Machado**

**Uberlândia - MG**

**2016**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**



Investigação da produção de hidrogênio por fotofermentação empregando  
cultura pura e co-cultura

Rafaela Gonçalves Machado

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vicelma Luiz Cardoso

Co-orientadora: Prof. Dr<sup>a</sup>. Juliana de Souza  
Ferreira

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação em Engenharia Química da  
Universidade Federal de Uberlândia como parte  
dos requisitos necessários à obtenção do título de  
Mestre em Engenharia Química.

Uberlândia - MG

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

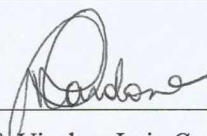
- M149i  
2016 Machado, Rafaela Gonçalves, 1991-  
Investigação da produção de hidrogênio por fotofermentação  
empregando cultura pura e co-cultura / Rafaela Gonçalves Machado. -  
2016.  
77 f. : il.
- Orientadora: Vicelma Luiz Cardoso.  
Coorientadora: Juliana de Souza Ferreira.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.  
Inclui bibliografia.
1. Engenharia química - Teses. 2. Hidrogênio - Teses. 3.  
Fermentação - Teses. I. Cardoso, Vicelma Luiz. II. Ferreira, Juliana de  
Souza. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-  
Graduação em Engenharia Química. IV. Título.

---

CDU: 66.0

DISSERTAÇÃO DE MESTRADOSUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM ENGENHARIA QUÍMICA, EM 19DE JULHODE 2016.


BANCA EXAMINADORA



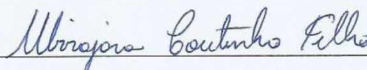
Prof. Dr<sup>a</sup>. Vicelma Luiz Cardoso  
Orientador (PPGEQ/UFU)



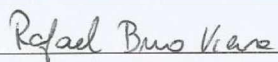
Prof. Dr<sup>a</sup>. Juliana de Souza Ferreira  
Co-orientadora (PPGEQ/UFU)



Prof. Dr<sup>a</sup>. Larissa Nayhara Soares Santana Falleiros  
(PPGEQ/UFU)



Prof. Dr. Ubirajara Coutinho Filho  
(PPGEQ/UFU)



Prof. Dr. Rafael Bruno Vieira  
(PPGEQ/UFPR)

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pelo dom da vida e pela oportunidade de aprimorar meus conhecimentos a partir deste trabalho.

Aos meus pais, Antônio e Antônia, por ser o meu suporte e pelo apoio incondicional de sempre.

Aos meus irmãos, Felipe e Pedro Henrique, pela paciência e compreensão pelas vezes que me ausentei.

Aos meus familiares e amigos pelo incentivo e carinho de todas as horas.

A minha orientadora, Professora Vicelma Luiz Cardoso, pela orientação, dedicação, ensinamentos, compreensão durante este trabalho e por ser um exemplo de docente a ser seguido.

A minha co-orientadora, Professora Juliana de Souza Ferreira, pela disponibilidade, atenção, horas dedicadas ao nosso trabalho e paciência.

A Professora Fabiana Regina Xavier Batista, pelo apoio, sugestões que permitiram aprimorar o trabalho e incentivo.

A Doutora Betânia Romão e ao Mestre Felipe Thalles Moreira Silva pelos ensinamentos e por sempre estarem dispostos a ajudar.

Aos colegas do Nubio, pelo companheirismo durante esse tempo de mestrado. Em especial, meus amigos Felipe, Letícia, Marília e Roseli, pela ajuda e apoio em todos os momentos e por compartilharem os prazeres e as dificuldades vividas durante o tempo que passamos juntos.

A FEQ pela estrutura proporcionada, em especial, a Cecília pela atenção e profissionalismo.

Aos órgãos de fomento CAPES, FAPEMIG e CNPq pela oportunidade e apoio financeiro.

À Vale S.A pela concessão de recursos financeiros proporcionando o desenvolvimento deste trabalho.

Enfim, a todos que de forma direta ou indiretamente contribuíram para a execução deste trabalho.

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO 2 - OBJETIVOS.....</b>	<b>3</b>
2.1 Objetivos específicos.....	3
<b>CAPÍTULO 3 -REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>4</b>
3.1 O uso de combustíveis fósseis e suas consequências .....	4
3.2 O hidrogênio como fonte de energia alternativa .....	5
3.3 Produção biológica de hidrogênio .....	7
3.3.1 Biofotólise da água .....	7
3.3.2 Fermentação anaeróbia ou fermentação escura.....	9
3.3.3 Fotofermentação .....	14
3.3.4 Sistemas híbridos.....	20
<b>CAPÍTULO 4 - MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>22</b>
4.1 Material .....	22
4.1.1 Microrganismos.....	22
4.2 Meio de cultura e meio fermentescível.....	22
4.3 Condição dos ensaios em escala reduzida - reatores de 50 mL.....	23
4.4 Condição dos ensaios em escala ampliada - reatores de 1,5 L .....	25
4.5 Metodologia analítica .....	27
4.5.1 Determinação da concentração celular .....	27
4.5.2 Análises cromatográficas.....	28
4.5.2.1 Quantificação de ácidos orgânicos, açúcares e etanol .....	28
4.5.2.2 Determinação do gás hidrogênio .....	28
4.5.3 Carbono orgânico total e nitrogênio total .....	28
4.5.4 Determinação da Demanda Bioquímica de Oxigênio (DQO) .....	29
<b>CAPÍTULO 5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>30</b>
5.1 Ensaio em escala reduzida: reator de 50 mL.....	30
5.2 Ensaio em escala ampliada: batelada alimentada em reator de 1,5 L .....	33
<b>CAPÍTULO 6 - CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....</b>	<b>57</b>
6.1 Conclusões .....	57
6.2 Sugestões para trabalhos futuros .....	58
<b>CAPÍTULO 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>59</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 - Esquema da biofotólise realizada por algas verdes e cianobactérias (Adaptado de HALLENBECK e GHOSH, 2009).....	7
Figura 3.2 - Representação esquemática das principais etapas do processo fermentativo anaeróbio (Adaptado de GUO et al., 2010). ....	11
Figura 3.3 - Representação do fluxo de prótons (---->), fluxo metabólico para multiplicação celular (—>) e fluxo metabólico para produção de hidrogênio (—>) das bactérias púrpuras não sulfurosas (Adaptado de GOLOMYSOVA et al., 2010). ....	15
Figura 4.1 - Fluxograma da produção de hidrogênio por fotofermentação em reatores de 50 mL. ....	24
Figura 4.2 - Fluxograma da produção de hidrogênio por fotofermentação em reatores de 1,5 L. ....	26
Figura 5.1 - Dados de mol de hidrogênio acumulado (a), produtividade de hidrogênio (b), concentração de glicose (c), volume de biogás produzido (d), concentração de células (e), variação da razão C/N (f) e perfil de DQO (g) para fotofermentação em batelada alimentada com glicose por <i>R. palustris</i> . ....	35
Figura 5.2 - Dados de mol de hidrogênio pontual (a), perfil da concentração do ácido láctico ( $\Delta$ ), ácido butírico ( $\blacktriangle$ ) e etanol ( $\diamond$ ) (b), perfil da concentração do ácido fórmico ( $\blacktriangleright$ ), ácido acético ( $\square$ ) e ácido propiônico ( $\blacksquare$ ) (c) para fotofermentação em batelada alimentada com glicose por <i>R. palustris</i> . ....	37
Figura 5.3 - Dados de mol de hidrogênio acumulado (a), produtividade de hidrogênio (b), concentração de glicose (c), volume de biogás produzido (d), concentração de células (e), variação da razão C/N (f) e perfil de DQO (g) para fotofermentação em batelada alimentada com glicose por co-cultura. ....	40
Figura 5.4 - Dados de mol de hidrogênio pontual (a), perfil da concentração do ácido láctico ( $\Delta$ ), ácido butírico ( $\blacktriangle$ ) e etanol ( $\diamond$ ) (b), perfil da concentração dos ácidos fórmico ( $\blacktriangleright$ ), acético ( $\square$ ) e propiônico ( $\blacksquare$ ) (c) para fotofermentação em batelada alimentada com glicose por co-cultura. ....	41
Figura 5.5 - Dados de mol de hidrogênio acumulado (a), produtividade de hidrogênio (b), concentração de glicose (c), volume de biogás produzido (d), concentração de células (e), variação da razão C/N (f) e perfil de DQO (g) para fotofermentação em batelada alimentada com glicose por co-cultura aclimatada. ....	44
Figura 5.6 - Dados de mol de hidrogênio pontual (a), perfil da concentração do ácido láctico ( $\Delta$ ), ácido butírico ( $\blacktriangle$ ) e etanol ( $\diamond$ ) (b), perfil da concentração do ácido fórmico ( $\blacktriangleright$ ), ácido acético ( $\square$ ) e ácido propiônico ( $\blacksquare$ ) (c) para fotofermentação em batelada alimentada com glicose por co-cultura aclimatada. ....	45

Figura 5.7 - Dados de mol de hidrogênio acumulado (a), produtividade de hidrogênio (b), concentração de lactose (c), volume de biogás produzido (d), concentração de células (e), variação da razão C/N (f) e perfil de DQO (g) para fotofermentação em batelada alimentada com lactose por *R. palustris*. ..... 47

Figura 5.8 - Dados de mol de hidrogênio pontual (a), perfil da concentração do ácido láctico ( $\Delta$ ), ácido butírico ( $\blacktriangle$ ) e etanol ( $\diamond$ ) (b), perfil da concentração dos ácidos fórmico ( $\blacktriangleright$ ), acético ( $\square$ ) e propiônico ( $\blacksquare$ ) (c) para fotofermentação em batelada alimentada com lactose por *R. palustris*. ..... 49

Figura 5.9 - Dados de mol de hidrogênio acumulado (a), produtividade de hidrogênio (b), concentração de lactose (c), volume de biogás produzido (d), concentração de células (e), variação da razão C/N (f) e perfil de DQO (g) para fotofermentação em batelada alimentada com lactose por co-cultura. .... 51

Figura 5.10 - Dados de mol de hidrogênio pontual (a), perfil da concentração do ácido láctico ( $\Delta$ ), ácido butírico ( $\blacktriangle$ ) e etanol ( $\diamond$ ) (b), perfil da concentração do ácido fórmico ( $\triangleright$ ), ácido acético ( $\square$ ) e ácido propiônico ( $\blacksquare$ ) (c) para fotofermentação em batelada alimentada com lactose por co-cultura. .... 53



## LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 - Componentes do meio RCV .....	22
Tabela 4.2 - Composição da solução de micronutrientes utilizada no meio RCV .....	23
Tabela 5.1 - Influência da composição do meio suplementado com diferentes açúcares: meio RCV e meio do efluente da fermentação escura para produção de hidrogênio por fotofermentação .....	30
Tabela 5.2 - Composição de ácidos orgânicos na fotofermentação com meio suplementado com diferentes açúcares: meio RCV e meio do efluente da fermentação escura .....	31
Tabela 5.3 - Composição do efluente utilizado como substrato no Ensaio 3 de fotofermentação por <i>R. palustris</i> em escala ampliada. ....	34
Tabela 5.4 - Composição do efluente utilizado como substrato no Ensaio 4 de fotofermentação por co-cultura em escala ampliada. ....	38
Tabela 5.5 - Composição do efluente utilizado como substrato no Ensaio 5 de fotofermentação por co-cultura aclimatada em escala ampliada. ....	43
Tabela 5.6 - Composição do efluente utilizado como substrato no Ensaio 6 de fotofermentação por <i>R. palustris</i> em escala ampliada. ....	46
Tabela 5.7 - Composição do efluente utilizado como substrato no Ensaio 7 de fotofermentação por co-cultura em escala ampliada. ....	50
Tabela 5.8 - Mol de hidrogênio por volume de reator para a escala reduzida (50 mL). ....	54
Tabela 5.9 - Mol de hidrogênio por volume de reator para a escala ampliada (1,5 L). ....	54
Tabela 5.10 - Consolidação dos resultados obtidos nos ensaios realizados em reatores de 1,5 L. ....	56

## **SIMBOLOGIA E ABREVIATURAS**

Hidrogênio – H<sub>2</sub>

Púrpuras não sulfurosas – PNS

Dióxido de carbono – CO<sub>2</sub>

Adenosina trifosfato – ATP

Oxigênio – O<sub>2</sub>

Fotossistema I – FSI

Fotossistema II – FSII

Ferredoxina – Fd

Níquel – Ni

Ferro – Fe

Selênio – Se

Molibdênio – Mo

Vanádio – V

## RESUMO

A utilização do hidrogênio como recurso energético em substituição aos combustíveis fósseis é uma opção bastante promissora. O emprego de um sistema híbrido para a produção desse gás combinando a fermentação escura seguida da fotofermentação possui um grande potencial, pois permite a conversão total do substrato. Neste trabalho, estudou-se a produção do hidrogênio em processo batelada e batelada alimentada empregando o efluente proveniente da fermentação escura e os sistemas de cultura pura e co-cultura formado pelas bactérias púrpuras não sulfurosas *Rhodopseudomonas palustris* e *Rhodobacter capsulatus*. Primeiramente, os experimentos foram realizados em reatores de 50 mL nos quais foi testada a influência do meio sintético RCV e do efluente da fermentação escura na produção de hidrogênio enriquecendo o meio com lactose, glicose e melaço de soja como fontes de açúcares. Os resultados obtidos nestes ensaios mostraram que o efluente, contendo ácidos orgânicos, produz melhores resultados quando comparado ao meio sintético. Tal fato mostrou que há uma sinergia entre os metabólitos formados na fermentação escura e a fonte de açúcar. O teste suplementado com o melaço de soja no efluente apresentou maiores resultados na produção de hidrogênio, obtendo uma produtividade de 8,34 mmol de  $H_2/L \cdot dia$ . Posteriormente, foram realizados ensaios em batelada alimentada em escala ampliada (1,5 L) para acompanhar a produção do biogás ao longo do tempo. Foi estudada a influência dos açúcares glicose e a lactose suplementados no efluente da fermentação escura, sendo usado o inóculo na forma de cultura pura (*R. palustris*) e co-cultura (*R. palustris* e *R. capsulatus*). Os resultados permitiram observar que o sistema empregando a co-cultura e meio enriquecido com glicose manteve a cultura ativa por mais tempo o que levou a formação de hidrogênio até 679 h de processo. Nesse ensaio a quantidade de hidrogênio acumulado foi de 0,51 mols e a produtividade de 287,39 mmol de  $H_2/L \cdot dia$ . Este estudo mostrou que a fotofermentação empregando co-cultura de *R. palustris* e *R. capsulatus*, a partir do efluente de fermentação escura enriquecido com açúcares, é uma rota biológica viável para a produção de hidrogênio.

Palavras-chave: hidrogênio, fotofermentação, *Rhodopseudomonas palustris*, *Rhodobacter capsulatus*.

## ABSTRACT

The use of bio-hydrogen as an energy source to replace fossil fuels is a promising alternative. The hybrid system for hydrogen production by combining the dark fermentation followed by photo-fermentation has great potential because it allows the total substrate conversion. In this work, the production of hydrogen was studied in batch and fed batch processes using dark fermentation effluent and pure culture and co-culture purple non-sulfur bacteria *Rhodopseudomonas palustris* and *Rhodobacter capsulatus*. Initially, tests were carried out in 50 mL reactors in order to test the influence of synthetic RCV medium and the effluent from dark fermentation for hydrogen. Lactose, glucose or soybean molasses as a sugar source were supplemented. The showed that effluent containing organic acids produces better results than synthetic medium. This fact shows there is a synergism between metabolites formed in dark fermentation and the sugar source. The assay of photo-fermentation, containing soy molasses in the effluent showed better results in the production of hydrogen, with a productivity of 8.34 mmol H<sub>2</sub> / L·day. Subsequently, tests were performed in large scale (1.5 L) to observe the biogas production. During the process the influence of sugar (glucose and lactose) supplementation was studied for that, it was used an inoculum with the pure culture (*R. palustris*) and co-culture (*R. palustris* and *R. capsulatus*). The results showed that the system employing the co-culture and glucose kept the culture activity for a long time (679 h). In this assay, the amount of accumulated hydrogen was 0.51 mol and the maximum productivity was 287.39 mmol of H<sub>2</sub>/L·day. This study indicated that photo-fermentation by using co-culture of *R. palustris* and *R. capsulatus*, from dark fermentation effluent supplemented with sugars, is a viable biological route to produce hydrogen.

Keywords: hydrogen, photo-fermentation, *Rhodopseudomonas palustris*, *Rhodobacter capsulatus*.

---

## CAPÍTULO 1

### INTRODUÇÃO

---

As fontes energéticas têm grande importância no desenvolvimento das nações, e é nesse contexto que em meados dos anos 70, com a primeira crise do petróleo, vários países passaram a buscar por fontes alternativas de energia, visando diminuir a forte dependência do petróleo (TOLMASQUIM et al., 2007). Na década de 80, com o preço do petróleo estabilizado, a atenção voltou-se para as questões ligadas ao meio ambiente, já que a emissão de gases poluentes provenientes da combustão de combustíveis fósseis, como o carvão, gás natural e petróleo, causa graves alterações climáticas como o agravamento do aquecimento global. Além disso, esses combustíveis não renováveis continuam sendo os principais recursos utilizados mundialmente (ALVAREZ-GUZMAN et al., 2016). Assim, pesquisas vêm sendo realizadas para encontrar fontes energéticas que sejam inesgotáveis e sustentáveis, com processos de produção que tenham custo e benefício satisfatórios. Nessa conjuntura, o hidrogênio mostra-se como uma alternativa bastante promissora, sendo denominado por muitos autores como o combustível do futuro (DAS e VEZIROGLU, 2001; ZHANG et al., 2015).

O hidrogênio destaca-se por apresentar uma elevada densidade energética, 141,86 kJ/g, sendo superior aos combustíveis à base de hidrocarbonetos, como por exemplo, o metano (55,53 kJ/g), propano (50,36 kJ/g) e a gasolina (47,50 kJ/g) (VARGAS, 2013). Ademais, sua combustão direta libera somente água como subproduto ( $\text{H}_2 + 1/2 \text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O}$ ), reduzindo assim os impactos ambientais (ABDALLAH et al., 2016). O hidrogênio, também é capaz de gerar energia elétrica através de células a combustível e ser utilizado em meios de transportes pelas mesmas células ou através de motores de combustão interna (KOTAY e DAS, 2008; DAS e VEZIROGLU, 2008).

Atualmente, o hidrogênio é produzido a partir de combustíveis fósseis, biomassa e água. Dentre os principais métodos utilizados para sua produção, destacam-se a reforma do gás natural, a oxidação de hidrocarbonetos, a gaseificação do carvão e a eletrólise da água (AZWAR et al., 2014). Os métodos citados requerem altas temperaturas e pressões para operação, o que demanda uma elevada quantidade de energia, além de serem processos dispendiosos (KOTHARI et al., 2008). Em contrapartida, a produção de hidrogênio via processos biológicos, que corresponde apenas a 1 % da produção total de hidrogênio, é uma alternativa promissora por ser realizada em temperatura e pressão ambiente, representando uma redução no consumo de energia e, consequentemente,

obtêm-se balanços energéticos favoráveis (BALAT e KIRTAY, 2010; DAS e VEZIROGLU, 2001). Uma ampla variedade de resíduos, como materiais lignocelulósicos, glicerina, resíduos alimentícios e lácteos, entre outros, podem ser utilizados como substratos, fazendo com que o baixo custo da matéria-prima torne a produção de hidrogênio competitiva em relação aos métodos já existentes (WANG e WAN, 2009; NEVES, 2009).

Dentre os sistemas biológicos para produção de hidrogênio, encontram-se a biofotólise da água, a fermentação anaeróbia ou fermentação escura, a fotofermentação e sistemas híbridos, que é uma combinação de rotas biológicas (AZWAR et al., 2014).

A fermentação anaeróbia ou escura tem se destacado, devido às suas rápidas taxas de conversão de hidrogênio e a possibilidade de utilização de diferentes fontes renováveis como substrato (ROSA et al., 2011). No entanto, a referida tecnologia apresenta algumas limitações, como a grande quantidade de subprodutos (ácidos orgânicos) gerados, consumo de hidrogênio por bactérias metanogênicas, bactérias sulfato e nitrato-redutoras e baixo rendimento de hidrogênio (HALLENBECK e GHOSH, 2009; SAADY, 2013). Um recurso que pode ser empregado para minimizar a alta carga orgânica remanescente no meio da fermentação escura (na forma de ácidos orgânicos) e aumentar o rendimento final de hidrogênio é utilizar um sistema híbrido, sendo que, o mais comumente utilizado é o efluente proveniente da fermentação escura empregado como substrato no processo de fotofermentação. A combinação do processo fermentativo seguido pelo fotossintético é considerado o mais promissor, pois é capaz de alcançar a conversão completa do substrato e aumentar o rendimento final de hidrogênio (LO et al., 2010; ARGUN e KARGI, 2011; KHUSNUTDINOVA et al., 2012).

Em face ao exposto, esse trabalho foi realizado com o intuito de estudar a produção de hidrogênio por fotofermentação, empregando as bactérias púrpuras não sulfurosas *R. capsulatus* e *R. palustris*, em sistemas de cultura pura e co-cultura. Foi utilizado como substrato o efluente proveniente da fermentação escura suplementado com diferentes fontes de carbono, expandindo dessa forma, as possibilidades de produção de hidrogênio e aumentando seu rendimento final.

---

## CAPÍTULO 2

### OBJETIVOS

---

Avaliar a produção biológica de hidrogênio por fotofermentação em batelada e batelada alimentada, utilizando sistemas de cultura pura (*R. palustris*) e co-cultura (*R. palustris* e *R. capsulatus*) com diferentes fontes de açúcares.

#### 2.1 Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste estudo podem ser sumarizados em:

- ✓ Investigar o uso do efluente da fermentação escura como substrato para a fotofermentação.
- ✓ Avaliar a produção de hidrogênio através de sistemas de cultura pura e co-cultura das bactérias fotossintetizantes (PNS).
- ✓ Estudar o efeito da suplementação do meio de fotofermentação com diferentes açúcares (glicose e lactose).

---

## CAPÍTULO 3

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

---

#### **3.1 O uso de combustíveis fósseis e suas consequências**

O desenvolvimento tecnológico, juntamente com as mudanças estruturais da economia, fez com que houvesse uma alternância das fontes energéticas ao longo da história. No período pré-industrial, a lenha e o carvão vegetal eram utilizados pela humanidade como recursos energéticos. Na era da Revolução Industrial o destaque foi para o uso de carvão mineral, sendo que, no final do século XIX tal recurso foi substituído pelos derivados do petróleo (FADIGAS et al., 2012). Desde então, o petróleo passou a exercer uma função central no desenvolvimento e na modernização das economias, destacando-se por possuir um conteúdo energético elevado, podendo ser transportado sem dificuldades e, além disso, o seu processamento é capaz de produzir combustíveis com múltiplas funções. A partir da segunda metade do século passado, estudos foram iniciados para encontrar fontes de energia que pudessem substituir o petróleo, nesse contexto, despontava-se a energia nuclear. O desenvolvimento e a transferência de tal tecnologia, a produção em larga escala e os riscos de acidentes, foram as dificuldades encontradas que impossibilitaram a energia nuclear de tornar-se o combustível mundial, o que fortaleceu ainda mais a hegemonia do petróleo (AMARAL, 2010; COSTA e PRATES, 2005)

O consumo acelerado dos combustíveis fósseis levou a sérios problemas ambientais, pois a sua queima libera para a atmosfera gases como óxidos de carbono, nitrogênio e enxofre que são responsáveis pelo agravamento do efeito estufa, causando o aquecimento global, além da ocorrência de chuvas ácidas e diminuição da camada de ozônio (LEITE, 2010).

O agravamento dos problemas ambientais e a oferta limitada desses combustíveis incentivaram as pesquisas a buscar por fontes energéticas renováveis e ambientalmente sustentáveis. E dessa forma, nota-se o hidrogênio como uma alternativa atraente aos combustíveis fósseis (DAS e VEZIROGLU, 2008; ZHANG et al., 2015).



### 3.2 O hidrogênio como fonte de energia alternativa

O hidrogênio é o elemento mais abundante na Terra e é encontrado, principalmente, na forma de compostos, geralmente, ligado a moléculas de água e hidrocarbonetos (SCHLAPBACH e ZUTTEL, 2005). Apenas uma pequena fração pode ser encontrada na forma gasosa ou molecular (MME, 2014). O hidrogênio molecular é o gás mais leve conhecido, além de ser incolor, inodoro, insípido, inflamável e insolúvel em água (NETO, 2005).

A maior parte da produção total de hidrogênio (aproximadamente 50%) é utilizada em indústrias químicas para a produção de fertilizantes e petroquímicas no tratamento do petróleo bruto (cerca de 37%). A menor parcela produzida é dedicada ao uso do hidrogênio como reagente nos processos de hidrogenação, como combustível para motores de foguete e como fluido de refrigeração em geradores elétricos (DAS e VEZIROGLU, 2008; KOTAY e DAS, 2008).

Além das aplicações citadas, o hidrogênio está sendo considerado um potencial combustível para o futuro, pois possui uma alta eficiência de conversão em potência útil, com o mais alto teor de energia por unidade em peso do que qualquer outro combustível (142 kJ/g). O referido gás pode ser facilmente convertido em eletricidade por células combustíveis e a sua combustão libera apenas energia e vapor de água, já que não há átomos de carbono em sua estrutura (DAS e VEZIROGLU, 2008; ABDALLAH et al., 2016).

Os processos químicos convencionais são os responsáveis pela maior parte da produção de hidrogênio. Dentre os principais métodos, cita-se a reforma a vapor, que é responsável por cerca de 40 % da produção de hidrogênio, seguido pela oxidação parcial de hidrocarbonetos pesados (30 %), gaseificação do carvão (18 %) e eletrólise da água (5 %) (NEVES, 2009). Na reforma a vapor, os hidrocarbonetos (principalmente metano) reagem com o vapor de água, produzindo gás hidrogênio e monóxido de carbono, de acordo com a Equação 3.1 (HOLLADAY et al., 2009).



A reação entre o hidrocarboneto e o vapor de água é altamente endotérmico ( $\Delta H^\circ_{298\text{K}} = + 206,2 \text{ kJ/mol}$ ), o que requer maior energia para que a reação aconteça. Além disso, a conversão a hidrogênio ocorre em temperaturas e pressões acima de 900 °C e 30 bar, respectivamente (NAVARRO et al., 2007). Em seguida, para aumentar o

rendimento de hidrogênio, pode-se realizar a reação de deslocamento da água. No qual, o monóxido de carbono, formado na reforma a vapor, é convertido em dióxido de carbono e hidrogênio, como mostra a Equação 3.2.



No processo de oxidação parcial a menor quantidade estequiométrica de oxigênio disponível para reagir com hidrocarbonetos, resulta primariamente na formação de hidrogênio e monóxido de carbono e componentes traços como dióxido de carbono e outros. O gás produzido é denominado por gás de síntese, do qual o hidrogênio pode ser extraído. Para maximizar a produção de hidrogênio submete-se o gás de síntese à reação de deslocamento da água, como na reforma a vapor (KORDESH e SIMADER, 1996; CHAUBEY et al., 2013).

As reações de gaseificação, também empregadas em ampla escala, consistem na decomposição térmica de um material carbonáceo formando o gás de síntese ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{CO}$ ,  $\text{H}_2$ ,  $\text{CH}_4$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ) e alguns particulados como alcatrão, cinzas e carvão (COHCE, et al., 2011). A obtenção de hidrogênio por essa via ocorre em altas temperaturas, variando de  $500\text{ }^\circ\text{C}$  à  $1\ 400\text{ }^\circ\text{C}$ , e em pressões atmosféricas ou superiores, podendo chegar à 33 bar (HERNÁNDEZ et al., 2013).

Outra forma de produção de hidrogênio é a partir da eletrólise, em que, a água é convertida em hidrogênio e oxigênio pela passagem de uma corrente elétrica direta na água, contendo sais de hidróxidos de metais alcalinos (SOLLI, 2004). O método por eletrólise apresenta alto custo quando comparado a reforma a vapor, no entanto, obtém-se uma alta pureza de hidrogênio que é necessária em algumas aplicações e uma flexibilidade de operação. Ambos os fatores justificam a participação da eletrólise no mercado atual (SORESEN, 2004).

Desse modo, nota-se que as rotas de produção químicas convencionais de hidrogênio requerem alta demanda energética e alta pressão de operação. Por outro lado, a produção de hidrogênio por via biológica, pode ser executada a temperatura e pressão ambiente, o que a torna competitiva em relação às rotas convencionais. Além disso, pode-se empregar como substratos matérias-primas de baixo custo como, por exemplo, águas residuais que contenham quantidades consideráveis de matéria biodegradável (BABU et al., 2009). Existe também, uma grande diversidade filogenética e fisiológica de microrganismos que são capazes de produzir hidrogênio (SINHA e PANDEY, 2011).

### 3.3 Produção biológica de hidrogênio

A produção de hidrogênio via processo biológico utiliza a capacidade dos microrganismos em transformar matérias-primas em hidrogênio através de processos fotossintéticos, fermentativos ou uma combinação de ambos. Desse modo, pode ocorrer a biofotólise da água realizada por algas ou cianobactérias, a fotofermentação de compostos orgânicos através de bactérias fotossintetizantes, a fermentação anaeróbia (ou escura) de compostos orgânicos realizados por bactérias fermentativas e sistemas híbridos, que combinam o uso de bactérias fermentativas e fotossintéticas (DAS e VEZIROGLU, 2008; KIRTAY, 2011). Os sistemas híbridos têm a finalidade de aumentar o rendimento final de hidrogênio, já que a sinergia do processo permite uma maior utilização do substrato e diminui as limitações biológicas (NEVES, 2009).

#### 3.3.1 Biofotólise da água

O processo de biofotólise é caracterizado pela ação da luz sobre um sistema biológico causando a degradação da água e resultando, ao final do processo, a formação de hidrogênio molecular. A biofotólise da água é possível devido à ação fotossintética de algas verdes e cianobactérias (MATHEWS e WANG, 2009). Tais microrganismos são capazes de capturar a energia solar através de sistemas fotossintéticos denominados de fotossistema I (FSI) e fotossistema II (FSII), como mostra a Figura 3.1.

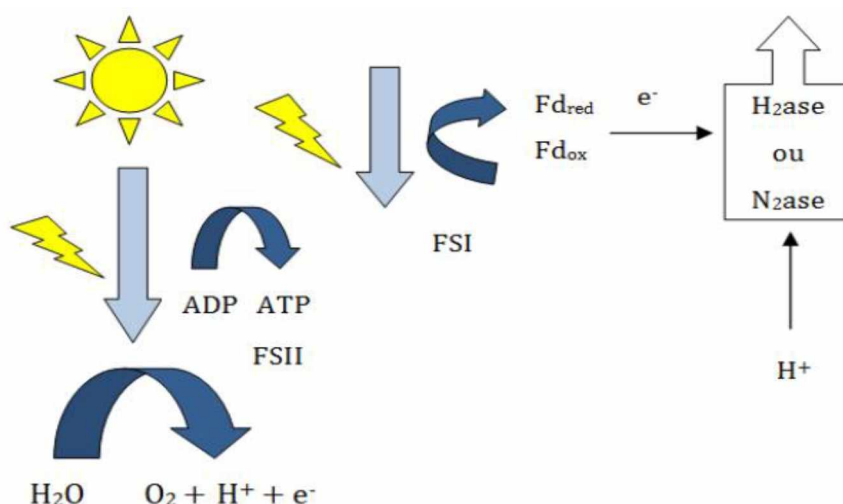


Figura 3.1 - Esquema da biofotólise realizada por algas verdes e cianobactérias (Adaptado de HALLENBECK e GHOSH, 2009).

Na biofotólise direta, realizada pelas algas verdes, a absorção da energia luminosa, no FSII, promove a fragmentação da molécula de água em hidrogênio na forma de prótons ( $H^+$ ), oxigênio molecular ( $O_2$ ) e elétrons ( $e^-$ ) (DAS e VEZIROGLU, 2008). Os elétrons gerados são transportados para o FSI, com o auxílio de uma proteína que possui propriedades de oxirredução, a ferredoxina (Fd). Na sequência, a Fd sofre oxidação e reduz o carreador NADP à NADH. O NADH é responsável por carrear os elétrons até o Ciclo de Calvin, em que, por um conjunto de reações, ocorre a fixação do gás carbônico em carboidratos. Em condições anaeróbias, quando há um excesso de elétrons no sistema, a Fd é capaz de fornecer elétrons para reduzir os prótons  $H^+$ , formando o hidrogênio molecular (MATHEWS e WANG, 2009; HOLLADAY et al., 2009). A reação de conversão da água para formação de hidrogênio é mostrada pelas Equações 3.3, 3.4 e 3.5. Sendo que, a Equação 3.3 representa a etapa que ocorre no FSII, e as Equações 3.4 e 3.5 acontecem no FSI (DAS e VEZIROGLU, 2008).



Na biofotólise direta realizada por algas verdes, a enzima responsável por catalisar a formação do hidrogênio molecular é a hidrogenase (DASGUPTA et al., 2010). A presença de oxigênio, proveniente do fotossistema II, é capaz de inibir a ação da hidrogenase desfavorecendo a produção de hidrogênio. Assim, na biofotólise direta, a produção de hidrogênio dá-se em condições anaeróbias e no período sem luz, onde o processo de respiração das algas verdes consome o oxigênio permitindo a ativação da hidrogenase. Quando a fotossíntese é restabelecida, com a presença da luz, a produção volta a ficar comprometida. A supressão do meio com enxofre é uma alternativa que visa diminuir a atividade do fotossistema II, fazendo com que a respiração seja constante, mas a produção de oxigênio menor, assim a concentração do referido gás, não impedirá a formação do hidrogênio (DAS e VEZIROGLU, 2001; MCKINLAY e HARWOOD, 2010).

Na biofotólise realizada por cianobactérias, chamada de biofotólise indireta, ocorre o processo de fotossíntese assim como a fixação do nitrogênio atmosférico

(DASGUPTA et al., 2010). No entanto, as cianobactérias separam esses processos (fotossíntese e fixação) temporalmente, ou espacialmente, visto que, a formação de hidrogênio também é inibida pela presença de oxigênio nesses organismos. Na separação temporal, durante o dia com a presença da luz as cianobactérias realizam a fotossíntese e à noite, na ausência de luz, fixam o nitrogênio. Já a separação espacial, dá-se em função da capacidade de alguns organismos em desenvolverem uma organela vegetal, denominada por heterocisto. O heterocisto não possui o FSII ativo, portanto não realiza fotossíntese. Esse fator possibilita a fixação de nitrogênio independente da presença ou ausência de luz. Nas cianobactérias há tanto hidrogenase quanto nitrogenase e tais enzimas requerem o uso de ATP como recurso energético, diferentemente da biofotólise direta que não necessita de tal recurso (DASGUPTA et al., 2010).

### **3.3.2 Fermentação anaeróbia ou fermentação escura**

O processo de fermentação anaeróbia ou escura consiste no emprego de bactérias fermentativas capazes de degradar substratos ricos em matéria orgânica em compostos mais simples como ácidos orgânicos voláteis, álcoois, metano, dióxido de carbono e hidrogênio na ausência de luz e oxigênio (ARGUN e KARGI, 2011).

A formação do hidrogênio pela ação da enzima hidrogenase no processo fermentativo, é a forma de eliminar o excesso de elétrons gerados durante a degradação do substrato (NATH e DAS, 2004). A hidrogenase é uma metaloproteína, possuindo dessa forma, metais em seus sítios ativos (DASGUPTA et al., 2010). Quando há ferro em seu centro catalítico, essas enzimas são denominadas [FeFe]-hidrogenases e aquelas que possuem níquel e ferro são as [NiFe]-hidrogenases. Além dos metais citados, algumas enzimas podem apresentar selênio, níquel e ferro sendo as [NiFeSe]-hidrogenases (HALLENBECK e BENEMANN, 2002; VIGNAIS e COLBEAU, 2004). Geralmente as [FeFe]-hidrogenases são encontradas em microrganismos produtores de hidrogênio ao contrário das [NiFe]-hidrogenases e [NiFeSe]-hidrogenases, que frequentemente são encontradas em microrganismos consumidores de hidrogênio (MEYER, 2007). O controle do pH durante o processo é imprescindível, uma vez que, pH baixos inibem a atividade da referida enzima refletindo diretamente na formação de hidrogênio (LAY, 2000).

Os microrganismos empregados na fermentação podem apresentar-se na forma de culturas mistas, proveniente de ambientes naturais, ou culturas puras. Devem ser capazes

de promover uma fermentação estável e de autorregulação (VALDEZ-VASQUEZ e POGGI-VARALDO, 2009). Nesse aspecto, os microrganismos mais estudados até o momento são pertencentes aos gêneros *Clostridium* e *Enterobacter*; destacando-se as espécies *Clostridium butyricum* (TAI et al., 2010), *Clostridium sp* (KAMALASKAR et al., 2010), *Clostridium beijerinckii* (SKONIECZNY e YARGEU et al., 2009), *Enterobacter aerogenes* (JAYASINGHEARACHCHI et al., 2009), e *Enterobacter cloacae* (MANDAL et al., 2006).

Existe uma ampla variedade de materiais que podem ser utilizados como substratos, destacando os materiais lignocelulósicos, glicerina, resíduos alimentícios, lácteos e outros (CHONG et al., 2009). Normalmente, os substratos que possuem elevado teor de açúcar são os preferenciais no processo fermentativo, já que são facilmente biodegradáveis pelas bactérias. O uso de açúcares puros como matéria-prima encarece o processo de produção em larga escala, desse modo, o emprego de materiais residuais ricos nesses componentes pode ser uma alternativa promissora tanto do ponto de vista econômico como ambiental (DAS e VEZIROGLU, 2008).

Os referidos substratos passam pelo processo de digestão anaeróbia durante o processo fermentativo anaeróbio, que consiste em quatro etapas principais: hidrólise, acidogênese, acetanogênese e metanogênese. As referidas etapas são mostradas na Figura 3.2.

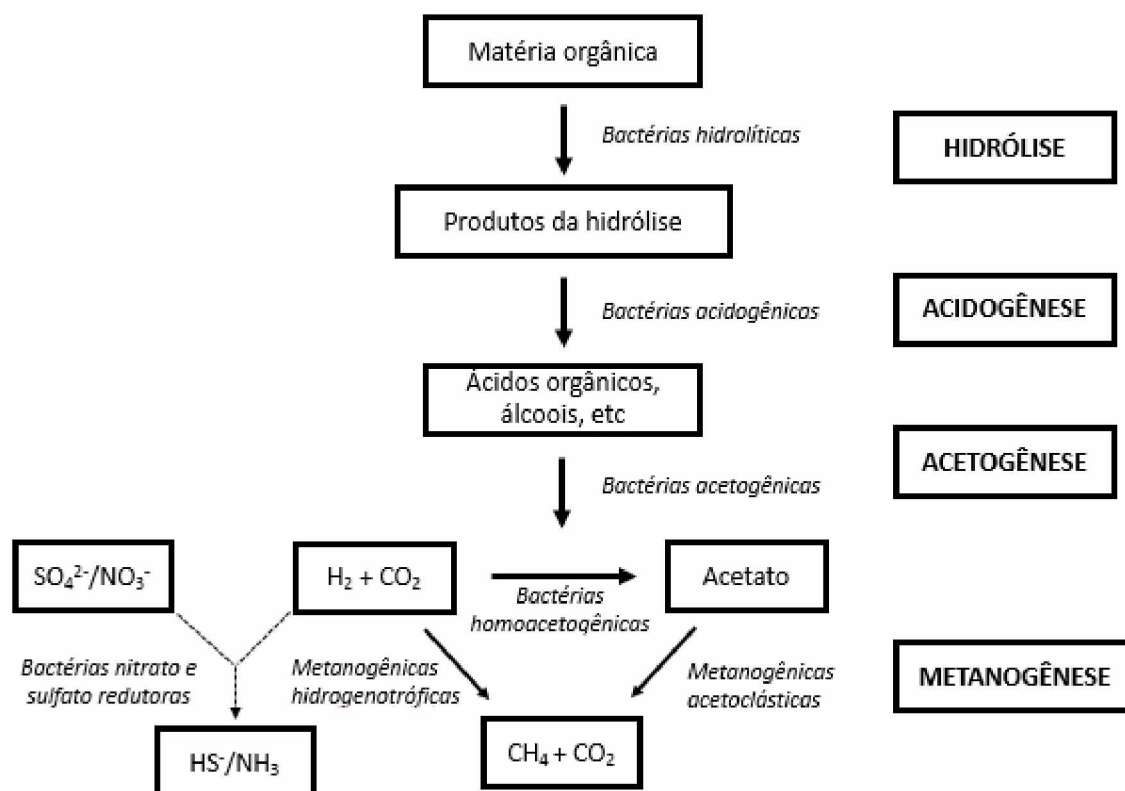


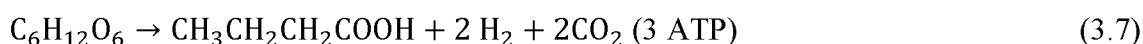
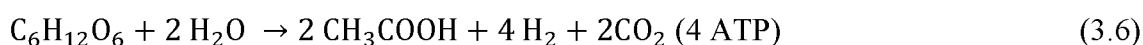
Figura 3.2 - Representação esquemática das principais etapas do processo fermentativo anaeróbico (Adaptado de GUO et.al., 2010).

Na hidrólise, as bactérias hidrolíticas são capazes de produzir enzimas extracelulares que vão degradar os compostos orgânicos complexos (carboidratos, proteínas, lipídeos) em materiais dissolvidos. Os materiais dissolvidos são permeáveis às membranas das bactérias fermentativas, desse modo, são incorporados e metabolizados no interior das células na etapa da acidogênese. Os produtos oriundos da acidogênese são compostos mais simples como ácidos orgânicos voláteis, álcoois, dióxido de carbono, hidrogênio e biomassa. Os referidos produtos são oxidados pelas bactérias acetogênicas, na etapa de acetogênese, formando substratos apropriados como hidrogênio e ácido acético, para as arqueias metanogênicas. Nessa mesma etapa, o hidrogênio pode ser transformado em ácido acético pelas bactérias homoacetanogênicas. Na última etapa, a metanogênese, as arqueias metanogênicas consomem o hidrogênio e o ácido acético transformando-os em metano e dióxido de carbono. As bactérias que utilizam hidrogênio como substrato, são denominadas de metanogênicas hidrogenotróficas e as que possuem preferência pelo ácido acético são chamadas de metanogênicas acetoclásticas. O

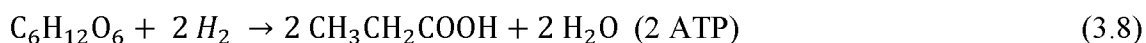
hidrogênio formado no processo pode ser consumido, quando há a presença de sulfato e nitrato no meio fermentativo, pelas bactérias sulfato-redutoras, formando assim amônia e sulfeto, respectivamente (SPEECE, 1996; CHERNICARO, 2007; SAADY, 2013).

A partir das etapas descritas, nota-se que, para a obtenção do hidrogênio, o processo fermentativo deve ser interrompido na etapa da acetogênese. E para realizar o tratamento do efluente gerado, ele deve ser degradado novamente até a etapa de metanogênese, finalizando assim o processo de digestão anaeróbia.

O rendimento de hidrogênio, ao final do processo, depende da rota metabólica seguida pelos microrganismos e também dos subprodutos gerados. Utilizando o metabolismo da glicose, que é aceitável como referência (NTAIKOU et al., 2010), o máximo rendimento teórico é obtido quando há a formação de ácido acético como produto final, resultando em quatro mols de hidrogênio por mol de glicose, Equação 3.6. Quando o produto final é o ácido butírico, o rendimento será dois mols de hidrogênio por mol de glicose, Equação 3.7 (CHONG et al., 2009).

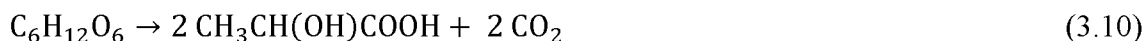


A conversão de glicose a ácido acético resulta em maior energia para o crescimento das bactérias, além de formar substrato para as arqueias metanogênicas acetoclásticas. Já a formação de ácido butírico reduz a produção de hidrogênio e o teor ácido do meio (MOSEY, 1983). A produção de ácido propiônico ao final do processo desfavorece o rendimento de hidrogênio, já que ele é consumido, como mostra a Equação 3.8.



A rota metabólica seguida pelos microrganismos pode ser levada à solventogênese, obtendo como produtos: acetona, metanol, etanol, propanol, butanol e lactato (GUO et al., 2010). A obtenção de etanol e ácido lático (pela rota clássica) tem um balanço nulo no rendimento final de hidrogênio, como pode ser visto nas Equações 3.9 e 3.10, respectivamente. No entanto, existe uma rota alternativa em que são formados etanol e dois mols de hidrogênio como produtos, Equação 3.11 (HWANG et al., 2004; ZHU et al., 2009).





Há também alguns parâmetros que influenciam a fermentação anaeróbia e que quando ajustados, podem contribuir para o aumento no rendimento do gás de interesse. Cita-se, por exemplo, a influência do pH no processo. Ele está diretamente relacionado com a atividade da hidrogenase e também com a rota metabólica adotada pelos microrganismos (TEMUDO et al., 2007; GINKEL e SUNG; 2001). Existem discordâncias em relação a um pH ótimo, pois em cada estudo é utilizado um tipo de inóculo, um substrato diferente e faixas de pH estudados distintos (WANG e WAN, 2009). Entretanto, estudos de Khanal et al., (2004) e Ginkel e Sung (2001) mostraram que o pH na faixa de 5 a 7 resultam em melhores rendimentos de hidrogênio.

A temperatura é outro parâmetro de extrema importância na fermentação, variando de acordo com o tipo de inóculo, substrato e condições operacionais do sistema (GUO et al., 2010). As faixas de temperatura utilizadas no processo de fermentação podem ser mesofílica (25-40 °C), termofílica (40-65 °C), termofílica extrema (65-85 °C) e hipertermofílica (> 80 °C) (LI e FANG, 2007). Sendo as faixas mesofílica e termofílica as mais utilizadas.

Uma elevada pressão parcial de hidrogênio pode ter um efeito negativo na produção do mesmo, já que compromete a atividade da hidrogenase e torna o processo termodinamicamente desfavorável (KIM et al., 2006). A alta pressão parcial é capaz de deslocar a rota metabólica para a solventogênese, levando a formação de ácido lático, etanol, butanol e acetona (LEVIN et al., 2004). Além dos parâmetros citados existem o tempo de detenção hidráulica, configurações do reator, fonte de carbono e outros, que deverão ser estudados e otimizados para atingir rendimentos expressivos de hidrogênio ao final do processo.

Em resumo, o processo de fermentação anaeróbia para a produção de hidrogênio é bastante atrativo, uma vez que não necessita de iluminação, pode-se utilizar várias fontes de carbono como substrato e ainda produz metabólitos de grande valor agregado que poderão ser utilizados em um processo híbrido para aumentar o rendimento de hidrogênio. Possui também uma operação simples quando comparado aos processos

foto-sintéticos (HALLENBECK e BENEMANN, 2002; LEVIN et al., 2004; DAS e VEZIROGLU, 2008). No entanto, o referido processo apresenta baixos rendimentos de hidrogênio, mas pode-se obter rápidas taxas de conversão (SINHA e PANDEY, 2011).

### 3.3.3 Fotofermentação

No processo de fotofermentação as bactérias fotossintetizantes são capazes de converter ácidos orgânicos ou biomassa em hidrogênio na presença de luz e em condições anaeróbias (MATHEWS e WANG, 2009; BASAK et al., 2014).

As bactérias fotossintetizantes podem ser classificadas de acordo com sua preferência pelo substrato. Sendo assim, as bactérias chamadas de sulfurosas degradam compostos a base de enxofre e as bactérias não sulfurosas consomem compostos a base de carbono (LONGO, 2009). As bactérias fotossintetizantes do tipo púrpuras não sulfurosas (PNS) podem crescer como fotoheterotróficas, fotoautotróficas ou quimioheterotróficas e alternar de um modo para o outro dependendo das condições disponíveis, como o grau de anaerobiose, a disponibilidade de fonte de carbono ( $\text{CO}_2$  para o crescimento autotrófico e compostos orgânicos para o crescimento heterotrófico) e fonte de luz (necessária ao crescimento fototrófico) (MADIGAN et al., 2013; EROGLU e MELIS, 2011). No grupo das bactérias fotossintetizantes, as mais estudadas no processo de fotofermentação são: *Rhodopseudomonas palustris* (KAWAGOSHI et al., 2010), *Rhodobacter sp.* (ZHU et al., 2010), *Rhodobacter sphaeroides* e *Rhodobacter capsulatus* (OBEID et al., 2010).

O sistema fotossintético dessas bactérias é apenas similar aos existentes na natureza, eles não possuem a capacidade de oxidar a água e, portanto, não geram oxigênio em suas reações (DASGUPTA et al., 2010). O fotossistema das bactérias púrpuras não sulfurosas (PNS) está fixado na membrana intracelular e é composto pelos pigmentos carotenoides e bacterioclorofilas, que são os responsáveis por absorver a energia luminosa (fótons) (AKKERMAN et al., 2002). O metabolismo fotossintético das bactérias PNS pertencente a espécie *Rhodobacter*, pode ser visto na Figura 3.3. Em virtude da semelhança dos processos metabólicos relacionados com a produção de hidrogênio, esse modelo pode ser estendido a outras bactérias PNS.

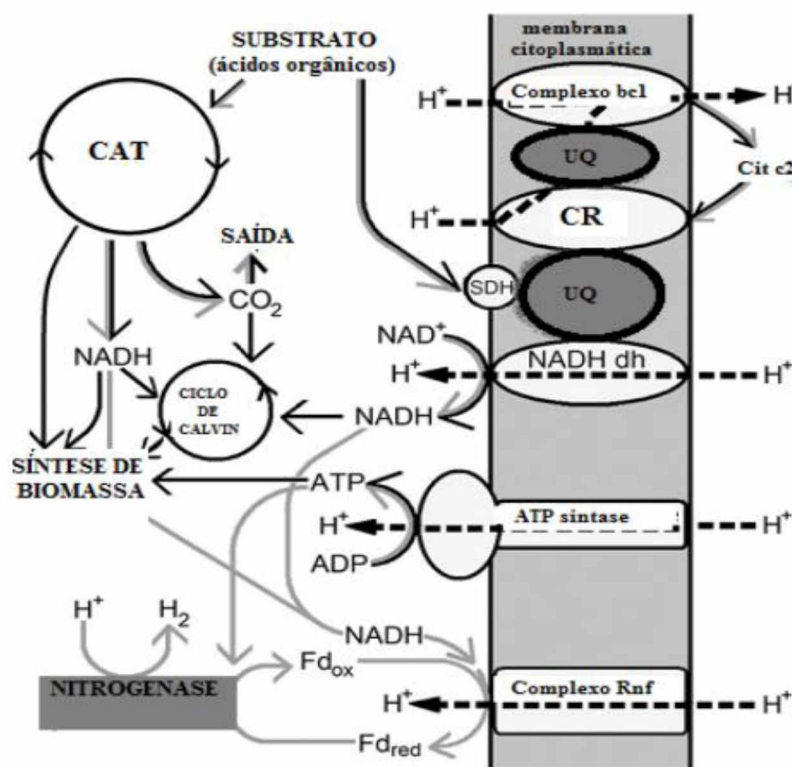
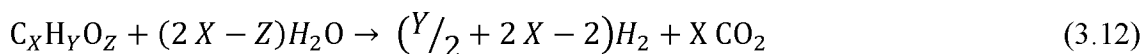


Figura 3.3 -Representação do fluxo de prótons (----->), fluxo metabólico para multiplicação celular (—>) e fluxo metabólico para produção de hidrogênio(—>) das bactérias púrpuras não sulfurosas (Adaptado de GOLOMYSOVA et al., 2010).

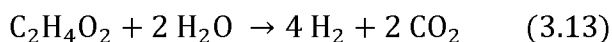
A degradação do carbono orgânico (ciclo CAT) libera elétrons que são carregados por transportadores de elétrons, gerando um fluxo cíclico que produz um gradiente de prótons na membrana. Esses prótons são utilizados para produzir ATP, a partir da ATP sintase, e também são utilizados na atividade reversa do NADH desidrogenase (NADH dh) e no complexo de fixação de nitrogênio presentes nas bactérias *Rhodobacter* (complexo Rnf) para reduzir a ferredoxina (Fd). A succinato desidrogenase (SDH) fornece elétrons para o ubiquinol, que funciona como um transportador de elétrons entre a parte interna e externa da membrana. Já o NADH gerado no CAT é usado para a síntese de biomassa, fixação de CO<sub>2</sub>, síntese de material de reserva, e formação de hidrogênio através do complexo nitrogenase (AKKERMANN et al., 2002; GOLOMYSOVA et al., 2010; BASAK, 2014). Quando há a presença de N<sub>2</sub> no meio, os elétrons podem ser utilizados pela nitrogenase para reduzir o nitrogênio à amônia. Em contrapartida, na ausência de nitrogênio, tal enzima reduz os prótons H<sup>+</sup> em hidrogênio molecular, utilizando os elétrons que foram carregados pela Fd. Dessa forma, os elétrons provenientes da degradação dos ácidos orgânicos são capazes de produzir gás hidrogênio e dióxido de carbono (AKKERMANN et al., 2002).

As bactérias púrpuras não sulfurosas produzem hidrogênio de forma eficiente, apresentando elevados rendimentos teóricos de conversão do substrato (MATHEWS e WANG, 2009). Além disso, são capazes de utilizar um amplo espectro de luz e ácidos orgânicos como fonte de carbono. O máximo rendimento teórico que poderia ser obtido no processo de fotofermentação se todo substrato fosse convertido à  $H_2$  e  $CO_2$  é mostrado pela seguinte Equação 3.12 (LOSS, 2009):



Há uma grande variedade de substratos que podem ser utilizados para o crescimento dos microrganismos, no entanto, nem todos são úteis para produzir hidrogênio. Os ácidos láctico, acético, butírico, málico e propiônico, são os principais ácidos utilizados por esses microrganismos para a produção do gás, de acordo com a literatura. Em seguida, são descritas as Equações 3.13 – 3.17 de formação de hidrogênio a partir dos ácidos citados (WU et al., 2012; LÁZARO et al., 2012):

Ácido acético:



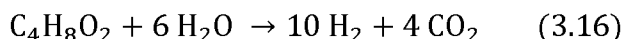
Ácido láctico:



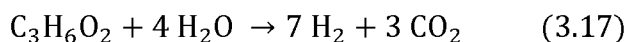
Ácido málico:



Ácido butírico:

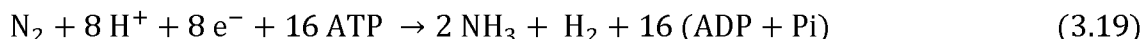
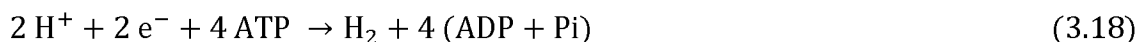


Ácido propiônico:

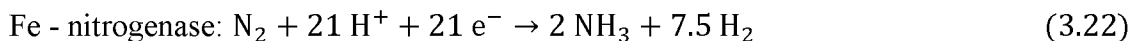


Além da degradação dos ácidos orgânicos, as referidas bactérias são capazes de degradar açúcares como glicose, lactose, sacarose e melaço de soja para produzir hidrogênio (TIAN et al., 2010; AFSAR et al., 2011; KESKIN e HALLENBECK, 2012).

A produção de hidrogênio por bactérias PNS é devido à presença da enzima nitrogenase em condições deficientes de oxigênio, utilizando a energia da luz e vários ácidos orgânicos. Na ausência de nitrogênio, e sob condições anaeróbias, a nitrogenase é capaz de formar hidrogênio em uma reação irreversível, sendo consumidos quatro ATP por mol de  $H_2$  produzido, como mostra a Equação 3.18. Na presença de nitrogênio, a enzima possui a capacidade de reduzir o gás ( $N_2$ ) à amônia ( $NH_3$ ); Equação 3.19 (OLIVEIRA, 2014; BASAK et al., 2014).



A nitrogenase também é uma metaloproteína e é classificada de acordo com o metal presente em seu sítio ativo, podendo ser nitrogenase Molibdênio (Mo), Vanádio (V) ou Ferro (Fe). A nitrogenase Mo é conhecida como nitrogenase convencional, por ser mais frequente em microrganismos. Já a nitrogenase V e Fe são denominadas por nitrogenases alternativas (DAS e VEZIROGLU, 2001). A presença desses três tipos de enzimas é dependente da espécie do microrganismo, a bactéria PNS *R. capsulatus* por exemplo, demonstrou conter as nitrogenases Mo e Fe, sendo que, a última expressa-se em condições de deficiência em molibdênio. Já a bactéria *R. palustris* expressam os três tipos de nitrogenase: Mo, Fe e V. A produção de hidrogênio a partir dos três tipos de nitrogenase, utilizando ATP, é mostrado pela Equação 3.20 – 3.22 (BASAK et al., 2014).



Destaca-se também, a presença da enzima hidrogenase ligada a membrana nas cepas de *R. capsulatus* e *R. palustris* (ODA et al., 2005; SCHNEIDER et al., 1991). No entanto, a hidrogenase nas bactérias fotoheterotróficas desempenham um metabolismo antagônico às nitrogenases. Estudos estão sendo realizados para conseguir microrganismos mutantes que não tenham a capacidade de produzir tal enzima, aumentando assim a produção de hidrogênio. No trabalho de Oshima et al. (1998) foram estudados mutantes de *R. capsulatus* ST410, e observaram que a produção de hidrogênio foi mais expressiva para esses microrganismos quando comparados aos microrganismos selvagens. Os primeiros mostraram uma conversão de 68 % enquanto que os selvagens obtiveram apenas 25 %.

Em relação à nitrogenase, sua eficiência depende de quantidade elevada de ATP e poder redutor. Além disso, para um bom desempenho o ambiente deve estar em condições anaeróbias, visto que, a presença de  $\text{O}_2$  provoca alterações irreversíveis na estrutura da enzima, causando sua inibição. E também a presença de fontes de nitrogênio,

provenientes dos meios de cultivos das bactérias causam a inibição na síntese e atividade da nitrogenase, no entanto, essa inibição é reversível (KOKU et al., 2002).

A produção de hidrogênio por fotofermentação depende de muitos parâmetros como a atividade das enzimas nitrogenase e hidrogenase, proporção de carbono e nitrogênio nos meios de produção, idade do inóculo das bactérias PNS, fonte e intensidade de luz aplicada, pH, temperatura dentre outros fatores que afetam a eficiência, termos globais de rendimento e taxa de produção simultaneamente (BASAK et al., 2014).

Em relação à fonte de carbono, os ácidos orgânicos como ácido málico, pirúvico, acético, fórmico e outros, podem ser utilizados pelas bactérias PNS no processo de fotofermentação (BASAK et al., 2014). A fonte de nitrogênio utilizada no crescimento das cepas e no meio de produção de hidrogênio é variável em tipo e concentração (como por exemplo, cloreto de amônio, sulfato de amônio, ácido glutâmico, etc). A razão entre ambas fontes (C/N) desempenha um papel importante na formação de hidrogênio, sendo destacada na literatura que este parâmetro deve ser superior a 1. Segundo Eroglu et al. (1999) a melhor relação entre carbono (ácido málico) e nitrogênio (ácido glutâmico), foi na proporção 15 mM: 2mM no meio de produção utilizando *R. sphaeroides* O.U.001, levando a taxa de geração de hidrogênio à 10 mL/L·h. Ressalta-se que a presença do íon amônio como fonte de nitrogênio pode reduzir a taxa de produção assim como a produção acumulada de hidrogênio, uma vez que a atividade da enzima nitrogenase foi inibida. Na ausência de nitrogênio molecular e sais de amônio no meio de cultura a atividade da nitrogenase é melhorada e conseqüentemente a produção de hidrogênio (BASAK et al., 2014).

O trabalho de Koku et al. (2002) também relata o efeito inibidor sobre a nitrogenase. Foi observado que células de *R. capsulatus* crescidas em lactato e glutamato tiveram problemas relacionados à inibição da enzima quando a fonte de carbono foi consumida antes da fonte de nitrogênio, culminando na produção de amônia. Tal fato, explica a recomendação de vários autores para o emprego de altas relações C/N (maiores que 1) durante o cultivo de tais bactérias visando a produção de H<sub>2</sub>.

No estudo de Rojas (2010) avaliou-se o efeito da relação C/N na produção de hidrogênio utilizando água residuária sintética a base de sacarose, em reatores de leito fixo e fluxo ascendente. Os referidos autores analisaram diferentes relações entre carbono (sacarose) e nitrogênio (ureia): 40, 90, 140 e 190. Os maiores valores foram obtidos para a relação C/N de 140, sendo a conversão de substrato em hidrogênio e a produção volumétrica de 3,5 mol H<sub>2</sub>/mol sacarose e 162,5 mL H<sub>2</sub>/L·h, respectivamente.

Os micronutrientes, como por exemplo, os íons de ferro e molibdênio são essenciais no processo de fermentação, uma vez que eles funcionam como cofatores da FeMo-nitrogenase, assim tornam-se fundamentais para uma maior atividade da enzima (KOKU et al., 2002). Ademais muitos portadores de elétrons como ferredoxina e complexo citocromo bc requerem o ferro como cofator (ZHU et al., 2007).

A idade do inóculo também influencia no processo fotofermentativo. Para o inóculo das bactérias PNS a fase exponencial da curva de crescimento é a mais apropriada para um rendimento elevado na produção do gás de interesse, sendo que, quanto mais rapidamente atinge-se a fase estacionária melhor para o processo, já que um tempo de retenção maior leva a rota metabólica para a não produção de hidrogênio (MELNICKI et al., 2008).

A fonte de luz utilizada no processo pode ser luz artificial, como lâmpadas fluorescentes, lâmpadas halógenas, fibras ópticas, tubos de neon, diodos emissores de luz, etc (BASAK et al., 2014). Além disso, os biorreatores podem utilizar a luz solar em combinação com uma ou mais luzes artificiais. Ao longo do processo a intensidade da luz no meio tende a diminuir, visto que, ocorre um sombreamento das células decorrente do aumento da biomassa, subprodutos gerados e até mesmo a formação de um biofilme na superfície do reator (KIM et al., 1997). A energia da luz diminui logaritmicamente com a distância da fonte de luz e a concentração de microrganismo em um meio de cultura de acordo com a Lei de Lambert Beer. Ressalta-se também que a fonte de luz não deve estar muito próxima da cultura bacteriana, pois pode gerar uma quantidade considerável de calor (BASAK et al., 2014). Ademais a fonte empregada deve apresentar uma intensidade de luz uniforme, além disso, estudos relatam que a alta intensidade de luz é capaz de causar uma parcial inibição na formação de hidrogênio pelas bactérias PNS (MIYAKE et al., 1999; ADESSI et al., 2012).

A temperatura é um importante parâmetro que pode conduzir as rotas metabólicas no sentido da produção de hidrogênio e a temperatura considerada ótima para a geração do gás por *Rhodobacter sp* encontra-se na faixa de 31 a 36 °C. A manutenção da temperatura constante no interior do reator também é fundamental e pode ser feito através de um banho termostático em que a água circula em volta do biorreator mantendo a temperatura desejada durante a execução do experimento, salientando que a viabilidade do sistema de controle da temperatura também é importante para reduzir os custos de todo processo (BASAK et al., 2014).

### 3.3.4 Sistemas híbridos

Os sistemas híbridos são uma combinação de rotas metabólicas, sendo a mais estudada, o processo de fermentação escura seguido da fotofermentação (KHUSNUTDINOVA et al., 2012).

Conforme descrito anteriormente, a fermentação de resíduos orgânicos na etapa escura produz, além de hidrogênio e gás carbônico, produtos intermediários como os ácidos orgânicos. Na etapa seguinte, que é a fotofermentação, os referidos ácidos podem ser convertidos em hidrogênio pelas bactérias fotossintetizantes, na presença de luz e em condições anaeróbicas e com alta relação C/N. E como resultado dessa combinação de processos, tem-se o aumento no rendimento final do gás de interesse (LAZARO, 2009).

Silva (2015) utilizaram em seu trabalho o efluente proveniente da fermentação escura como substrato para a fotofermentação. Foi avaliada a adição de fontes de carbono como lactose e glicose e o efeito da adição alternada desses açúcares no decorrer do processo. No ensaio contendo inicialmente 9,31 g/L de lactose e, posteriormente, quando detectado o consumo total do açúcar foi adicionado de forma alternada lactose e glicose (ambos à 6 g/L), apresentou uma produtividade máxima de 201,8 mmol H<sub>2</sub>/L·dia e pôde-se manter a cultura ativada na produção de hidrogênio por fotofermentação por até 787 h.

No trabalho de Su et al. (2009) foi estudado a produção de hidrogênio a partir de um sistema integrado, em que, a glicose foi utilizada como substrato. No primeiro estágio, foram utilizadas as bactérias *C. butyricum* e obtiveram um rendimento de 1,59 mol de H<sub>2</sub>/mol de glicose. Em sequência, o efluente da digestão anaeróbica, composto principalmente por ácido acético e butírico, foi inoculado com *R. palustris* e o rendimento obtido foi de 4,16 mol H<sub>2</sub>/mol glicose.

O trabalho de Chen et al. (2008), utilizou um processo híbrido, em que mostrou um aumento no rendimento de hidrogênio de 3,80 mol de H<sub>2</sub>/mol de sacarose (fermentação escura) para 10,02 mol de H<sub>2</sub>/mol de sacarose (fermentação escura/fotofermentação). Além disso, a demanda química de oxigênio (DQO) no efluente foi reduzida para 72 %. Esses autores observaram que quando o foto biorreator foi iluminado com fibras ópticas e suplementado com 2,0 % (m/v) de transportadores de argila, o rendimento global de hidrogênio no processo de dois estágios ainda foi melhorada para 14,2 mol de H<sub>2</sub>/mol de sacarose com uma remoção de 90 % na DQO.

Tao et al. (2008) apresentaram um processo de dois estágios para aumentar o rendimento de hidrogênio a partir da sacarose. O primeiro estágio foi a fermentação



escura empregando microflora, o rendimento máximo de hidrogênio foi cerca de 3,67 mol de  $H_2$ / mol de sacarose. Os ácidos orgânicos formados no primeiro passo, que foram ácido butírico, acético, uma pequena quantidade de ácido propiônico, valérico, caproico e álcool n-butílico foram utilizados no segundo estágio que foi a fotofermentação, no intuito de converter os ácidos citados em hidrogênio. Ao final da fotofermentação, aumentou-se o rendimento de 3,67 mol de  $H_2$ / mol de sacarose para 6,63 mol de  $H_2$ / mol de sacarose.

Redwood et al. (2005) estudaram a produção de hidrogênio utilizando a digestão anaeróbia seguida da fotofermentação, empregando *Escherichia coli* HD701 e *R. sphaeroides* O.U. 001, respectivamente. O substrato utilizado foi glicose na primeira etapa e na segunda o efluente proveniente da digestão. A velocidade de produção de hidrogênio foi de 124 mL  $H_2$ /L·d. A partir dos resultados obtidos, os autores concluíram ser possível a utilização de um sistema híbrido para tratar águas residuárias ricas em açúcares simples como a glicose.

Os trabalhos dos autores citados acima, assim como o de Silva (2015) que foi realizado no grupo de pesquisa (NUCBIO-FEQ) pôde mostrar que o sistema híbrido é bastante promissor para atingir um aumento no rendimento de hidrogênio, o que justifica a proposta de dar continuidade a esse estudo. Ademais, o emprego de um sistema de co-cultura utilizando cepas de duas bactérias fotossintetizantes estudadas no presente trabalho não foi encontrado na literatura.

---

## CAPÍTULO 4

### MATERIAL E MÉTODOS

---

#### 4.1 Material

##### 4.1.1 Microrganismos

No processo de fotofermentação foram utilizadas cepas de bactérias púrpuras não-sulfurosas, especificamente as *Rhodopseudomonas palustris* e *Rhodobacter capsulatus*. Tais bactérias foram adquiridas através de uma coleção alemã de microrganismos e cultura de células, a DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Culture).

As cepas foram cultivadas em frascos Duran de 500 mL, sendo que, 300 mL de sua capacidade foi preenchido com meio de cultura (290 mL) e inóculo (10 mL). Os 200 mL de *headspace* foi saturado com gás argônio. No período de 10 a 12 dias, as cepas eram centrifugadas e o sedimentado era suspenso em um novo meio de cultura. Após a renovação do meio, os frascos foram mantidos em uma câmara de germinação a  $30 \pm 1$  °C, com iluminação de 2200 lux.

##### 4.2 Meio de cultura e meio fermentescível

O meio de cultura utilizado para a manutenção das cepas foi o meio basal RCV (WEAVER et al., 1975). O referido meio é uma solução aquosa composta pelos itens descritos nas Tabelas 4.1 e 4.2. O pH da solução foi ajustado para 6,8 (com a adição de hidróxido de sódio, 1M) e essa foi esterilizada em autoclave à 121 °C e 1 atm durante 20 minutos.

Tabela 4.1 - Componentes do meio RCV

Reagente	Concentração (g/L)
Ácido Málico	4,02
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,60
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,90
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,12
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,075
Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	0,02
Micronutrientes	1 mL
Tiamina	0,001
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1

Tabela 4.2 - Composição da solução de micronutrientes utilizada no meio RCV

Reagente	Concentração (g/L)
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,8
MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	1,59
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,24
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,075
CuCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,05

O meio fermentescível utilizado nos experimentos de fotofermentação foi o efluente proveniente da fermentação escura por consórcio microbiano em reator UASB, produzido em trabalho paralelo a esse. O referido efluente segue alguns procedimentos para torná-lo adequado ao ensaio de fotofermentação, sendo que o primeiro deles foi a centrifugação para a retirada da cultura mista de bactérias presente no meio. Posteriormente, realizou-se a suplementação do efluente com os componentes do meio basal RCV, com a exceção do ácido málico, do sulfato de amônio e da tiamina (foi adicionada após o tratamento térmico). O sulfato de amônio não foi adicionado em virtude da presença de amônia no meio proveniente da fermentação escura. Desse modo, seria inviável aumentar a concentração de nitrogênio, pois o mesmo é capaz de inibir a ação da enzima nitrogenase (OLIVEIRA, 2014). Já o ácido málico não foi adicionado pois o intuito foi estudar somente as fontes de carbono proveniente dos ácidos orgânicos que estavam presentes no efluente e açúcares adicionados. Em seguida, ajustou-se o pH para 6,8 já que esse valor favorece a atividade da enzima nitrogenase e adicionou-se a fonte de açúcar a ser estudada. Finalmente, tratou-se o meio fermentescível termicamente por meio de uma autoclave (121 °C; 1 atm e 20 min) e após o seu resfriamento, até à temperatura ambiente, adicionou-se a tiamina e as bactérias PNS na forma de cultura pura ou em um sistema de co-cultura. O experimento foi preparado dentro da câmara de fluxo laminar que foi previamente lavada com etanol 70 % e mantida sob luz ultravioleta por 15 minutos. O sistema de co-cultura utilizado nos experimentos é composto pelas bactérias *R. palustris* e *R. capsulatus* cultivadas em meio RCV, na proporção 1:1 (v/v).

#### 4.3 Condição dos ensaios em escala reduzida - reatores de 50 mL

Os primeiros ensaios de fotofermentação foram realizados em reatores de 50 mL (frascos de penicilina), em duplicata. Foram conduzidos à temperatura de  $32 \pm 1$  °C e intensidade luminosa de 2200 lux. O volume reacional foi de 37,5 mL, sendo 32,5 mL de meio a ser fermentado e 5 mL de inóculo. O *headspace* (12,5 mL) foi preenchido com gás argônio, caracterizando assim um ambiente anaeróbio. Ajustou-se o pH para 6,8 e a

cepa empregada no processo foi *R. palustris*. Quanto ao meio a ser fermentado, testou-se o meio basal RVC e o efluente proveniente da fermentação escura com diferentes fontes de açúcar: lactose, glicose e melaço de soja. A lactose e a glicose utilizadas nos ensaios possuíam pureza analítica. Após a preparação dos reatores, eles foram tampados com septo de borracha butílica e lacrados com cápsulas de alumínio. O biogás produzido foi coletado a partir de seringas graduadas (10 mL) e posteriormente armazenados em ampolas gasométricas (Construmaq LTDA. Brasil) para análises. Foram retiradas amostras iniciais do meio reacional, e após a finalização do experimento (7 dias), novas amostras foram coletadas para análises.

A proposta do primeiro ensaio de fotofermentação, denominado por **Ensaio 1**, foi avaliar a produção de hidrogênio utilizando o meio basal RCV como substrato, e a ele foi adicionado um dos seguintes tipos de açúcares: lactose, glicose ou melaço de soja na concentração de  $9,5 \pm 0,5$  g/L de açúcares totais. Para posterior comparação em relação aos substratos utilizados, a finalidade do **Ensaio 2** foi empregar o efluente proveniente da fermentação escura com os mesmos açúcares utilizados anteriormente. A representação a seguir, Figura 4.1, mostra o procedimento adotado para a produção de hidrogênio por fotofermentação em reatores de 50 mL.

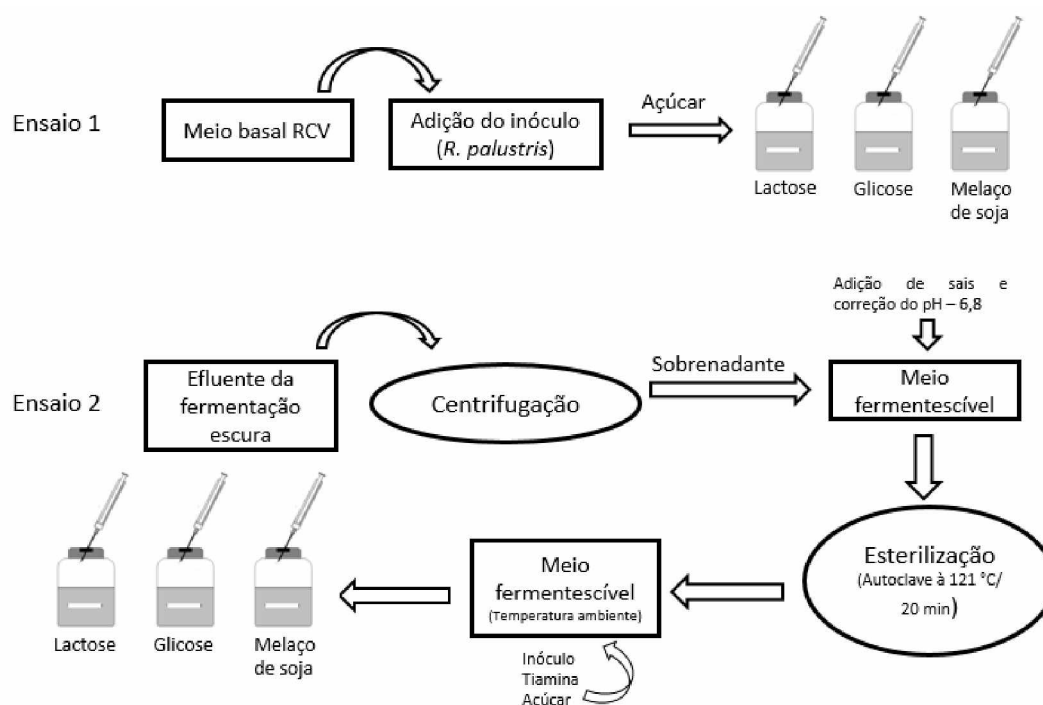


Figura 4.1 – Fluxograma da produção de hidrogênio por fotofermentação em reatores de 50 mL.

#### 4.4 Condição dos ensaios em escala ampliada - reatores de 1,5 L

Os experimentos de fotofermentação também foram realizados em escala ampliada, utilizando um reator de 1,5 L - módulo Fermentador TE-2003/1,5-E1. O volume reacional foi de 700 mL, composto por 65,3 mL de inóculo (cultura pura de *R. palustris* ou sistema de co-cultura) e 634,7 mL de meio fermentescível, àquele proveniente da fermentação escura. O pH do meio foi ajustado e mantido em 6,8 ao longo do processo pela adição de NaOH (1 M). A temperatura, intensidade luminosa e agitação foram  $32 \pm 1$  °C, 5000 lux e 130 rpm, respectivamente. Após a preparação do reator, foi borbulhado gás argônio ao meio, durante 15 minutos, para garantir um ambiente anaeróbio.

O acompanhamento das fotofermentações foi realizado através da coleta de amostras periodicamente. Primeiramente, retirava-se a amostra do biogás e armazenava-o em ampolas gasométricas (Construmaq LTDA, Brasil) para posterior análise. Em seguida, quantificava-se o biogás produzido através de um medidor de vazão volumétrica MilliGas-Counter da Ritter Tipo MGC-1. Para o acompanhamento do crescimento celular, dos metabólitos formados e consumo de açúcar no processo, amostras de 6 mL do meio fermentado foram retiradas periodicamente, sendo que, o intervalo de tempo variou de acordo com a composição desse meio. Dessa forma, media-se a concentração celular e posteriormente a amostra foi centrifugada para realizar a separação das células do sobrenadante. A partir do sobrenadante coletado realizou-se a leitura de ácidos orgânicos, etanol e açúcar através da cromatografia líquida de alta eficiência. De modo a manter o volume reacional, fez-se a reposição com meio fresco constituído de meio basal RCV. O fluxograma a seguir, Figura 4.2, mostra o procedimento realizado para o ensaio de fotofermentação.

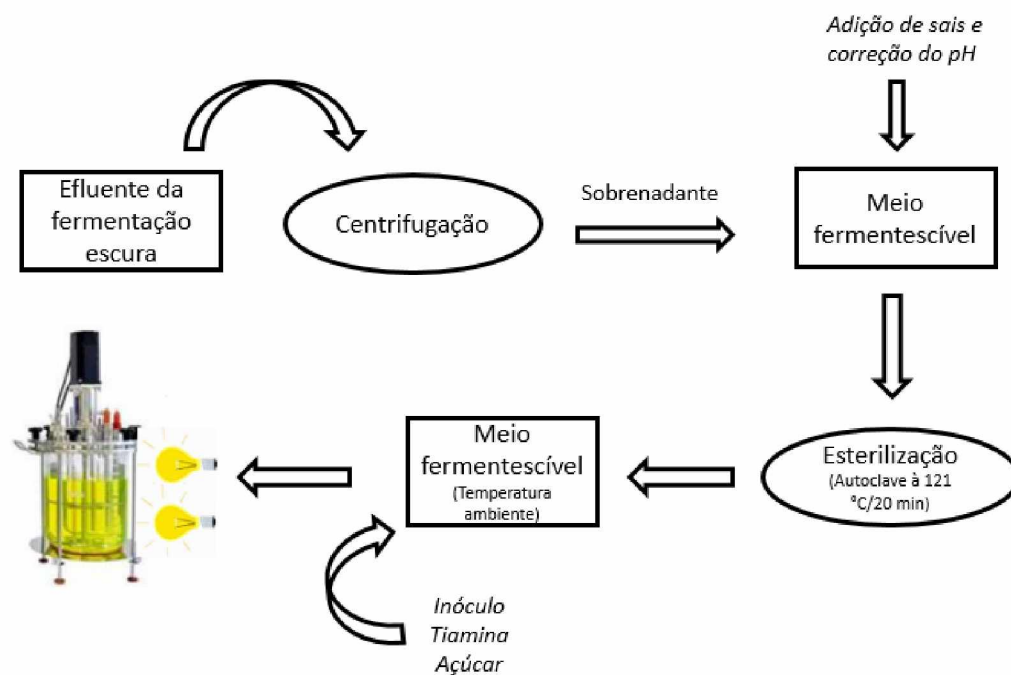


Figura 4.2 - Fluxograma da produção de hidrogênio por fotofermentação em reatores de 1,5 L.

A Figura 4.3 mostra o Módulo Fermentador TE-2003/1,5-E1 utilizado nos ensaios de fotofermentação.



Figura 4.3 – Biorreator de 1,5 L utilizado nos ensaios de fotofermentação, sendo **1-** Biorreator com fotoperíodo, **2-** Medidor on-line de biogás e **3-** Módulo controlador.

O intuito dos testes realizados em escala ampliada foi avaliar a produção de hidrogênio a partir do uso de sistemas de cultura pura (*R. palustris*) e co-cultura, empregando a glicose e lactose proveniente do soro de leite como fontes de açúcar. Desse modo, foram avaliadas as seguintes condições:

**Ensaio 3:** Avaliação da produção de hidrogênio utilizando uma cultura pura de *R. palustris* e glicose à 10 g/L como fonte de açúcar.

**Ensaio 4:** Análise da produção de hidrogênio a partir do emprego de um sistema de co-cultura, composto pelas bactérias *R. palustris* e *R. capsulatus* em meio RCV, na proporção de 1:1 (v/v). As cepas foram misturadas no momento em que a fotofermentação estava sendo preparada. A fonte de açúcar utilizada foi glicose (10 g/L).

**Ensaio 5:** Estudo da fotofermentação com a utilização do mesmo sistema de co-cultura do ensaio anterior, no entanto, as cepas foram misturadas 7 dias antes do preparo do experimento, criando dessa forma um ambiente aclimatado. A glicose foi novamente utilizada como fonte de açúcar (10 g/L).

**Ensaio 6:** Avaliação da fotofermentação utilizando uma cultura pura de *R. palustris* e a fonte de açúcar estudada foi a lactose proveniente do soro de leite à 10 g/L.

**Ensaio 7:** Análise do processo utilizando o sistema de co-cultura (nas mesmas condições que o **Ensaio 4**) e a lactose proveniente do soro de leite à 10 g/L.

## 4.5 Metodologia analítica

### 4.5.1 Determinação da concentração celular

Para efetuar a determinação da concentração celular foi preparada uma solução diluída com uma amostra retirada do meio reacional. Foi lida a absorbância da solução em um espectrofotômetro modelo Shimadzu, no comprimento de onda de 660 nm. Através da curva de calibração dada pela Equação 4.1, foi efetuada a conversão da absorbância obtida para concentração de células em g/L, para a co-cultura e a Equação 4.2 para a cultura pura de *R. palustris*.

$$C_{\text{células}} = 0,738 \times \text{absorbância} + 0,057 \quad (R^2 = 0,968) \quad (4.1)$$

$$C_{\text{células}} = 1,56 \times \text{absorbância} + 0,011 \quad (R^2 = 0,976) \quad (4.2)$$

#### **4.5.2 Análises cromatográficas**

##### **4.5.2.1 Quantificação de ácidos orgânicos, açúcares e etanol**

A quantificação dos ácidos orgânicos, do etanol e dos açúcares foi obtida por meio da cromatografia líquida de alto desempenho HPLC (High Performance Liquid Chromatography). Foi utilizado um cromatógrafo Shimadzu modelo LC-20A Promience, equipado com coluna SUPELCOGEL C-610H. As amostras para leitura foram diluídas, filtradas (porosidade 0,22  $\mu\text{m}$ ) e injetadas no equipamento. As leituras de açúcares e etanol foram determinadas por um detector de índice de refração e os ácidos orgânicos por um detector ultravioleta no comprimento de onda de 210 nm. A fase móvel utilizada foi uma solução de ácido fosfórico à 0,1 % (v/v), a vazão da bomba foi 0,5 mL/min, a temperatura do forno foi 32 °C e volume de injeção 20  $\mu\text{L}$ . As áreas obtidas nos cromatogramas para cada composto foram convertidas para concentrações em g/L por meio de curvas de calibração previamente estabelecidas.

##### **4.5.2.2 Determinação do gás hidrogênio**

O biogás produzido durante a fotofermentação foi coletado temporariamente e armazenado em ampolas gasométricas. Para analisar a composição do biogás foi utilizado um cromatógrafo Shimadzu modelo GC 17A equipado com detector de condutividade térmica e uma coluna capilar Carboxen 1010 (comprimento de 30 m, diâmetro interno 0,53 mm). As temperaturas do injetor, da coluna e do detector durante as análises foram 230 °C, 30 °C e 230 °C, respectivamente. Foi empregado o argônio como gás de arraste durante as leituras. A conversão das áreas de hidrogênio para mol de hidrogênio formado foi obtido por meio de uma curva de calibração já definida.

#### **4.5.3 Carbono orgânico total e nitrogênio total**

As amostras líquidas retiradas do reator foram centrifugadas e o sobrenadante foi diluído e filtrado (porosidade 0,22  $\mu\text{m}$ ). Posteriormente, as amostras foram injetadas no equipamento TOC-L CPH/CPN da Shimadzu para a quantificação de carbono orgânico total e nitrogênio total.



#### **4.5.4 Determinação da Demanda Bioquímica de Oxigênio (DQO)**

A demanda bioquímica de oxigênio foi calculada considerando a estequiometria de oxidação dos compostos orgânicos (açúcares, ácidos e etanol), sendo que, suas concentrações foram determinadas por cromatografia líquida.

---

## CAPÍTULO 5

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

#### 5.1 Ensaios em escala reduzida: reator de 50 mL

Os ensaios em reatores de 50 mL tiveram o intuito de estudar a influência do meio RCV (**Ensaio 1**) e do efluente da fermentação escura suplementado com os sais do meio RCV (**Ensaio 2**) como substratos na produção de hidrogênio. Foram utilizados como fontes de açúcares a lactose e a glicose em grau analítico e também o melaço de soja, que é composto por estaquiose, rafinose, glicose, frutose e sacarose. A cepa de *R. palustris* foi inoculada em ambos ensaios. Deve-se ressaltar que, não foram utilizados o ácido málico e o sulfato de amônia (comuns ao meio RCV), uma vez que, a proposta é avaliar a conversão somente das fontes de carbono: os ácidos presentes no efluente e a fonte de açúcar. Os experimentos tiveram a duração de 7 dias e os resultados obtidos são mostrados nas Tabelas 5.1 e 5.2.

Tabela 5.1 –Influência da composição do meio suplementado com diferentes açúcares: meio RCV e meio de efluente da fermentação escura para produção de hidrogênio por fotofermentação

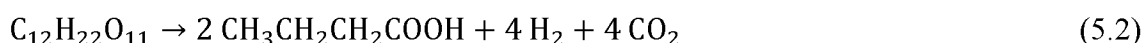
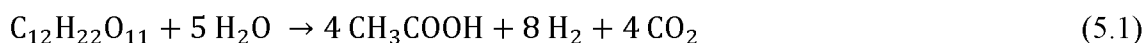
Ensaios	Açúcar	C inicial de açúcar (g/L)	Vol. de biogás (mL)	Produtivida de (mmol H <sub>2</sub> /L dia)	C inicial de células (g/L)	C final de células (g/L)	Razão C/N inicial	Razão C/N final
Ensaio 1 (meio RCV)	Lactose	9,90	24,7	0,41	0,01	0,18	16,90	10,45
	Glicose	9,76	27,0	8,64	0,01	0,31	11,45	12,35
	Melaço de soja	9,35	21,7	2,75	0,06	0,25	11,95	7,80
Ensaio 2 (efluente)	Lactose	9,92	46,6	5,21	0,14	0,48	63,05	25,70
	Glicose	9,88	33,5	5,07	0,16	0,44	23,75	18,75
	Melaço de soja	9,78	52,0	8,34	0,19	0,52	29,10	16,80

Tabela 5.2 – Composição de ácidos orgânicos na fotofermentação com meio suplementado com diferentes açúcares: meio RCV e meio de efluente da fermentação escura

Ensaio	Açúcar	$C_{\text{inicial de}} \text{ác. láctico (g/L)}$	$C_{\text{final de}} \text{ác. láctico (g/L)}$	$C_{\text{inicial de}} \text{ác. acético (g/L)}$	$C_{\text{final de}} \text{ác. acético (g/L)}$	$C_{\text{inicial de}} \text{ác. butírico (g/L)}$	$C_{\text{final de}} \text{ác. butírico (g/L)}$	$C_{\text{inicial de}} \text{ác. fórmico (g/L)}$	$C_{\text{final de}} \text{ác. fórmico (g/L)}$	$C_{\text{inicial de}} \text{ác. propiônico (g/L)}$	$C_{\text{final de}} \text{ác. propiônico (g/L)}$
Ensaio 1 (meio RCV)	Lactose	0	0,65	0	0,33	0	0	0	0	0	0
	Glicose	0	1,18	0	0,51	0	0,50	0	0	0	0
	Melaço de soja	0	0,17	0	1,61	0	0,66	0	0	0	0
Ensaio 2 (efluente)	Lactose	19,64	2,38	2,41	1,14	0,70	9,14	0	2,51	0,05	1,73
	Glicose	19,20	1,48	2,38	1,08	0,72	8,31	0	2,54	0,06	2,07
	Melaço de soja	19,21	1,10	2,28	1,34	1,17	10,90	0	0,48	0,08	1,20

A partir dos resultados obtidos para **Ensaio 1**, observa-se que o maior volume de biogás (27,0 mL) e a maior produtividade (8,64 mmol H<sub>2</sub>/L·dia) foram obtidos quando a glicose foi empregada como fonte de açúcar. O meio que continha glicose também apresentou o maior aumento de biomassa (31,0 vezes) em relação aos outros açúcares que obtiveram um crescimento de 18,0 e 4,17 vezes para lactose e melaço de soja, respectivamente. Verifica-se que a produtividade foi 2,75 mmol H<sub>2</sub>/L·dia para o melaço de soja e 0,41 mmol H<sub>2</sub>/L·dia para o meio que continha lactose. O menor volume de biogás coletado foi utilizando o melaço como fonte de açúcar (21,7 mL). A razão C/N decresceu em 38,2 % e 34,7 % para os meios que continham lactose e melaço de soja, respectivamente. No teste com a glicose, a razão C/N apresentou um aumento de 7,9 %, o que pode ser indício de um consumo de nitrogênio no meio, utilizado para o crescimento da biomassa.

Em relação à composição dos metabólitos, **no Ensaio 1**, observa-se a formação de ácido láctico, acético e butírico (exceto no meio com lactose) ao final do experimento. Para o ensaio com lactose, nota-se uma menor concentração de ácido acético (0,33 g/L) e a não formação de ácido butírico em relação aos outros tipos de açúcares (glicose e melaço de soja). Esses fatores podem estar relacionados com a baixa produtividade observada (0,41 mmol de H<sub>2</sub>/L·dia), visto que, a formação de ambos ácidos a partir da degradação da lactose favorece a formação de hidrogênio como mostrado pelas Equações 5.1 e 5.2 (VAZQUEZ et al., 2011).



O maior aumento na concentração de biomassa juntamente com a formação dos ácidos acético (0,51 g/L) e butírico (0,50 g/L), para o meio contendo glicose, pode justificar os melhores resultados observados para a produtividade e volume de biogás.

Ao analisar os dados obtidos para o **Ensaio 2**, verifica-se que com a utilização do melaço de soja obteve os maiores resultados para a produtividade (8,34 mmol de H<sub>2</sub>/L·dia) e volume de biogás (52,0 mL). Em seguida, com o emprego da lactose como fonte de açúcar foi alcançada uma produtividade de 5,21 mmol de H<sub>2</sub>/L·dia, sendo próximo ao valor encontrado para o teste contendo glicose; 5,07 mmol de H<sub>2</sub>/L·dia. No entanto, o menor volume de biogás coletado (33,5 mL) foi para o teste que continha

glicose. A biomassa mostrou um crescimento semelhante para as três fontes de açúcar. A razão C/N, apresentou um decréscimo de 59 % para lactose, 42 % para o melaço de soja e 21 % quando o efluente foi complementado com lactose, melaço de soja e glicose, respectivamente.

A variação da concentração dos metabólitos formados durante a fotofermentação mostrou um consumo elevado do ácido láctico (88 a 94 %) para as três fontes de açúcares e um consumo moderado do ácido acético (41 a 55 %). O consumo elevado de ácido láctico indica que a bactéria o utilizou como fonte de carbono para sua manutenção, crescimento e produção de hidrogênio, visto que, o consumo de açúcar foi 100 % nos dois ensaios. Contudo no **Ensaio 2**, a produção de biogás foi 1,8 vezes maior do que o volume de biogás produzido no **Ensaio 1**. A maior concentração de ácido butírico (10,90 g/L) e a menor concentração de ácido propiônico (1,24 g/L) foram encontradas no teste em que o melaço de soja foi adicionado ao meio. Esses fatos podem explicar a maior produtividade observada (8,34 mmol H<sub>2</sub>/L·dia), já que a formação de ácido butírico favorece a produção de hidrogênio e a presença de altas concentrações de ácido propiônico ao final do processo indica o consumo desse gás. A menor produtividade (5,07 mmol H<sub>2</sub>/L·dia) foi obtida no teste em que o efluente foi suplementado com a glicose e nota-se que houve a maior produção de ácido propiônico (2,07 g/L) e a menor formação de ácido butírico (8,31 g/L), o que confirma a hipótese anterior.

Ao comparar o **Ensaio 1** ao **Ensaio 2**, observa-se que os maiores resultados para a produção de hidrogênio foram alcançados no ensaio em que foi utilizado o efluente da fermentação escura como substrato, independente do açúcar utilizado para suplementar o meio. Isso mostra que os ácidos orgânicos presentes no início da fotofermentação juntamente com os açúcares adicionados apresentam uma sinergia que favorece a formação do gás de interesse (SILVA, 2015).

## 5.2 Ensaios em escala ampliada: batelada alimentada em reator de 1,5 L

A partir dos testes realizados em escala reduzida foi comprovado que o meio formado por efluente proveniente da fermentação escura, ajustado com sais do meio RCV e suplementado com açúcares, produz melhores resultados na formação de hidrogênio em relação ao meio RCV. Desse modo, os ensaios em escala ampliada foram realizados com o referido efluente, utilizando sistemas de cultura pura (*R. palustris*) ou co-cultura (*R. palustris* e *R. capsulatus*), testando a glicose e a lactose, sendo a última oriunda do soro de leite como fontes de açúcares. A concentração inicial de açúcar foi em torno de 10 g/L

e essa fonte de carbono foi reposta, na mesma concentração, sempre que detectado seu consumo total.

Apesar do **Ensaio 2** indicar que o processo empregando melaço de soja resultou em maior produção de  $H_2$ , nesta etapa do trabalho foram avaliados os efeitos somente da glicose e da lactose, que são açúcares presentes na maioria dos efluentes agroindustriais. Desse modo, não se empregou o melaço de soja por ser constituído de vários açúcares, o que dificultaria o entendimento dos mecanismos de produção de hidrogênio, pois os microrganismos podem apresentar rotas metabólicas diversas e diferentes taxas de consumo dependendo do açúcar, e esse aspecto poderia prejudicar a análise dos processos estudados.

**Ensaio 3** - O objetivo proposto, para o terceiro ensaio de fotofermentação em escala ampliada, foi avaliar a produção de hidrogênio utilizando a cepa de *R. palustris* e glicose como fonte de açúcar. A composição do efluente que foi utilizado como substrato para o experimento de fotofermentação é mostrado na Tabela 5.3.

Tabela 5.3 – Composição do efluente utilizado como substrato no Ensaio 3 de fotofermentação por *R. palustris* em escala ampliada.

Metabólitos	Concentração (g/L)
Ácido láctico	5,75
Ácido acético	0,29
Ácido propiônico	0,85
Ácido butírico	1,58
Etanol	1,75

Os resultados obtidos para o mol de hidrogênio acumulado, produtividade de hidrogênio, concentração de glicose, volume de biogás, concentração celular, variação da razão C/N e perfil de DQO podem ser vistos na Figura 5.1 (a – g).

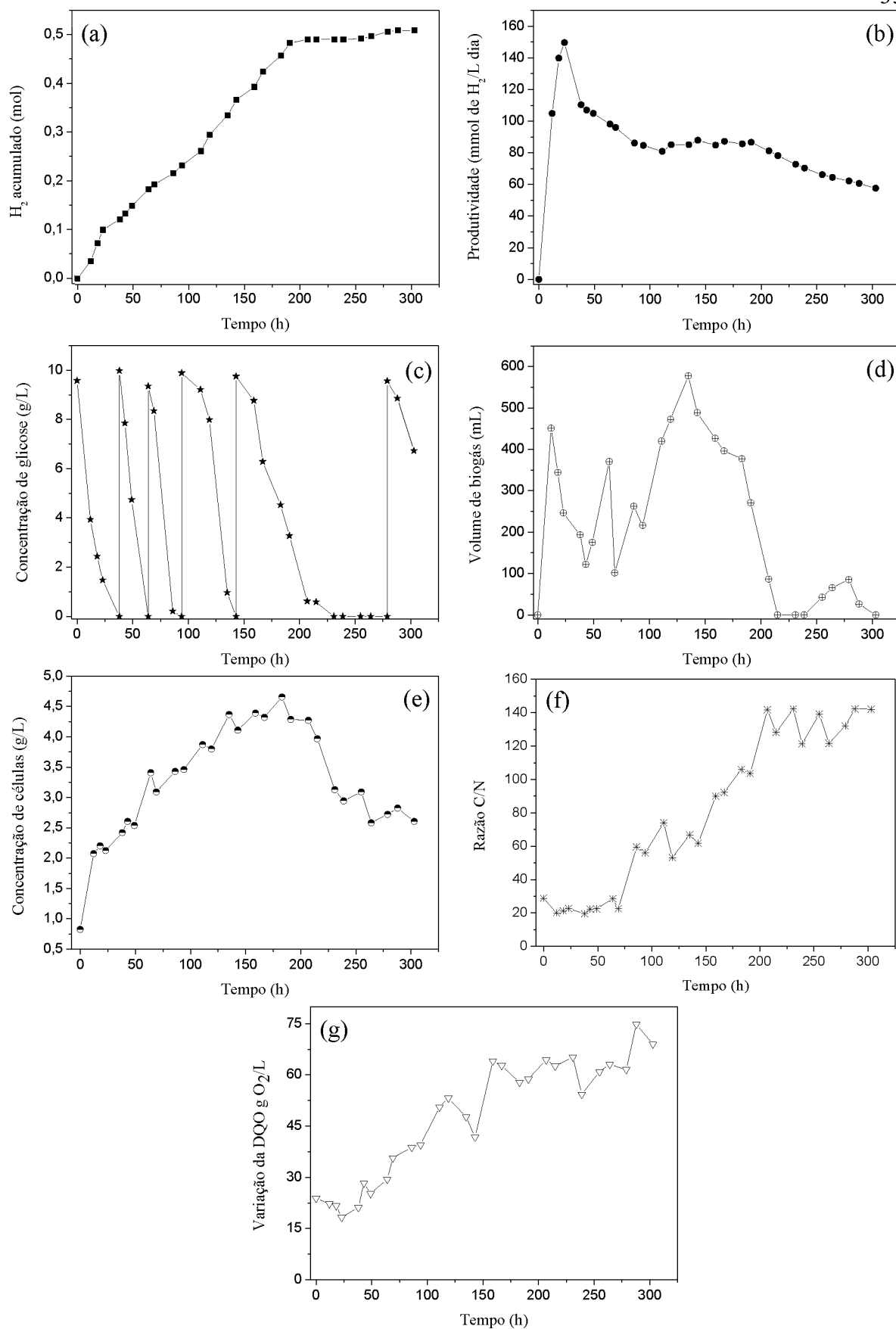


Figura 5.1 - Dados de mol de hidrogênio acumulado (a), produtividade de hidrogênio (b), concentração de glicose (c), volume de biogás produzido (d), concentração de células (e), variação da razão C/N (f) e perfil de DQO (g) para fotofermentação em batelada alimentada com glicose por *R. palustris*.

O ensaio durou 303 h e os resultados mostraram que ao final do processo de fotofermentação acumulou-se 0,51 mols de  $H_2$ . Observa-se também que a produtividade máxima foi em 23 h de experimento, atingindo 149,60 mmol  $H_2/L \cdot dia$ .

Pela Figura 5.1 (c), a que indica o perfil do consumo de glicose em relação ao tempo, nota-se, que o açúcar é consumido rapidamente no início do processo, sendo que as adições em 93 e 143 h permitiram reativar o sistema para a produção do biogás no período de 135 a 183 h, como pode ser observado pela Figura 5.1 (d) de volume de biogás. Vale ressaltar que a glicose foi consumida mais lentamente entre 143 e 231 h, ocorrendo uma reposição às 279 h de processo. Após essa última adição, a glicose foi lentamente consumida e às 303 h, quando cessou a produção do biogás, houve um residual de aproximadamente 7,0 g/L.

Em relação ao volume de biogás produzido, atingiu-se ao final do processo 6,22 L, sendo que, o pico máximo no volume ocorreu em 135 h sendo registrados 577,26 mL de acordo com a Figura 5.1 (d).

Com relação à variação da concentração celular, Figura 5.1 (e), a concentração inicial foi 0,65 g/L e em 183 h de ensaio a biomassa atingiu sua concentração máxima (4,74 g/L). Em seguida, observa-se um decréscimo na concentração até 264 h e permanece constante até o final do experimento (2,52 g/L).

A respeito da razão C/N, esse parâmetro iniciou-se em 28,87 (m/m) e ao final do ensaio chegou a 142,03 (m/m), sendo que, esse aumento está relacionado com a conversão do açúcar em metabólitos (ácidos orgânicos e etanol) e não na conversão total do substrato em gás carbônico e hidrogênio de acordo com a estequiometria indicada pela Equação 3.12 (LOSS, 2009). Pela mesma razão que se justificou o aumento da razão C/N, o parâmetro DQO aumentou continuamente ao longo da fotofermentação (23,85 g  $O_2/L$  – 69,04  $O_2/L$ ).

Os resultados obtidos para o mol de hidrogênio pontual e a variação na concentração dos metabólitos formados ao longo do processo são mostrados na Figura 5.2.



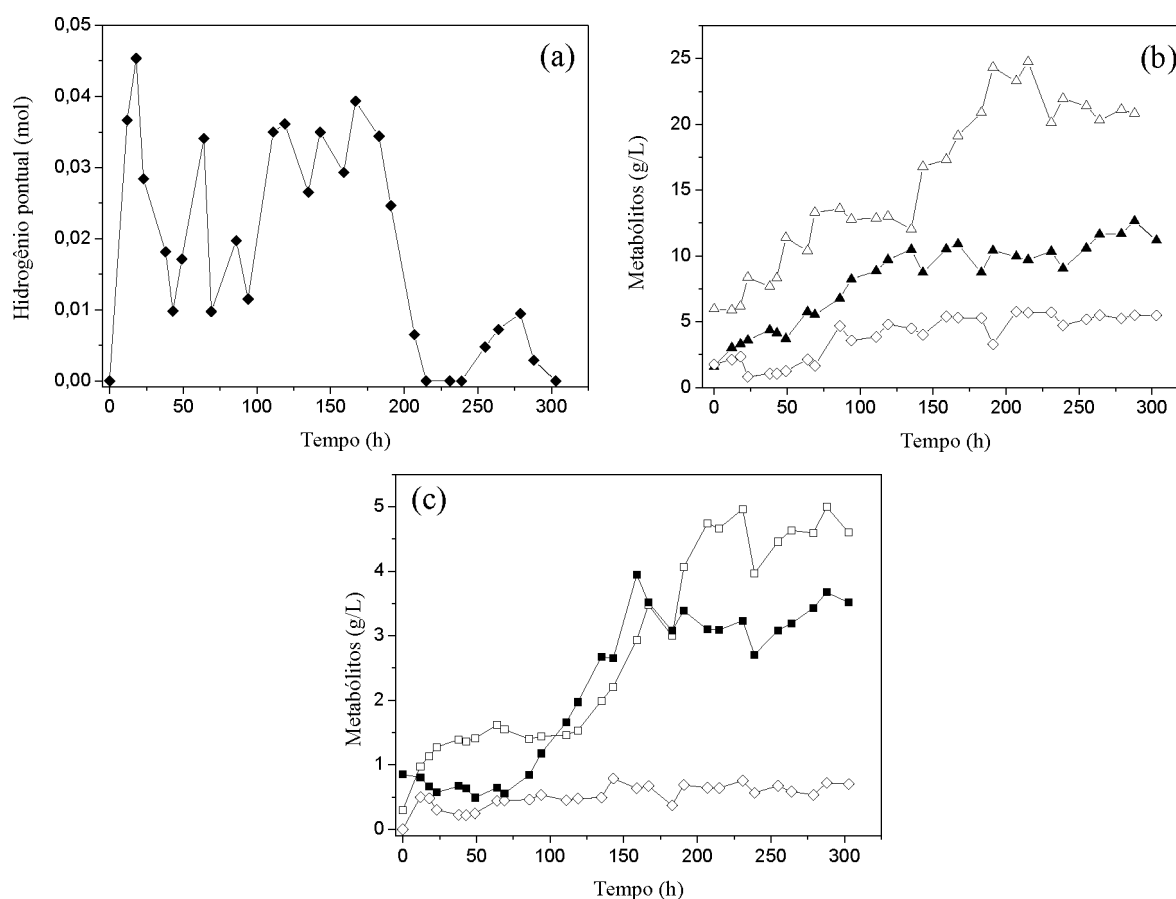


Figura 5.2 - Dados de mol de hidrogênio pontual (a), perfil da concentração do ácido láctico ( $\Delta$ ), ácido butírico ( $\blacktriangle$ ) e etanol ( $\diamond$ ) (b), perfil da concentração do ácido fórmico ( $\blacktriangleright$ ), ácido acético ( $\square$ ) e ácido propiônico ( $\blacksquare$ ) (c) para fotofermentação em batelada alimentada com glicose por *R. palustris*.

Em relação ao hidrogênio formado pontualmente e aos metabólitos, observa-se que ao atingir a quantidade máxima na produção do gás (0,045 mol) em 18 h, o ácido acético aumentou sua concentração de 0,29 g/L para 1,13 g/L. O ácido butírico aumentou em 2 vezes sua concentração, variando de 1,58 g/L para 3,30 g/L. Nota-se também que houve um pequeno aumento na quantidade de ácido láctico (5,75 g/L – 5,89 g/L) e a concentração de etanol variou de 1,75 g/L à 2,35 g/L. O ácido fórmico que não estava presente no meio de fermentação foi produzido e sua concentração às 18 h foi 0,48 g/L. Já o ácido propiônico foi consumido nesse mesmo intervalo (0,85 g/L – 0,66 g/L).

No intervalo de 18 às 191 h de processo houve a produção de hidrogênio e os ácidos láctico, butírico, acético, fórmico e propiônico, assim como o etanol, aumentaram suas concentrações. Em 215 h não foi detectada a produção de hidrogênio e, diferentemente do ensaio em escala reduzida que com a depleção do açúcar houve o consumo de ácido láctico (**Ensaio 2**), nota-se nesse experimento, que a produção de ácido láctico atingiu 24,34 g/L às 207 h. Além da rota de formação do ácido láctico não levar a

formação de hidrogênio (Equação 3.10) e por isso não ter observado sua produção nesse intervalo, a alta concentração do referido ácido pode ter tornado o meio tóxico, justificando a interrupção do sistema. Desse modo, esperou-se o consumo total da glicose (231 h) e sua reposição foi interrompida, com a finalidade de mudar a rota metabólica das bactérias PNS para o consumo de ácido láctico, visando diminuir o seu excesso. A partir de então, observa-se um decréscimo, até 239 h, não só na concentração de ácido láctico (24,75 – 21,95 g/L), mas também, nos ácidos butírico (10,34 – 9,05 g/L), acético (4,96 – 3,96 g/L), propiônico (3,09 – 2,70 g/L) e fórmico (0,76 – 0,56 g/L) e no etanol (5,72 – 4,72 g/L). Analisando o perfil dos metabólitos e o consumo de glicose é possível sugerir que as cepas possuem certa preferência pelo açúcar. E na ausência da fonte de açúcar, a rota metabólica é voltada para o consumo dos ácidos orgânicos, o que resultou na detecção do hidrogênio em 255 h.

A produção de hidrogênio permaneceu no intervalo de 255 às 288 h em uma magnitude inferior àquela observada no início do experimento. Assim, no intuito de aumentar a produtividade do gás, a adição de açúcar foi retomada às 279 h. Mesmo com a glicose presente no meio não houve um aumento na produção e a partir de 303 h cessou a formação do biogás. Desde então, a concentração dos metabólitos passou a ficar estável indicando o possível término do ensaio.

**Ensaio 4** – No quarto ensaio de fotofermentação avaliou-se a produção de hidrogênio a partir do emprego de um sistema de co-cultura, composto pelas bactérias *R. palustris* e *R. capsulatus*, na proporção inicial de 1:1 (v/v), cultivadas isoladamente em meio basal RCV e inoculadas para formar o sistema de co-cultura no início do ensaio. Nesse experimento utilizou-se a glicose como fonte de açúcar (10 g/L). As concentrações dos ácidos orgânicos e etanol presentes no efluente da fermentação escura (condição inicial para a fotofermentação) são mostrados na Tabela 5.4.

Tabela 5.4 – Composição do efluente utilizado como substrato no Ensaio 4 de fotofermentação por co-cultura em escala ampliada.

Metabólitos	Concentração (g/L)
Ácido láctico	10,98
Ácido fórmico	0,61
Ácido acético	0,73
Ácido propiônico	0,11
Ácido butírico	1,59
Etanol	0,69

Os resultados obtidos para o mol de hidrogênio acumulado, produtividade de hidrogênio, concentração de glicose, volume de biogás, concentração celular, variação da razão C/N e perfil de DQO podem ser vistos na Figura 5.3 (a – g).

Com duração de 679 h, esse ensaio acumulou uma quantidade de hidrogênio de 0,98 mols de  $H_2$ , apresentando um aumento de 92,2 % em relação ao mol de hidrogênio acumulado no ensaio utilizando apenas as cepas de *R. palustris* (0,51 mols de  $H_2$ ).

Pela Figura 5.3 (d) nota-se que houve alta taxa de evolução do biogás em um intervalo curto de tempo, sendo que, dos 9,01 L de biogás produzido, 76 % foi formado nas primeiras 119 h de um processo que durou 679 h. Após esse período, houve a produção de gás, mas em volumes consideravelmente menores. Isso justifica a tendência de evolução do hidrogênio ilustrada na Figura 5.3 (a), em que, observa-se uma curva com inclinação elevada e atingindo um patamar, sendo que, há somente um ligeiro aumento na curva de mol de hidrogênio acumulado de 0,85 para 0,98 mol de hidrogênio a partir de 119 h até o final do ensaio.

A produtividade máxima ocorreu em 19 h de processo (Figura 5.3 (b)), apresentando um valor de 287,39 mmol  $H_2$ /L·dia, valor superior ao encontrado no **Ensaio 3** (149,60 mmol  $H_2$ /L·dia).

Pela Figura 5.3 (c) nota-se, que a taxa média de consumo da glicose foi 0,25 g de glicose por hora até 200 h, caracterizando um consumo rápido do açúcar no início do processo, o que justifica a produção elevada de biogás e crescimento celular nas primeiras horas de ensaio, atingindo seu volume pontual máximo em 86 h (924,96 mL). Posteriormente, o consumo de glicose foi mais lento e verifica-se um decaimento no volume de biogás produzido e, conseqüentemente, de hidrogênio.

Nesse ensaio, a concentração inicial de células (Figura 5.3 (e)) foi 0,93g/L e a concentração máxima atingida ocorreu em 118 h de experimento chegando à 5,18g/L. Em seguida, a concentração de células decresceu 32 % em relação ao seu valor máximo e permaneceu praticamente constante até o final do ensaio.

A razão C/N, Figura 5.3 (f), iniciou-se em 7,79 (m/m) e ao final do ensaio foi registrado 143,53 (m/m). A DQO (Figura 5.3 (g)) aumentou de 28,33 g  $O_2$ /L para 88,89, ocorrendo uma queda no intervalo de tempo entre 439 e 607 h que coincide com a depleção de glicose (Figura 5.3 (c)) e consumo dos ácidos láctico e acético que foram sintetizados durante a fotofermentação como mostra Figura 5.4 (b) e (c).

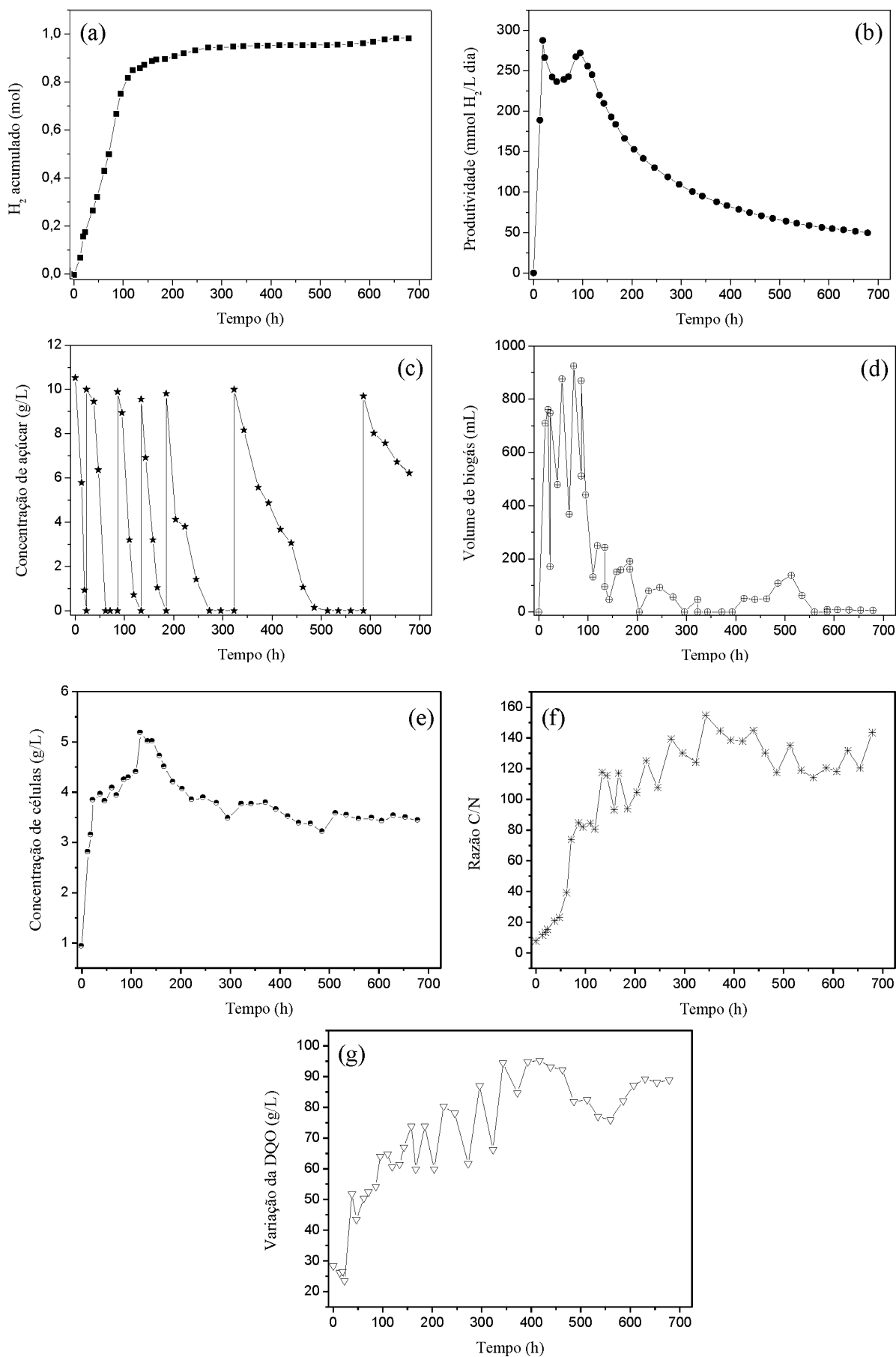


Figura 5.3 - Dados de mol de hidrogênio acumulado (a), produtividade de hidrogênio (b), concentração de glicose (c), volume de biogás produzido (d), concentração de células (e), variação da razão C/N (f) e perfil de DQO (g) para fotofermentação em batelada alimentada com glicose por co-cultura.

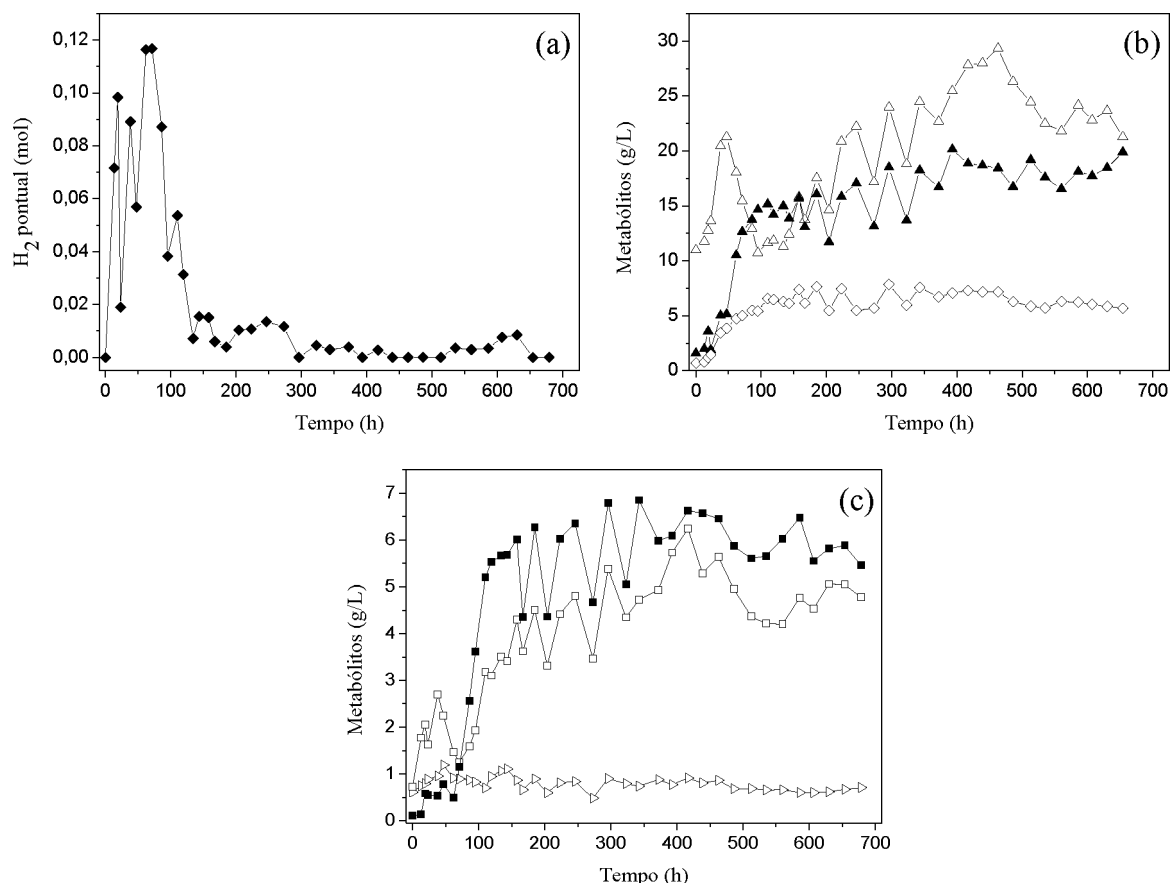


Figura 5.4 - Dados de mol de hidrogênio pontual (a), perfil da concentração do ácido láctico ( $\Delta$ ), ácido butírico ( $\blacktriangle$ ) e etanol ( $\diamond$ ) (b), perfil da concentração dos ácidos fórmico ( $\blacktriangleright$ ), acético ( $\square$ ) e propiônico ( $\blacksquare$ ) (c), para fotofermentação em batelada alimentada com glicose por co-cultura.

A análise do perfil do mol de hidrogênio pontual (Figura 5.4 (a)), indica que dentre o intervalo de maior produção de biogás (0 às 119 h) nota-se que o maior pico ocorreu durante a depleção de glicose e em que houve o consumo de ácido láctico. Além disso, nota-se o aumento nas concentrações dos outros ácidos orgânicos e do etanol. A concentração de ácido acético aumentou em 4,25 vezes (0,73 – 3,10 g/L), o ácido fórmico em 1,54 vezes (0,61 – 0,94 g/L), o ácido butírico variou de 1,59 para 14,19 g/L, o ácido láctico de 10,98 para 11,84 g/L e o ácido propiônico aumentou sua concentração de 0,11 para 5,52 g/L. O ácido láctico foi, inicialmente produzido, sendo que, às 47 h sua concentração registrou 21,27 g/L, posteriormente, houve um consumo do ácido até sua concentração chegar à 11,84 g/L em 119 h. Em relação ao etanol, sua concentração aumentou de 0,69 para 6,47 g/L.

Após 119 h a quantidade (em mol) de hidrogênio produzido caiu de maneira significativa, no entanto, as concentrações dos ácidos orgânicos (exceto ácido fórmico) e etanol, continuaram aumentando. Sabe-se que as rotas metabólicas de formação do ácido acético e do ácido butírico levam a formação de hidrogênio, no entanto, não se observou

intensa produção. Isso pode ser justificado pela alta produção de ácido láctico cuja rota não está relacionada à síntese. Em 439 h, não foi detectado a presença do biogás mesmo havendo glicose disponível no meio. Uma justificativa para essa interrupção na produção é a elevada concentração dos metabólitos que pode inativar/inibir a cultura. No referido momento, a concentração de ácido láctico chegou à 28,01 g/L. Desse modo, esperou-se o consumo total de glicose e sua reposição foi suspensa. Na sequência, nota-se o consumo de 16 à 26 % dos ácidos orgânicos (exceto ácido butírico, 6 %) e do etanol. E às 535 h a produção de hidrogênio foi restabelecida. A adição de açúcar só foi retomada às 607 h, no entanto, não houve um aumento na produção de hidrogênio e em 679 h de processo, com o fim da produção do biogás, o ensaio foi encerrado.

Em suma, a utilização da co-cultura estendeu o tempo de duração da fotofermentação (679 h), quando comparado ao **Ensaio 3** (303 h), ambos usando glicose como fonte de carbono. Além disso, o maior resultado para o mol acumulado de hidrogênio é reflexo dos maiores picos de volume de biogás alcançados nesse ensaio, indicando que pode haver uma interação entre as espécies favorecendo a produção de hidrogênio. Ressalta-se que a concentração de inóculo no **Ensaio 4**, foi maior em relação ao ensaio anterior o que possibilitaria a uma maior produção do gás. Houve também uma maior produção de ácido butírico (20,37 g/L) quando empregou-se a co-cultura e sabe-se que a formação desse metabólito ao final da fotofermentação favorece a produção de hidrogênio.

**Ensaio 5** – Como o emprego do sistema de co-cultura no **Ensaio 4** apresentou resultados superiores quando comparado ao **Ensaio 3**, a proposta para o quinto experimento foi cultivar as cepas *R. palustris* e *R. capsulatus* (na proporção inicial 1:1), já na forma de co-cultura por uma semana antes de usá-las como inóculo no experimento. Assim, avaliou-se a produção de hidrogênio, utilizando um sistema de co-cultura já aclimatado e mantendo a glicose como tipo de açúcar. A composição do efluente da fermentação escura é apresentada na Tabela 5.5. Já os resultados obtidos para o mol de hidrogênio acumulado, produtividade de hidrogênio, concentração de glicose, volume de biogás, concentração celular, variação da razão C/N e perfil de DQO podem ser vistos na Figura 5.5 (a – g).

Tabela 5.5 – Composição do efluente utilizado como substrato no Ensaio 5 de fotofermentação por co-cultura aclimatada em escala ampliada.

Metabólitos	Concentração (g/L)
Ácido láctico	21,85
Ácido acético	2,87
Ácido propiônico	0,72
Ácido butírico	0,62
Etanol	4,35

Ao utilizar a co-cultura previamente aclimatada, verifica-se que produção de biogás encerrou em 444 h de ensaio, acumulando-se somente 0,36 mols de  $H_2$  (Figura 5.5 (a)), que foi o menor valor encontrado quando comparado ao **Ensaio 3** (0,51 mols de  $H_2$ ) e ao **Ensaio 4** (0,98 mols de  $H_2$ ). Nota-se pela Figura 5.5 (a) que a curva de mol de hidrogênio acumulado apresenta dois patamares. A inclinação da curva ocorre do tempo inicial até 136 h atingindo o primeiro patamar e posteriormente, às 207 h, a curva volta a inclinar-se, alcançando o segundo patamar em 300 h de ensaio e manteve-se constante até o final do experimento. O perfil descrito para o mol de hidrogênio acumulado é condizente com a evolução do biogás mostrado na Figura 5.5 (d), visto que, o volume de biogás no tempo de 136 h começa a decair atingindo um volume nulo em 158 h e somente em 181 h que o volume de gás volta a aumentar. Assim, a curva passa a inclinar-se novamente e ao atingir o segundo patamar, em 300 h, o volume de biogás passa a decrescer, não detectando a produção em 324 e 348 h. Em 372 h é restabelecida a produção do biogás em uma magnitude inferior ao observado anteriormente. A produtividade máxima, Figura 5.5 (b), atingiu 59,26 mmol de  $H_2/L \cdot dia$  em 119 h, o que mostra um decréscimo de 2,52 e 4,85 vezes em relação ao **Ensaio 3** e ao **Ensaio 4**, respectivamente. O volume total de biogás produzido foi 3,84 L, a menor produção observada em relação aos primeiros testes.

O perfil da concentração de glicose, Figura 5.5 (c), mostra um decaimento mais lento do açúcar em relação aos outros ensaios e por isso, houve um número menor de alimentações de açúcar ao longo da fotofermentação.

A biomassa atingiu sua concentração máxima somente em 231 h de processo (4,58 g/L), tornando-se praticamente constante até o final do teste (3,78 g/L) como pode ser observado na Figura 5.5 (e). A razão C/N iniciou em 18,11 (m/m) e ao final do ensaio registrou 114,50 (m/m). A DQO variou sua concentração de 47,47 g  $O_2/L$  para 71,63 g  $O_2/L$  a 444 h. Pela menor quantidade de glicose adicionada durante o experimento, a variação desses dois parâmetros foi menor em relação aos demais ensaios.

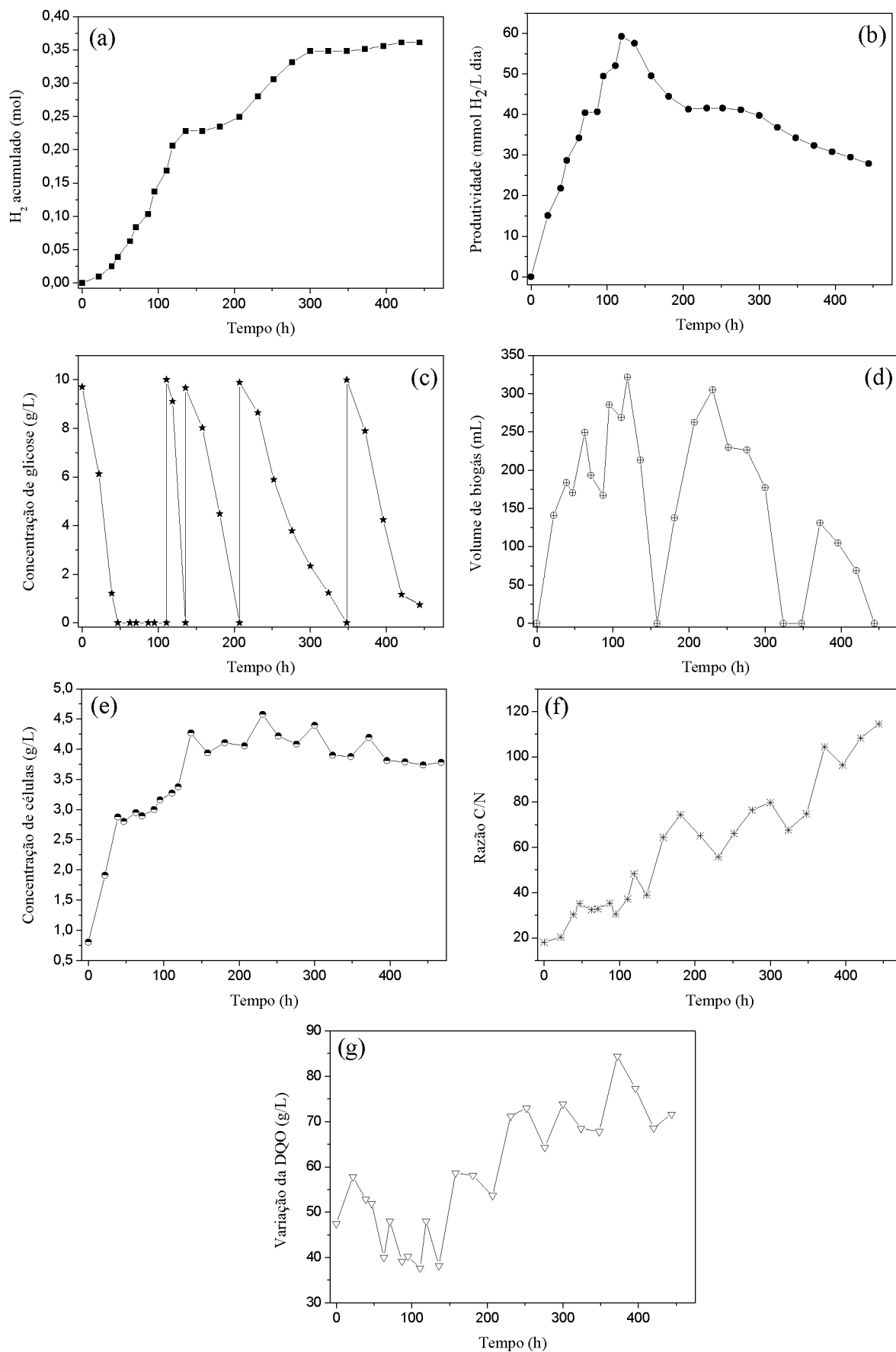


Figura 5.5 - Dados de mol de hidrogênio acumulado (a), produtividade de hidrogênio (b), concentração de glicose (c), volume de biogás produzido (d), concentração de células (e) variação da razão C/N (f) e perfil de DQO (g) para fotofermentação em batelada alimentada com glicose por co-cultura aclimatada.



A variação da concentração dos metabólitos ao longo do tempo e o de hidrogênio pontual pode ser vistos na Figura 5.6 (a – c)

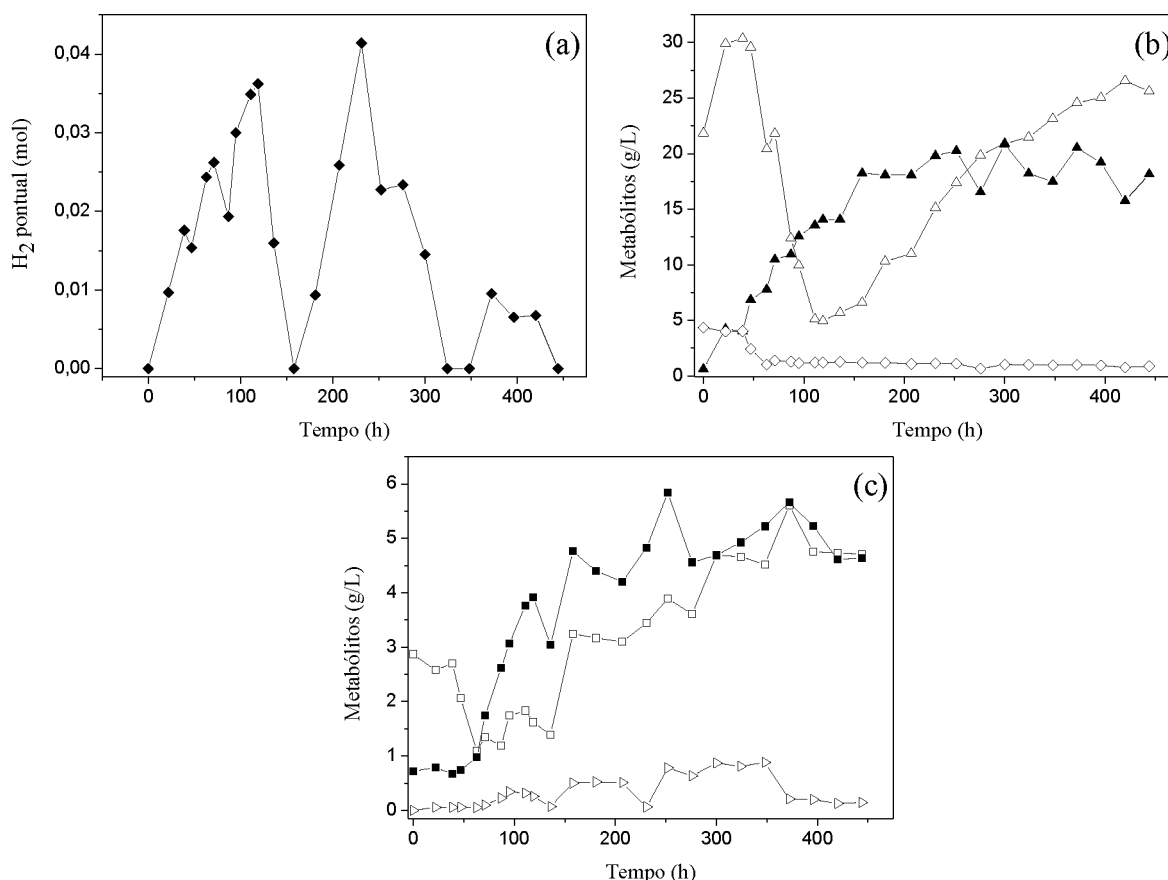


Figura 5.6 - Dados de mol de hidrogênio pontual (a), perfil da concentração do ácido láctico ( $\Delta$ ), ácido butírico ( $\blacktriangle$ ) e etanol ( $\diamond$ ) (b), perfil da concentração do ácido fórmico ( $\blacktriangleright$ ), ácido acético ( $\square$ ) e ácido propiônico ( $\blacksquare$ ) (c) para fotofermentação em batelada alimentada com glicose por co-cultura aclimatada.

Observa-se que o mol de hidrogênio máximo (pontual) ocorreu apenas em 231 h de ensaio, chegando a 0,042 mols de H<sub>2</sub>. Nota-se também a elevada concentração de ácido láctico (30,36 g/L) em 47 h de processo, o que leva a suspensão da adição da glicose como intuito já conhecido. Em 119 h, a concentração de ácido láctico decresceu em 6,1 vezes (4,96 g/L) e a adição de glicose foi retomada. No intervalo de 119 à 444 h, quando parou a produção de biogás, verifica-se um aumento na concentração de 5 vezes (4,96 – 25,60 g/L) para o ácido láctico e 3 vezes (1,62 – 4,71 g/L) para o ácido acético. Já os ácidos butírico e propiônico apresentaram um aumento de 28,8 % (14,08 – 18,15 g/L) e 18,3 % (3,92 – 4,64 g/L), respectivamente. O ácido fórmico foi consumido, variando sua concentração de 0,26 para 0,14 g/L e o etanol também apresentou um decréscimo na sua concentração, de 1,21 para 0,88 g/L.

A baixa produção de hidrogênio nesse sistema pode estar relacionado à presença de metabólitos produzidos durante o período de adaptação (7 dias), que foram transferidos para o meio de fermentação e que podem ter sido tóxicos à produção de hidrogênio. Ressalta-se também a elevada concentração de ácido láctico no início do processo (21,85 g/L) o que pode ter causado uma inibição das cepas.

**Ensaio 6** – Com base nos resultados obtidos nos ensaios anteriores, a proposta para o sexto experimento foi alterar a fonte de açúcar. Assim, empregou-se a lactose proveniente do soro de leite (10 g/L) com o intuito de induzir uma mudança na rota metabólica das bactérias visando o aumento na formação do hidrogênio ao se usar lactose como fonte de carbono. Nesse ensaio utilizou-se a cultura pura de *R. palustris* para posterior comparação com o mesmo sistema usando glicose e, posteriormente com o sistema de co-cultura. O efluente proveniente da fermentação escura foi caracterizado e apresentou as seguintes concentrações de ácidos mostrados na Tabela 5.6.

Tabela 5.6 – Composição do efluente utilizado como substrato no Ensaio 6 de fotofermentação por *R. palustris* em escala ampliada.

Metabólitos	Concentração (g/L)
Ácido láctico	0,89
Ácido fórmico	0,15
Ácido acético	1,56
Ácido propiônico	0,76
Ácido butírico	3,20

Os resultados obtidos para o mol de hidrogênio acumulado, produtividade de hidrogênio, concentração de lactose, volume de biogás, concentração celular, variação da razão C/N e perfil de DQO são apresentados na Figura 5.7 (a – g).

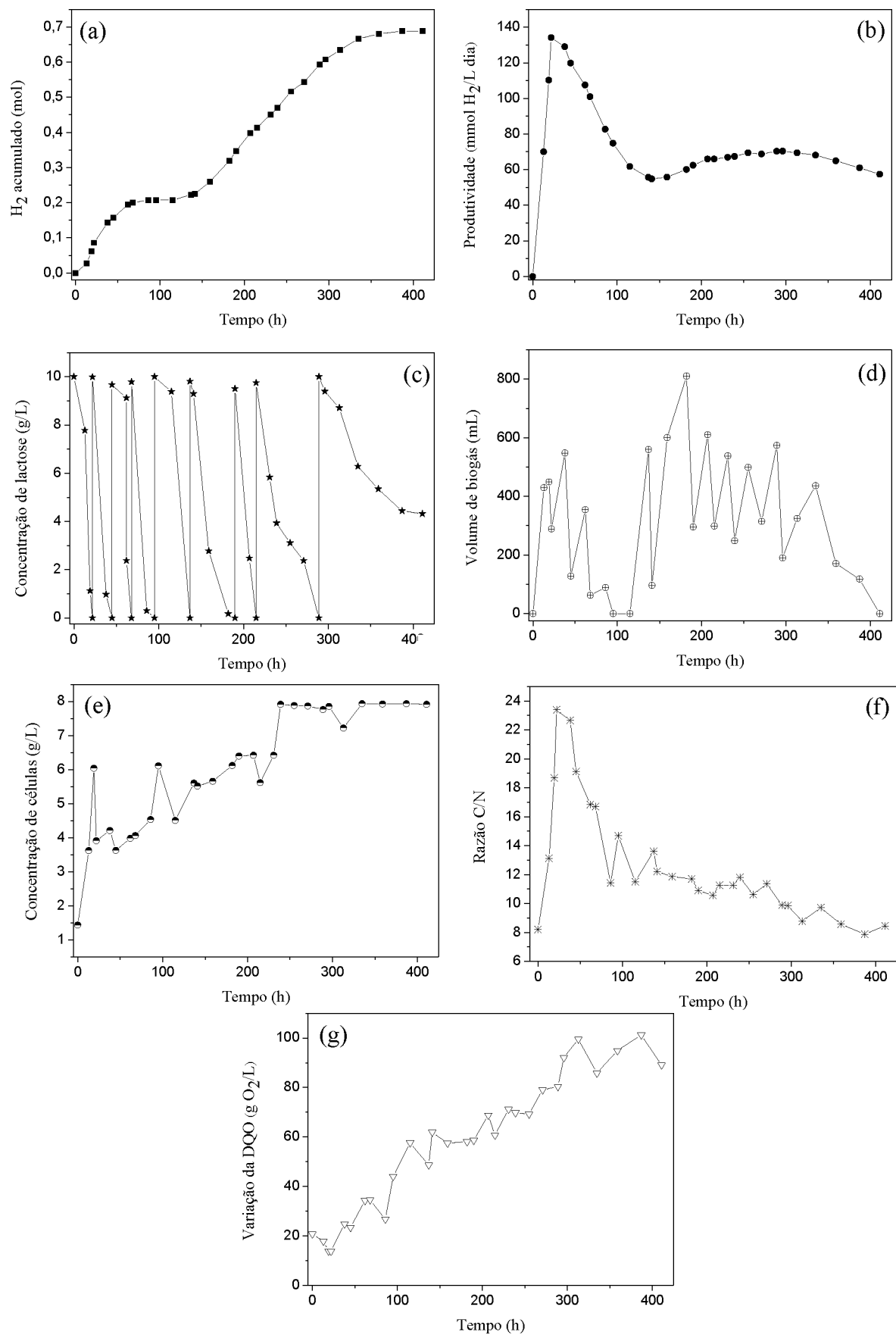


Figura 5.7 - Dados de mol de hidrogênio acumulado (a), produtividade de hidrogênio (b), concentração de lactose (c), volume de biogás produzido (d), concentração de células (e) variação da razão C/N (f) e perfil de DQO (g) para fotofermentação em batelada alimentada com lactose por *R. palustris*.

A duração do ensaio foi 411 h, sendo mais extenso que o experimento em que utilizou-se a glicose como fonte de carbono (303 h). O hidrogênio acumulado, Figura 5.7 (a), foi 0,69 mols de  $H_2$ , resultado superior ao encontrado no **Ensaio 3** (em que empregou-se a glicose) (0,51 mol de  $H_2$ ). Já a produtividade apresentou seu máximo em 22 h de teste correspondendo à 134,12 mmol de  $H_2/L \cdot dia$ , sendo 10 % menor que o valor encontrado naquele ensaio (149,60 mmol de  $H_2/L \cdot dia$ ). Em comparação com o sistema de co-cultura utilizando glicose como fonte de açúcar no **Ensaio 4**, o presente teste mostrou resultados inferiores para a duração do experimento (679 h), para a quantidade de hidrogênio acumulado (0,98 mols) e produtividade de hidrogênio (287,39 mmol de  $H_2/L \cdot dia$ ).

Observa-se também, na Figura 5.7 (a), que o perfil para o hidrogênio acumulado apresenta um patamar em 68 h que coincide com a baixa produção de biogás no intervalo de 68 a 115 h, como pode ser visto na Figura 5.7 (d). Em 115 h a produção do biogás volta a aumentar e consequentemente a inclinação da curva de hidrogênio. No entanto, em 359 h o volume passa a decrescer novamente atingindo o segundo patamar no perfil de hidrogênio acumulado.

Ao relacionar o perfil de concentração de glicose (Figura 5.7 (c)) e o volume de biogás (Figura 5.7 (d)), nota-se que glicose foi consumida rapidamente, com uma taxa média de consumo de 0,22 g de lactose por hora até 300 h, o que refletiu em uma alta produção de biogás durante esse intervalo.

Observa-se que o volume máximo de biogás mostrou-se em 182 h, obtendo 810,26 mL. Os picos de volume máximo foram maiores quando utilizou-se a lactose, o que acarretou em um maior número de mol acumulado. Ao final do ensaio acumulou-se 9,03 L de biogás, valor superior ao obtido no **Ensaio 3** (6,22 L) e **Ensaio 4** (9,01 L).

A concentração celular, apresentada na Figura 5.7 (e), variou de 1,43 g/L à 7,92 g/L, o que representa um aumento de 8,05 vezes, no entanto, verifica-se que a quantidade de inóculo foi 3 vezes maior do que no ensaio utilizando a glicose e 2,6 vezes maior do que o ensaio utilizando o sistema de co-cultura.

A razão C/N (Figura 7.7 (f), iniciou sua concentração em 8,22 g/L e foi aumentando até 22 h atingindo 23,40 g/L, posteriormente a concentração foi diminuindo ao longo do tempo, finalizando em 8,45 g/L. A DQO, mostrada na Figura 5.7 (g), variou sua concentração de 20,74 para 89,10 g  $O_2/L$  em função dos ácidos orgânicos formados ao longo do processo. O valor superior de DQO para o ensaio com lactose justifica-se pelo tempo de fermentação mais prolongado que permitiu um maior acúmulo dos

metabólitos. O comportamento observado pode estar relacionado com uma maior preferência da cepa em consumir as fontes de carbono presentes no meio em relação as fontes de nitrogênio.

A produção em mol de hidrogênio assim como a variação dos metabólitos formados com o passar do tempo pode ser vistos na Figura 5.8.

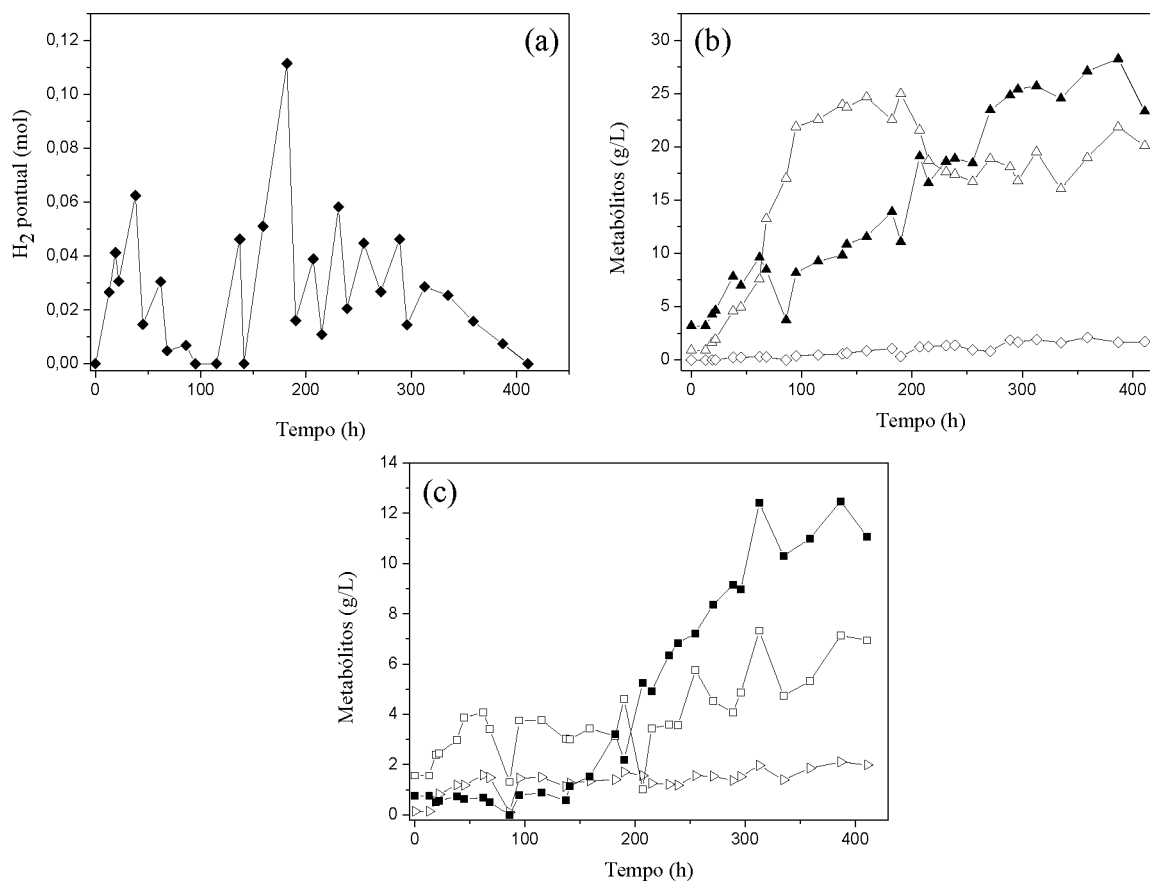


Figura 5.8 - Dados de mol de hidrogênio pontual (a), perfil da concentração do ácido láctico (Δ), ácido butírico (▲) e etanol (◇) (b), perfil da concentração dos ácidos fórmico (►), acético (□) e propiônico (■) (c) para fotofermentação em batelada alimentada com lactose por *R. palustris*.

A partir do perfil dos metabólitos, analisa-se o aumento na concentração dos ácidos orgânicos do início ao final do teste. O ácido acético aumentou sua concentração de 1,56 para 6,94 g/L, o ácido butírico de 3,20 para 23,33 g/L e o ácido láctico de 0,89 para 20,11 g/L. O ácido fórmico e o propiônico tiveram suas concentrações aumentadas em 13,6 vezes (0,15 – 1,99 g/L) e 14,2 vezes (0,76 – 11,07 g/L), respectivamente. Já o etanol, que não foi detectado no efluente da fermentação escura, passou a ser produzido a partir das 38 h e sua concentração permaneceu praticamente constante ao longo do tempo, finalizando em 1,72 g/L.

Nesse ensaio, verifica-se uma maior concentração final de ácido acético e butírico em comparação ao ensaio em que foi utilizado a glicose (**Ensaio 3**), sendo a concentração de 4,70 g/L e 11,85 g/L para o ácido acético e butírico, respectivamente. Tal fato explica a maior produção de hidrogênio, pois a rota metabólica para a formação dos referidos ácidos a partir da degradação do açúcar leva a um aumento no rendimento final do gás.

**Ensaio 7** - A proposta para o sétimo ensaio foi empregar a lactose e o sistema de co-cultura, em que, as cepas foram inoculadas no momento do preparo do ensaio, conforme realizado no **Ensaio 4**. Tal procedimento foi adotado em razão do sistema de co-cultura aclimatada no **Ensaio 5** ter apresentando baixa produção de hidrogênio. A utilização da lactose e co-cultura foi realizado para efeito de comparação em relação ao sistema de cultura pura com lactose (**Ensaio 6**) e do sistema de co-cultura com glicose (**Ensaio 4**). A composição do efluente utilizado como substrato é mostrado na Tabela 5.7.

Tabela 5.7 – Composição do efluente utilizado como substrato no Ensaio 7 de fotofermentação por co-cultura em escala ampliada.

Metabólitos	Concentração (g/L)
Ácido láctico	0,44
Ácido acético	0,33
Ácido propiônico	0,39
Ácido butírico	1,80

Os resultados obtidos para o mol de hidrogênio acumulado, produtividade de hidrogênio, concentração de lactose, volume de biogás, concentração celular, variação da razão C/N e perfil de DQO são mostrados na Figura 5.9 (a – g).

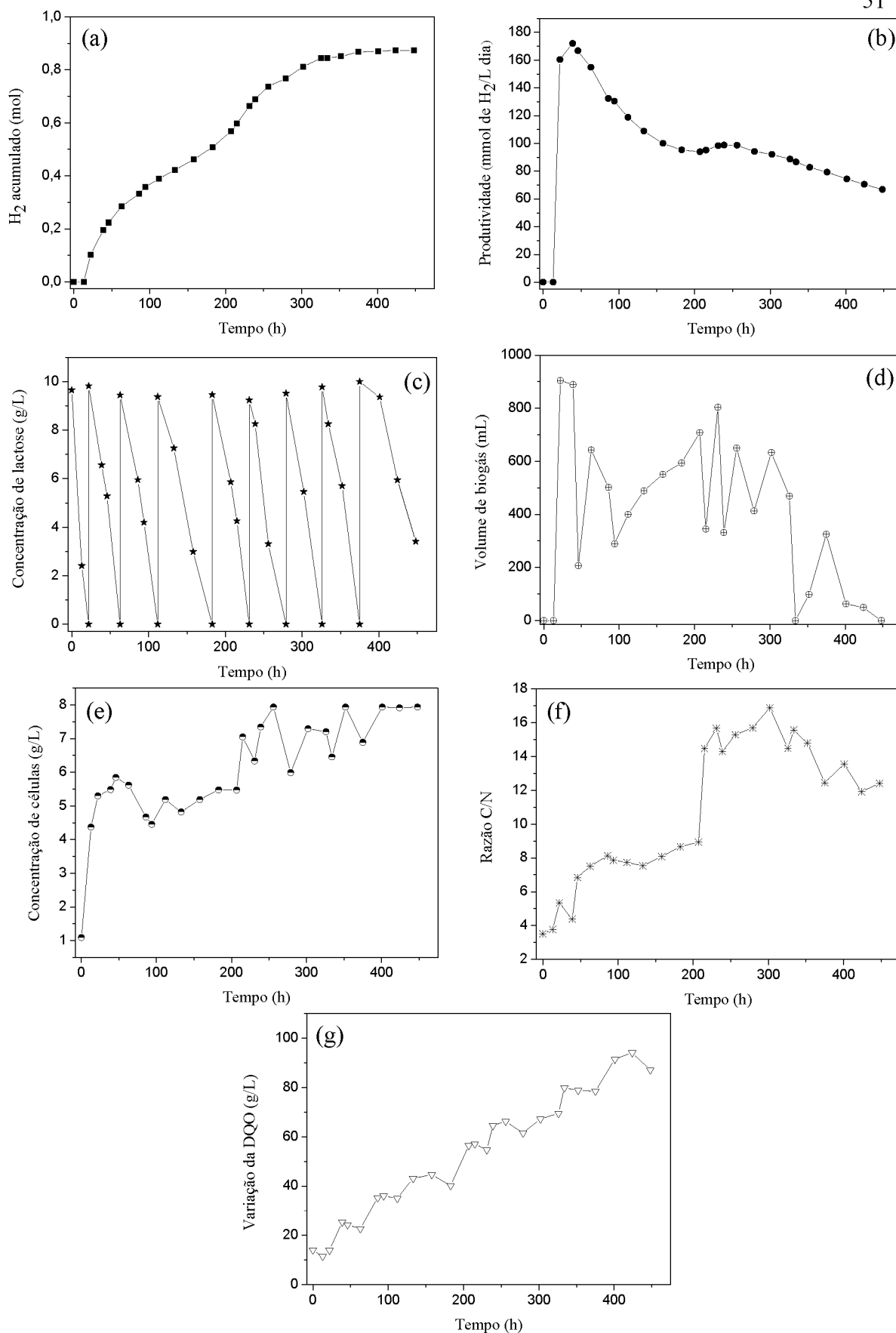


Figura 5.9 - Dados de mol de hidrogênio acumulado (a), produtividade de hidrogênio (b), concentração de lactose (c), volume de biogás produzido (d), concentração de células (e), variação da razão C/N e perfil de DQO (f), para fotofermentação em batelada alimentada com lactose por co-cultura.

O ensaio durou 448 h, momento em que cessou a produção de biogás. A extensão dessa fotofermentação foi inferior àquela em que utilizou-se a co-cultura com glicose presente ao meio (679 h), **Ensaio 4**. Em comparação ao **Ensaio 6**, em que também foi utilizada a lactose, o tempo de duração da fotofermentação não foi muito discrepante, já que o ensaio anterior durou 411 h.

A quantidade de hidrogênio acumulado ao longo do tempo, Figura 5.9 (a), e a produtividade, Figura 5.9 (b), para esse ensaio foram 0,87 mols de  $H_2$ , e 172,07 mmol de  $H_2/L \cdot dia$ , respectivamente. O referido valor para o hidrogênio acumulado é 12 % menor àquele encontrado no **Ensaio 4** (0,98 mols de  $H_2$ ) e 28 % maior em relação ao **Ensaio 6** (0,68 mols de  $H_2$ ). A produtividade também foi inferior ao ensaio utilizando a co-cultura com a glicose (287,39 mmol de  $H_2/L \cdot dia$ ) e superior ao valor encontrado no teste empregando a mesma fonte de açúcar, lactose (134,12 mmol de  $H_2/L \cdot dia$ ).

O perfil de consumo do açúcar, Figura 5.9 (c), mostra que a adição de lactose foi feita em intervalos menores de tempo em relação ao ensaio em que se utilizou a glicose (**Ensaio 4**).

Na Figura 5.9 (e) a concentração da biomassa aumenta de 1,09 g/L para 5,85 g/L nas primeiras 46 h, decresce até 4,45 g/L às 94 h de teste, retorna a aumentar atingindo 7,93 g/L em 256 h, em 279 h a concentração é de 5,99 g/L. Em seguida, as células voltam a crescer apresentando um valor médio entre 352 e 448 h de 7,72 g/L. Estes aumentos seguidos de decréscimos na concentração de células pode explicar a oscilação na formação do biogás, Figura 5.9 (d). Já no ensaio utilizando a co-cultura e glicose (**Ensaio 4**), observa-se um único perfil, a concentração celular aumenta 0,93 g/L para 5,18 g/L em 119 h de processo e decresce continuamente até 3,45 g/L. Este fato pode justificar a pouca produção de hidrogênio após 119 h de fotofermentação.

Nota-se, na Figura 5.9 (d), que o pico máximo no volume de biogás ocorreu em 22 h de processo, contabilizando 904,08 mL. O volume total de biogás foi 10,35 L; maior volume encontrado dentre todos os testes realizados.

A razão C/N variou de 3,511 à 12,409 (m/m), já a DQO, variou de 14,11 à 87,14 g  $O_2/L$ , como pode ser observado na Figura 5.9 (f) e (g), respectivamente.

Os metabólitos produzidos e o mol de hidrogênio pontual podem ser vistos na Figura 5.10.



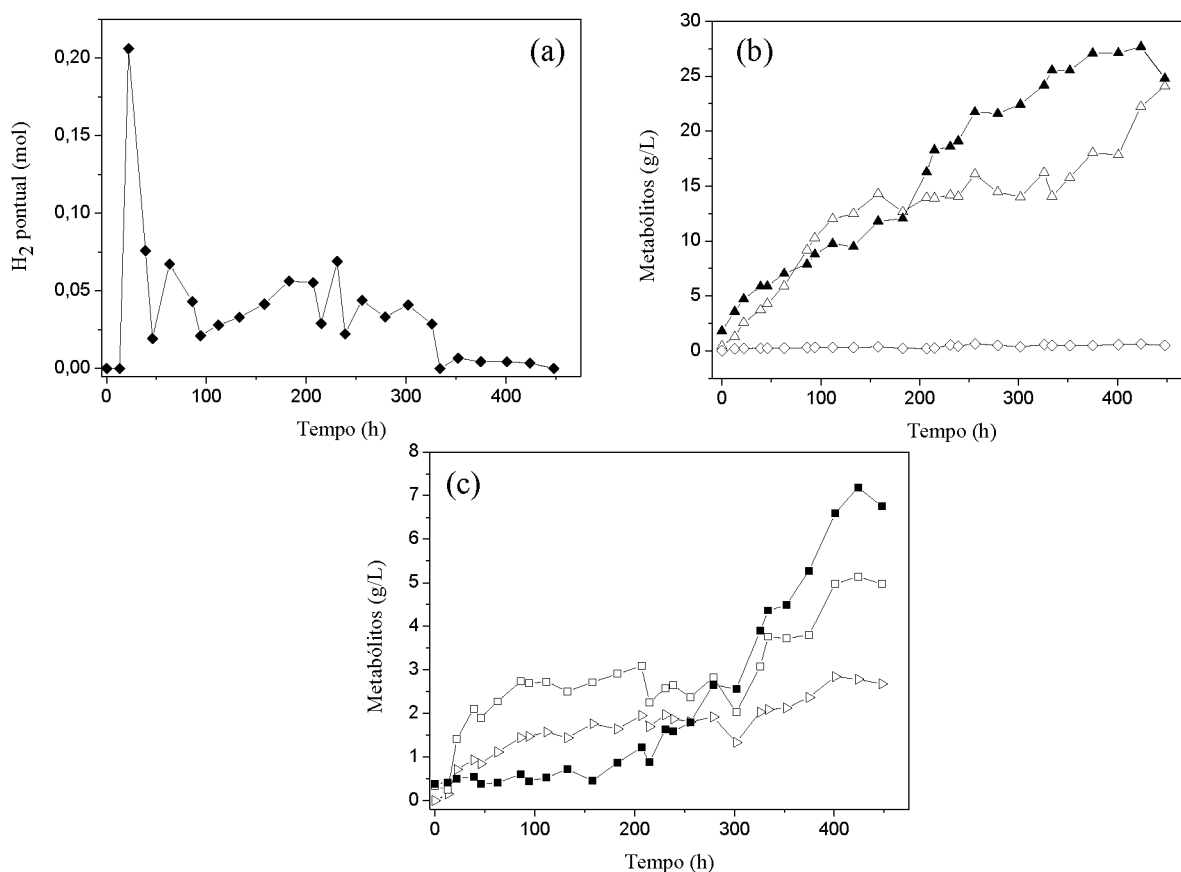


Figura 5.10 - Dados de mol de hidrogênio pontual (a), perfil da concentração do ácido láctico ( $\Delta$ ), ácido butírico ( $\blacktriangle$ ) e etanol ( $\diamond$ ) (b), perfil da concentração do ácido fórmico ( $\triangleright$ ), ácido acético ( $\square$ ) e ácido propiônico ( $\blacksquare$ ) (c) para fotofermentação em batelada alimentada com lactose por co-cultura.

Observa-se que os ácidos orgânicos nesse ensaio são continuamente produzidos, sendo que suas concentrações finais em g/L (em 448 h) são de 24,07; 2,68; 4,97; 6,76; 24,80 e 0,50 para ácido láctico, ácido fórmico, ácido acético, ácido propiônico, ácido butírico e etanol, respectivamente.

A alta concentração de ácido láctico pode ter inibido a cultura e, por isso, a extensão desta fotofermentação foi menor do que no ensaio com glicose, 679 h (**Ensaio 4**). No entanto, o hidrogênio acumulado ao longo do tempo é pouco inferior ao obtido no **Ensaio 4** (0,98 mols), visto que, a rota de síntese de ácido butírico também foi dominante e essa rota leva a formação de hidrogênio.

Foi realizada uma comparação entre as escalas reduzida (50 mL) e ampliada (1,5 L). De forma, calculou-se a quantidade de hidrogênio acumulado por volume de reator e os valores obtidos são mostrados nas Tabelas 5.8 e 5.9.

Tabela 5.8 – Mol de hidrogênio por volume de reator para a escala reduzida (50 mL).

Ensaio	Fonte de açúcar	Mol de H <sub>2</sub> /Volume de reator (mol/L)
Ensaio 1	Lactose	0,002
	Glicose	0,045
	Melaço de soja	0,014
Ensaio 2	Lactose	0,027
	Glicose	0,027
	Melaço de soja	0,044

Tabela 5.9 – Mol de hidrogênio por volume de reator para a escala ampliada (1,5 L).

Ensaio	Condição	Mol de H <sub>2</sub> /Volume de reator (mol/L)
Ensaio 3	<i>R. palustris</i> / Glicose	0,339
Ensaio 4	Co-cultura/ Glicose	0,656
Ensaio 5	Co-cultura aclimatada/ Glicose	0,241
Ensaio 6	<i>R. palustris</i> / Lactose	0,459
Ensaio 7	Co-cultura/ Lactose	0,582

Diante dos resultados apresentados nas Tabelas 5.8 e 5.9, comprova-se que o sistema em escala ampliada (1,5 L), com controle de temperatura, pH e agitação, favoreceu a produção de hidrogênio em relação a produção em frascos (50 mL).

O desenvolvimento desse trabalho mostrou ser possível a produção de hidrogênio empregando o efluente da fermentação escura juntamente com os sistemas de cultura pura e co-cultura, além de utilizar diferentes fontes de açúcares. Ressalta-se também que não foram encontrados estudos similares na literatura em que tivesse sido empregado o sistema de co-cultura composto por duas bactérias fotossintetizantes, conforme utilizado nesse trabalho. Além disso, esse processo mostrou que há subprodutos de valor agregado, sendo eles, os ácidos orgânicos, principalmente, o ácido láctico e o ácido butírico.

Comparando os dados desse estudo obtidos em reator de 50 mL pode-se concluir que a máxima produtividade atingida (8,34 mmol H<sub>2</sub>/L·dia) foi próxima aos dados

relatados em outros trabalhos, como por exemplo, o de Afsar et al. (2011) que também avaliaram a produção de hidrogênio por *R. palustris* e *R. capsulatus* em reatores de 55 mL por fotofermentação. Esses autores utilizaram como substrato o efluente da fermentação escura contendo acetato (114 mM), ácido láctico (6 mM), glicose (20 mM) e cloreto de amônio (1 mM) e foi empregada a bactéria termofílica extrema *C. saccharolyticus*. Para a cepa *R. capsulatus* a produtividade encontrada foi de 10,32 mmol de H<sub>2</sub>/L·dia, enquanto que para *R. palustris* esse valor foi de 7,92 mmol de H<sub>2</sub>/L·dia.

Os resultados obtidos para escala de 1,5 L, que são mostrados de maneira consolidada na Tabela 5.10, foram consideravelmente superiores aos encontrados na literatura, como mostra os trabalhos de Tian et al (2010) e Silva (2015).

Tian et al (2010) estudaram a produção de hidrogênio por *R. palustris* em um fotobiorreator de 1,2 L com biofilme e glicose como substrato. A concentração de glicose foi 0,12 M, o pH 7 e a temperatura do líquido afluente foi 25 °C. Observou-se a conversão de 0,2 mol de H<sub>2</sub>/mol de glicose e a produtividade nesse ensaio foi de 38,18 mmol de H<sub>2</sub>/L·dia. Ressalta-se que o meio utilizado por estes autores não é constituído por efluente de fermentação escura, o que pode justificar a baixa produtividade em relação ao trabalho atual que comprovou que o efluente de fermentação escura enriquecido com açúcar favorece a produção de hidrogênio.

Conclusão semelhante foi observada no trabalho de Silva (2015). Este autor estudou a produção de hidrogênio por fotofermentação à 35 ± 3 °C, intensidade luminosa de 5.000 lux em um biorreator de 1,5 L, utilizando as cepas de *R. capsulatus* e o efluente da fermentação escura enriquecido com açúcar (glicose ou lactose) inicialmente a 10 g/L e com reposição do açúcar periodicamente para 5 g/L. Ao se empregar a glicose, obteve-se uma produtividade máxima de 42,79 mmol H<sub>2</sub>/L·dia, 0,060 mols de hidrogênio acumulado e o volume de biogás de 0,93 L. Quando lactose foi adicionada ao efluente, a produtividade máxima foi de 114,29 mmol H<sub>2</sub>/L·dia, com 0,107 mols de hidrogênio acumulado e o volume de biogás de 2,99 L.

Tabela 5.10 – Consolidação dos resultados obtidos nos ensaios realizados em reatores de 1,5 L.

Ensaio	Condição	Tempo (h)	$\Delta C_{\text{celular}}$ (g/L)	$V_{\text{biogás}}$ (acum.) (L)	H <sub>2</sub> (máx) (mol)	H <sub>2</sub> (acum.) (mol)	Produtividade máxima (mmolH <sub>2</sub> /L dia)
Ensaio 3	<i>R. palustris</i> / Glucose	303	0,83 – 2,70	6,22	0,04	0,51	149,60
Ensaio 4	Co cultura/ Glucose	679	0,93 – 3,53	9,01	0,09	0,98	287,39
Ensaio 5	Co-cultura aclimatada/ Glucose	444	0,81 – 3,74	3,84	0,04	0,36	59,26
Ensaio 6	<i>R. palustris</i> / Lactose	411	1,43 – 7,92	9,03	0,11	0,69	134,12
Ensaio 7	Co-cultura/ Lactose	448	1,09 – 7,73	10,35	0,21	0,87	172,07

---

## CAPÍTULO 6

### CONCLUSÕES E SUGESTÕES

---

#### 6.1 Conclusões

Os resultados obtidos mostraram ser possível e com grande potencial a utilização da fotofermentação para a produção de hidrogênio a partir do efluente proveniente da fermentação escura com o emprego das bactérias púrpuras não sulfurosas *R. palustris* e *R. capsulatus*. Desse modo, conclui-se que:

Nos ensaios de escala reduzida:

- A maior produção de hidrogênio ocorreu nos testes em que foi empregado o efluente da fermentação escura como substrato, indicando que a presença de ácidos orgânicos juntamente com o tipo de açúcar favoreceu a formação do gás.
- Foi observado, nos testes utilizando o efluente, que as maiores concentrações ácido acético e ácido butírico ao final do ensaio levou a uma maior produtividade de hidrogênio. De forma antagônica, a menor produtividade observada ocorreu no teste em que se apresentou a maior concentração final de ácido propiônico.
- Nos testes em que foi empregado o efluente, foi verificado que, no meio sem açúcar, houve o consumo de ácido láctico.
- A suplementação do efluente de fermentação escura com melaço de soja permitiu maior produtividade de hidrogênio, do que a adição de glicose ou lactose.

Nos ensaios de escala ampliada:

- O sistema de co-cultura apresentou maior potencial de síntese de hidrogênio no ensaio com glicose.
- Em relação ao perfil de metabólitos, foi possível notar que a rota metabólica predominante foi a de produção do ácido butírico.
- Foi observado que na ausência do açúcar que estava presente no meio, a rota metabólica foi desviada para o consumo dos ácidos orgânicos, principalmente o ácido láctico.
- Foi verificado que após certo tempo de fotofermentação o meio torna-se inapropriado ao crescimento bacteriano e a produção do hidrogênio,

possivelmente devido a presença de altas concentrações dos metabólitos formados, especialmente o ácido láctico e propiônico.

- Em relação ao consumo de açúcar, nota-se que a depleção da glicose ocorre em altas taxas no início do processo e ao longo do tempo sofre um decréscimo. Observou-se também que ao final dos ensaios, mesmo com a depleção do açúcar, as bactérias não consomem o ácido láctico como é notado no início do experimento.

## **6.2 Sugestões para trabalhos futuros**

- Suplementar o efluente da fermentação escura com o melaço de soja como fonte de açúcar.
- Testar outras configurações de biorreatores no processo de fotofermentação.

---

## CAPÍTULO 7

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

ABDALLAH, R.; DJELAL, H.; AMRANE, A.; SAYED, W.; FOURCADE, F.; LABASQUE, T.; GENESTER, F.; TAHA, S.; FLONER, D. Dark fermentative hydrogen production by anaerobic sludge growing on glucose and ammonium resulting from nitrate electroreduction. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 41, p. 5445–5455, 2016.

ADESSI A., TORZILLO G., BACCETTI E., DE PHILIPPIS, R. Sustained outdoor H<sub>2</sub> production with *Rhodospseudomonas palustris* cultures in a 50 L tubular photobioreactor. *International Journal Hydrogen*, v. 37, p. 8840–8849, 2012.

AFSAR, N.; ÖZGÜR, E.; GÜRGAN, M.; AKKÖSE, S.; YÜCEL, M.; GÜNDÜZ, U.; EROGLU, I. Hydrogen productivity of photosynthetic bacteria on dark fermenter effluent of potato steam peels hydrolysate. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.36, p.432-438, 2011.

AKKERMAN, I.; JANSSEN, M.; ROCHA, J.; WIJFFELS, R.H. Photobiological hydrogen production: photochemical efficiency and bioreactor design. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.27, p. 1195-1208, 2002.

ALVAREZ-GUZMÁN, C. L.; OCEGUERA-CONTRERAS, E.; ORNELAS-SALAS, J. T.; BALDERAS-HERNÁNDEZ, V. E.; LÉON-RODRÍGUEZ, A. Biohydrogen production by the psychrophilic G088 strain using single carbohydrates as substrate. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 41, p. 8092-8100, 2016.

AMARAL, Danilo. História da Mecânica - O motor a vapor. UFPB, 2010. Disponível em:<[http://www.demec.ufmg.br/port/d\\_online/diario/Ema078/historia%20do%20motor%20a%20vapor.pdf](http://www.demec.ufmg.br/port/d_online/diario/Ema078/historia%20do%20motor%20a%20vapor.pdf)>. Acesso em: 15 jan. 2016.

ARGUN, H.; KARGI, F. Bio-hydrogen production by different operational modes of dark and photo-fermentation: An overview. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 36, p. 7443-7459, 2011.

AZWAR, M. Y.; HUSSAIN, M. A., ABDUL-WAHAB, A. K. Development of biohydrogen production by photobiological, fermentation and electrochemical processes: a review. *Renewable Sustainable Energy Rev*, v. 31, p. 158-173, 2014.

BABU, V.L.; MOHAN, S.V.; SARMA, P.N. Influence of reactor configuration on hydrogen production during wastewater treatment. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 34, p. 3305-3312, 2009.

BALAT, H.; KIRTAY, E. Hydrogen from biomass e Present scenario and future prospects. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 35, p. 7416-7426, 2010.

BASAK, N.; JANA, A. K.; DAS, D.; SAIKIA. Photofermentative molecular biohydrogen production by purple-non-sulfur (PNS) bacteria in various modes: The present progress and future perspective. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 39, p. 6853–6871, 2014.

CHAUBEY, R.; SAHU, S.; JAMES, O. O.; MAITY, S. A review on development of industrial processes and emerging techniques for production of hydrogen from renewable and sustainable sources. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Oxford, v. 23, p.443-462, 2013.

CHEN, C. Y.; YANG, M. H.; YEH, K. L.; LIU, C.H.; CHANG, J.S. Biohydrogen production using sequential two-stage dark and photo fermentation processes. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 33, p. 4755-4752, 2008.

CHERNICARO, C.A.L. Princípios do tratamento biológico de águas residuárias – Reatores anaeróbios. Belo Horizonte: UFMG, 2007.

CHONG, M.L., RAHMAN, N.A., YEE, P. L., AZIZ, S.A., RAHIM, R.A., SHIRAI, Y., HASSAN, M. A. Effects of pH, glucose and iron sulfate concentration on the yield of biohydrogen by *Clostridium butyricum* EB6. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 34, p. 8859–8865, 2009a.

COHCE, M. K., ROSEN, M. A., DINCER, I. Efficiency evaluation of a biomass gasification-based hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 36, p. 11388-11398, 2011.

COSTA, R. C.; PRATES, C. P. O papel das fontes renováveis de energia no desenvolvimento do setor energético e barreiras à sua penetração no mercado, 2005. Disponível em: <[http://www.bibliotecaflorestal.ufv.br/bitstream/handle/123456789/4210/BNDES\\_O-papel-das-fontes-renov%C3%A1veis-de-energia-no-desenvolvimento-do-setor-energ%C3%A9tico-e-barreiras-%C3%A0-sua-penetra%C3%A7%C3%A3o-no-mercado-2005.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://www.bibliotecaflorestal.ufv.br/bitstream/handle/123456789/4210/BNDES_O-papel-das-fontes-renov%C3%A1veis-de-energia-no-desenvolvimento-do-setor-energ%C3%A9tico-e-barreiras-%C3%A0-sua-penetra%C3%A7%C3%A3o-no-mercado-2005.pdf?sequence=1&isAllowed=y)> . Acesso em: 20 jan. 2016.

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

DAS, D.; VEZIROGLU, T.N. Hydrogen Production by Biological Processes: a Survey of Literature. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 26, p. 13-28, 2001.

DASGUPTA, C. N.; GILBERT, J. J; LINDBLAD, P.; HEIDORN, T.; BORGVANG, S. A.; SKJANES, K.; C, DAS, D. Recent trends on the development of photobiological processes and photobioreactors for the improvement of hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 35, p. 10218–10238, 2010.

EROGLU, E., MELIS, A. Photobiological hydrogen production: recent advances and state of the art. *Bioresour Technology*, v. 102, p. 8403–8413, 2011.

EROGLU, I.; ASLAN, K.; GUNDUZ, U.; YUCEL, M.; TURKER, L. Substrate consumption rates for hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* in a column photobioreactor. *Journal of Biotechnology*, v. 70, p. 103-113, 1999.

FADIGAS, E. A. A.; REIS, L. B.; CARVALHO, C. E. Energia, recursos naturais e a prática do desenvolvimento sustentável. 2 ed. rev. e atual. Barueri: Manole, 2012.



GINKEL, S.V.; SUNG, S. Biohydrogen production as a function of pH and substrate concentration. *Environmental Science Technology*, v. 35, p. 4726 - 4730, 2001.

GOLOMYSOVA, A.; GOMELSKY, M.; IVANOV, P.S. Flux balance analysis of photoheterotrophic growth of purple nonsulfur bacteria relevant to biohydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 35, p. 12751–12760, 2010.

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

HALLENBECK, P. C.; GHOSH, D. Advances in fermentative biohydrogen. *Trends In Biotechnology*, v. 27, p. 287-297, 2009.

HALLENBECK, P.C.; BENEMANN, J. R. Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.27, p. 1185-1193, 2002.

HERNÁNDEZ, A. B., FERRASSE, J. H., ROCHE, N. Limiting the pollutant content in the sewage sludge producer gas through staged gasification. *Chemical Engineering Technology*, v. 36, p. 1985–1996, 2013.

HOLLADAY, J. D.; HU, J.; KING, D. L.; WANG, Y. An overview of hydrogen production technologies. *Catalysis Today*, v. 139, p. 244-260, 2009.

HWANG, M. H.; JANG, N. J.; HYUN, S. H.; KIM, I. S. Anaerobic bio-hydrogen production from ethanol fermentation: the role of pH. *Journal of Biotechnology*, v. 111, p. 297–309, 2004.

JAYASINGHEARACHCHI, H.S.; SARMA, P.M.; SINGH, S.; AGINIHOTRI, A.; MANDAL, A.K.; LAL, B. Fermentative hydrogen production by two novel strains of *Enterobacter aerogenes* HGN-2 and HT 34 isolated from sea buried crude oil pipelines. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 34, p. 7197-7207, 2009.

KAMALASKAR, L.B.; DHAKEPHALKAR, P.K.; MEHER, K.K.; RANADE, D.R. High biohydrogen yielding *Clostridium* sp. DMHC-10 isolated from sludge of distillery waste treatment plant. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 35, p. 10639- 10644, 2010.

KAWAGOSHI, Y.; OKI, Y.; NAKANO, I.; FUJIMOTO, A.; TAKAHASHI, H. Biohydrogen production by isolated halotolerant photosynthetic bacteria using long-wavelength light-emitting diode (LW-LED). *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 35, p. 13365–13369, 2010.

KESKIN, T.; HALLENBECK, P.C. Hydrogen production from sugar industry wastes using single-stage photofermentation. *Bioresource Technology*, v. 112, p. 131-136, 2012.

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

KHUSNUTDINOVA, A.N.; OVCHENKOVA, E.P.; KHRISTOVA, A.P.; LAURINAVICHENE, T.V.; SHASTIK, E.S.; LIU, J.; TSYGANKOV, A.A. New tolerant strains of purple nonsulfur bacteria for hydrogen production in a two-stage integrated system. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 37, p. 8820–8827, 2012.

KIM, B. W.; CHANG, K. P.; CHANG, H. N. Effect of light source on the microbiological desulfurization in a photobioreactor. *Bioprocess Engineering*, v.17, p.343-348,1997.

KIM, S. H.; HAN, S. K.; SHIN, H. S. Effect of substrate concentration on hydrogen production and 16s rDNA-based analysis of the microbial community in a continuous fermenter. *Process Biochemistry*, v. 41, p. 199 - 207, 2006.

KIRTAY, E. Recent advances in production of hydrogen from biomass. *Energy Conversion and Management*, v. 52, p. 1778 – 1789, 2011.

KOKU, H.; EROGLU I.; GUNDUZ U.; YUCEL, M. Aspects of the metabolism of hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides*. *International Journal Hydrogen Energy*, v. 27, p. 1315- 1329, 2002.

KORDESCH, K; SIMADER, G. Fuel Cells and their applications. Weinheim: New York; Basel; Cambridge: Tokyo: VCH, 1996. ISBN 3 – 527-28579 -2. NE: Simader, Gunter, p. 375.

KOTAY, S. M.; DAS, D. Biohydrogen as a renewable energy resource – prospects and potentials. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 33, p. 258–263, 2008.

KOTHARI, R.; BUDDHI, D.; SAWHNEY, R.L. Comparison of environmental and economic aspects of various hydrogen production methods. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 12, p. 553-563, 2008.

LAY, J-J. Biohydrogen generation by mesophilic anaerobic fermentation of microcrystalline cellulose. *Biotechnology Bioenergy*, v. 74, p. 280-287, 2000.

LÁZARO, C. Z. Obtenção e Caracterização Filogenética de Consórcio de Bactérias Fototróficas Púrpuras Não-Sulfurosas Consumidoras de Ácidos Orgânicos Visando a Produção de Hidrogênio em Reator Anaeróbio de Batelada. Dissertação de Mestrado, Escola de Engenharia de São Carlos, 2009.

LÁZARO, C. Z.; VICH, D. V.; HIRASAWA, J. S.; VARESCHE, M. B. A. Hydrogen Production and Consumption of Organic Acids by A Phototrophic Microbial Consortium. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 37, p. 11691–11700, 2012.

LEITE, T. L. Produção de biohidrogênio a partir do efluente da parboilização do arroz. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Pelotas, 2010.

- LEVIN, D. B.; PITT, L.; LOVE, M. Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 29, p. 173-185, 2004.
- LI, C.; FANG, H. H. P. Fermentative hydrogen production from wastewater and solid wastes by mixed cultures. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, v. 37, p. 1- 39, 2007.
- LO, Y-C, CHEN, C-Y, LEE, C-M, CHANG, J-S. Sequential dark photo fermentation and autotrophic microalgal growth for high-yield and CO<sub>2</sub>-free biohydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 35, p. 10944 – 10953, 2010.
- LONGO, M. A. V., LAZZARIN, N., MIGUEZ, T. A. Produção Biológica de Hidrogênio. Apostila, Universidade Federal de Santa Catarina, 2009.
- LOSS, R. A. Avaliação da produção de hidrogênio por consórcio bacteriano fotoheterotrófico. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, 2009.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; STAHL, D., PARKER, J. Brock biology of microorganisms. 13th ed. New Jersey: Prentice Hall; 2013, ISBN 0-130-66271-2; 2013.
- MANDAL, B.; NATH, K.; DAS, D. Improvement of biohydrogen production under decreased partial pressure of H<sub>2</sub> by *Enterobacter cloacae*. *Biotechnology Letters*, v. 28, p. 831-835, 2006.
- MATHEWS, J.; WANG, G. Metabolic pathway engineering for enhanced biohydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 34, p. 7404-7416, 2009.
- MCKINLAY, J.B., HARWOOD, C.S. Photobiological production of hydrogen gas as a biofuel. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 21, p. 244 – 251, 2010.
- MELNICKI, M.; BIANCHI, L.; DE PHILIPPIS, R.; MELIS, A. Hydrogen production during stationary phase in purple photosynthetic bacteria. *International Journal Hydrogen Energy*, v. 33, p. 6525-6534, 2008
- MEYER, J. [FeFe] hydrogenases and their evolution: a genomic perspective. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 64, p. 1063–1084, 2007.
- MIYAKE, J. MIYAKE, M. ASADA, Y. Biotechnological hydrogen production: research for efficient light energy conversion. *Journal of Biotechnology*, v. 70, p. 70–89, 1999.
- MME. Ministério de Minas e Energia. Resenha Energética Brasileira – Exercício de 2013. Edição de Junho de 2014: MME, 2014.
- MOSEY F. E. Mathematical modeling of the anaerobic digestion process: Regulatory mechanisms for the formation of short-chain volatile fatty acids from glucose. *Water Science Technology*, v. 15, p. 209–232, 1983.

NATH K, D Das. Improvement of fermentative hydrogen production: various approaches. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 65, p. 520-529, 2004.

NAVARRO, R. M.; PEÑA, M. A.; FIERRO, J. L. G. Hydrogen production reactions from carbon feedstocks fossil fuels and biomass. *Chemical Reviews*, v. 107, p. 3952-3991, 2007.

NETO, E. H. G. Evoluir sem poluir: A era do hidrogênio, das energias sustentáveis e das células a combustível. *Brasil H<sub>2</sub> Fuel Cell Energy*, Curitiba, 2005.

NEVES, L.M.V. Produção de biohidrogênio por bactérias a partir de resíduos fermentescíveis. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, 2009.

NTAIKOU, I.; ANTONOPOULOU, G.; LYBERATOS, G. Biohydrogen Production from Biomass and Wastes via Dark Fermentation: A Review. *Waste Biomass Valor*, v. 1, p. 21 - 39, 2010.

OBEID, J.; FLAUS, J. M.; ADROT, O.; MAGNIN, J.P. State estimation of a batch hydrogen production process using the photosynthetic bacteria *Rhodobacter capsulatus*. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 35, p. 10719–10724, 2010.

ODA, Y.; SAMANTA, S.K.; REY, F.E.; WU, L.; LIU, X.; YAN, T.; ZHOU, J.; HARWOOD, C.S. Functional genomic analysis of three nitrogenase isozymes in the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas palustris*. *Journal of Bacteriology*, v. 187, p. 7784 – 7794, 2005.

OLIVEIRA, T. V. Avaliação da produção de hidrogênio empregando bactérias fotossintetizantes. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Uberlândia, 91 p, 2014.

OSHIMA H, TAKAKUWA S, KATSUDA T, OKUDA M, SHIRASAWA T, AZUMA M, Production of hydrogen by a hydrogenase deficient mutant of *Rhodobacter capsulatus*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v. 85, p. 470-474, 1998.

REDWOOD, M.D.; PENFOLD, D.W.; YONG, P.; MACASKIE, L.E. A two-stage process for biohydrogen from glucose. *Proceedings International Hydrogen Energy Congress and Exhibition*, p. 13-15, 2005.

ROJAS, M. D. P. A. Influência da relação C/N na produção de hidrogênio em reatoranaeróbio de leito fixo. Dissertação de Mestrado. Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2010.

ROSA, M.F.; SOUZA FILHO, M.S.M.; FIGUEIREDO, M.C.B.; MORAIS, J.P.S.; SANTAELLA, S.T., LEITÃO, R.C., Resumos do II Simpósio Internacional sobre Gerenciamento de Resíduos Agropecuários e Agroindustriais - II SIGERA, Foz do Iguaçu, Brasil, 2011.

- SAADY, N. M. C. Homoacetogenesis during hydrogen production by mixed cultures dark fermentation: Unresolved challenge. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 38, p. 13172-13191, 2013.
- SCHLAPBACH, L., ZÜTTEL, A. Hydrogen-storage materials for mobile applications. *Nature*, v. 414, p. 353-358, 2005.
- SCHNEIDER, K.; MULLER A.; SCHRAMM U.; KLIPP, W. Demonstration of a molybdenum- and vanadium-independent nitrogenase in a nifHDK deletion mutant of *Rhodobacter capsulatus*. *Eur. J. Biochem*, v. 195; p. 653–661, 1991.
- SILVA, F. T. M. Produção de biohidrogênio por *Rhodobacter capsulatus* utilizando como substrato o efluente da fermentação escura. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Uberlândia, 2015.
- SINHA, P.; PANDEY, A. An evaluative report and challenges for fermentative biohydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 36, p. 7460-7478, 2011.
- SKONIECZNY, M.T.; YARGEU, V. Biohydrogen production from wastewater by *Clostridium beijerinckii*: effect of pH and substrate concentration. *International Journal of Hydrogen*, v. 34, p. 3288-3294, 2009.
- SOLLI, C. Fissil or Fossil: a comparative hybrid life cycle assessment of two different hydrogen production methods. Master thesis. *Norwegian University of Science and Technology*, 2004. 43 p.
- SORESEN, B. Total life cycle assessment of PEM fuel cell car. Report, Energy and Environment Group. Roskilde University Denmark, 2004.
- SPEECE, R.E. Anaerobic biotechnology for industrial wastewaters. Archaea Press: Tennessee, 1996.
- SU, H.; CHENG, J.; ZHOU, J.; SONG, W.; CEN, K. Combination of dark and photo fermentation to enhance hydrogen production and energy conversion efficiency. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.34, p. 8846-8853, 2009.
- TAI, J.; ADAV, S.S.; SU, A.; LEE, D.J. Biological hydrogen production from phenol-containing wastewater using *Clostridium butyricum*. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 35, p. 13345-13349, 2010.
- TAO, Y.; HE, Y.; WU, Y.; LI, F.; LI, X.; ZONG, W.; ZHOU, Z. Characteristics of a new photosynthetic bacterial strain for hydrogen production and its application in wastewater treatment. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 33, p. 963-973, 2008.
- TEMUDO, M.F.; KLEEREBEZEM, R.; LOOSDRECHT, M.V. Influence of the pH on (open) mixed culture fermentation of glucose: a chemostat study. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 98, p. 69-79, 2007.

TIAN, X.; LIAO, Q.; ZHU, X.; WANG, Y.; ZHANG, P.; LI, J.; WANG, H. Characteristics of a biofilm photobioreactor as applied to photo-hydrogen production. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 977–983, 2010.

TOLMASQUIM, M. T.; GUERREIRO, A.; GORINI, R. Matriz energética brasileira: uma perspectiva. *Novos Estudos*, 79, 2007.

VALDEZ-VAZQUEZ, I.; POGGI-VARALDO, H.M. Hydrogen production by fermentative consortia. *Renewable and Sustainable Reviews*, v. 13, p. 1000-1013, 2009.

VARGAS, J. V. C. Modelagem e simulação de processo de geração de hidrogênio via cultivo de microalgas em fotobiorreatores compactos. Monografia do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2013.

VAZQUEZ, G. D.; RODRÍGUEZ, A. L.; MONDRAGÓN, F. A.; FLORES, E. R. The buffer composition impacts the hydrogen production and the microbial community composition in non-axenic cultures. *Biomass and Bioenergy*, v. 35, p. 3174–3181, 2011.

VIGNAIS, P.M., COLBEAU, A. Molecular biology of microbial hydrogenases. *Curr. Issues Mol. Biol.*, v. 6, p. 159–188, 2004.

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

WEAVER, P. F.; WALL, J. D.; GEST, H. Characterization of *Rhodopseudomonas capsulate*. *Archives of Microbiology*, v. 105, p. 207-216, 1975.

WU, S. C.; LIOU, S. Z.; LEE, C.M. Correlation between bio-hydrogen production and polyhydroxybutyrate (PHB) synthesis by *Rhodopseudomonas palustris* WP3-5. *Bioresource Technology*, v. 113, p. 44–50, 2012.

ZHANG, Z.; WANG, YI.; HU, JIANJUN.; WU, QINGLIN.; ZHANG, QUANGUO. Influence of mixing method and hydraulic retention time on hydrogen production through photo-fermentation with mixed strains. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 40, p. 6521–6529, 2015.

ZHU, H.; FANG, H. H. P.; ZHANG, T.; BEAUDETTE, L. A. Effect of ferrous ion on photo heterotrophic hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides*. *International Journal Hydrogen Energy*, v. 32, p.4112–4118, 2007.

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

ZHU, Z.; SHI, J.; ZHOU, Z.; HU, F.; BAO, J. Photo-fermentation of *Rhodobacter sphaeroides* for hydrogen production using lignocellulose-derived organic acids. *Process Biochemistry*, v. 45, p. 1894–1898, 2010.