

CONTROLE DO TEMPO DE DETENÇÃO CELULAR REGULA A PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO EM BIORREATORES ACIDOGÊNICOS

Vinicius Duarte Soroka⁽¹⁾, José Carlos Alves Barroso Júnior⁽²⁾ e Maria Cristina de Almeida Silva⁽³⁾

(1) Graduando em Engenharia Ambiental pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

(2) Doutor em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

(3) Doutora em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Endereço⁽¹⁾: Avenida Bento Gonçalves, 9500 - Porto Alegre - RS - CEP: 91501-970 - Brasil - Tel: (51) 3308-6664 - e-mail: vinicius.soroka@ufrgs.br.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Pesquisas Hidráulicas, Núcleo de Estudos em Saneamento Ambiental, Laboratório de Saneamento.

RESUMO

Já é consenso que a mitigação das mudanças climáticas induzidas por atividades antropogênicas é um dos maiores desafios a serem enfrentados pela sociedade ao longo dos próximos anos. Para isso, é fundamental a adoção de medidas que ataquem a origem da crise e, portanto, direcionem o desenvolvimento social rumo à descarbonização da economia e o cessamento da utilização de combustíveis fósseis. O gás hidrogênio produzido de fontes renováveis a partir de bioprocessos se apresenta como uma interessante alternativa, pois além de permitir queima limpa, sem a emissão de dióxido de carbono, também possui rendimento energético por massa quase três vezes superior ao de combustíveis hidrocarbonetos. Para maximizar a geração de gás, tem se recorrido ao emprego de biorreatores anaeróbicos fermentativos, cujas vantagens ainda incluem o reduzido consumo energético e a possibilidade da utilização de diversas fontes de biomassa, inclusive efluentes e resíduos agroindustriais. Entretanto, as condições ótimas de operação de biorreatores para produzir H₂ dependem de uma série de fatores, tais como temperatura, pH, carga orgânica, nutrientes, tempo de detenção hidráulico e celular. Assim, o presente estudo teve como objetivo investigar como a variação no tempo de detenção celular influencia a produção de hidrogênio em biorreatores anaeróbicos acidogênicos, através de um experimento em escala de bancada. O experimento foi conduzido durante 35 dias, com dois biorreatores anaeróbicos acidogênicos (volume útil de 5 litros), contrastantes apenas quanto ao tempo de detenção celular, de 2,5 ou 3,5 dias. A biomassa utilizada foi de lodo granular proveniente do reator UASB da estação de tratamento de uma indústria de processamento de soja. O reator com menor tempo de detenção celular apresentou tendência de maior produção de gás total e de H₂, porém as variações observadas na Demanda Química de Oxigênio (DQO) e Sólidos Voláteis Totais (SVT) indicam que aos 35 dias ainda não havia ocorrido estabilização completa dos biorreatores. Para validação estatística dos resultados, planeja-se a repetição do experimento com duração prolongada, de pelo menos dois meses.

PALAVRAS-CHAVE: Biorreator, Fermentação, Biogás, Produção de Hidrogênio, Tempo de Detenção Celular.

INTRODUÇÃO

As mudanças climáticas induzidas por atividades antropogênicas vêm causando danos evitáveis sem precedentes ao ambiente, com impactos à maioria dos seres vivos (CAVICCHIOLI et al., 2019). A substituição de combustíveis fósseis e descarbonização da economia de forma geral são essenciais para mitigar os efeitos prejudiciais associados às emissões humanas de gases estufa (GEELS et al., 2017). Para isso, é imprescindível o desenvolvimento de tecnologias mais limpas de geração e armazenamento de energia.

Neste contexto, o gás hidrogênio (H₂) é frequentemente considerado como uma das mais promissoras fontes de energia para o futuro, uma vez que possui rendimento energético por massa quase três vezes superior ao de combustíveis hidrocarbonetos (JUNG et al., 2010), além de não emitir dióxido de carbono na sua queima ou consumo. Entretanto, muitas das tecnologias de produção de H₂ disponíveis são baseadas em métodos não

sustentáveis (e.g., a partir da gaseificação de carvão, extração de gás natural, eletrólise da água com utilização de suprimento energético proveniente de fontes não renováveis, etc.).

De fato, estima-se que 95% do hidrogênio produzido atualmente seja oriundo de combustíveis fósseis (NOBLECOURT et al., 2017). Ademais, mesmo os processos que utilizam biomassa ou água para a produção de H₂ requerem energia e, portanto, critérios de eficiência e sustentabilidade devem ser centrais em qualquer operação de geração do gás (TURNER, 2004). Entre as alternativas estabelecidas, destaca-se a utilização de biorreatores anaeróbicos fermentativos, que têm como vantagens o reduzido consumo energético e a possibilidade da utilização de diversas fontes de biomassa, inclusive efluentes e resíduos agroindustriais (BAKONYI et al., 2014). Contudo, o estabelecimento das melhores condições de operação desses biorreatores não é uma tarefa trivial, uma vez que diversos parâmetros são relevantes e estão inter-relacionados.

Sabe-se que vários fatores são capazes de influenciar a taxa e rendimento de produção de H₂ nesses biorreatores, tais como temperatura, pH, carga orgânica, nutrientes e tempo de detenção hidráulica (WANG et al., 2017). Entretanto, devido a resultados contraditórios na literatura científica, ainda não se estabeleceu um consenso definitivo sobre os valores ótimos para todos os fatores relevantes (WANG & WAN, 2009). O estabelecimento das condições operacionais ideais é essencial pois pode auxiliar na maximização da eficiência produtiva. Portanto, reforça-se a necessidade de mais estudos que explorem como as alterações nas condições de operação dos biorreatores anaeróbicos modificam o rendimento e a taxa de produção de gás hidrogênio.

Assim, o objetivo principal do estudo foi investigar como a variação no tempo de detenção celular influencia a produção de hidrogênio em biorreatores anaeróbicos acidogênicos, através de um experimento em escala de bancada.

Os objetivos específicos foram de operar dois biorreatores semicontínuos, em escala de bancada e com diferentes tempos de detenção celular, durante o tempo mínimo de um mês; determinar periodicamente o volume total de gás produzido, assim como a concentração de gás hidrogênio; e monitorar os parâmetros de Demanda Química de Oxigênio (DQO), Sólidos Voláteis Totais (SVT) e pH.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados dois biorreatores fermentativos acidogênicos, com volume de sete litros e volume útil de cinco litros (Figura 1). Utilizou-se biomassa proveniente de lodo granular, cuja origem foi um reator UASB da estação de tratamento de efluentes de uma indústria de processamento de soja. Para favorecer a formação de hidrogênio, os microrganismos foram previamente submetidos à etapa de tratamento térmico, na qual o lodo foi aquecido a 100 °C durante 15 min em chapa aquecedora (ROSSI et al., 2011), verificando-se a temperatura com termômetro.

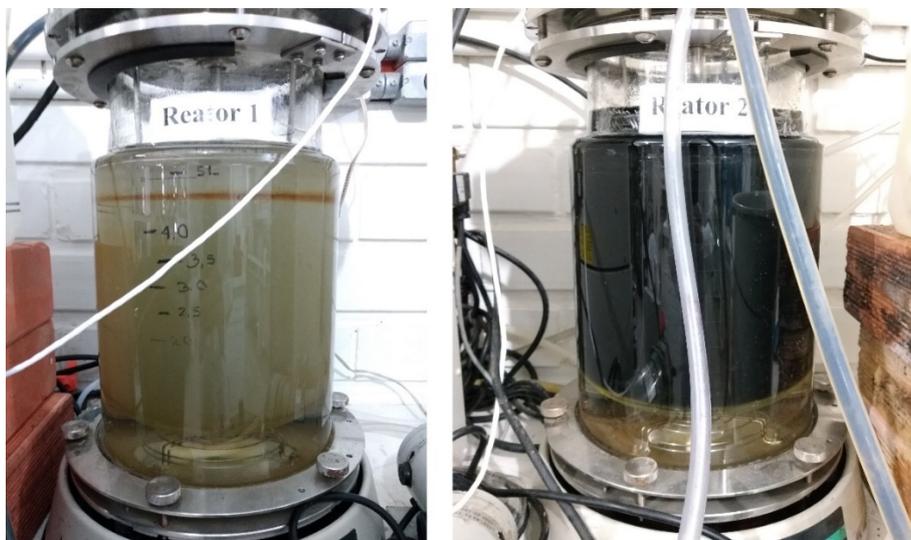


Figura 1: Biorreatores utilizados no experimento, com tempos de detenção celular de 2,5 (Reator 1) e 3,5 dias (Reator 2).

A Figura 1 permite verificar que o meio do reator 1 passou por uma rápida clarificação logo após o início do experimento, sendo que o reator 2 permaneceu turvo durante mais alguns dias, reforçando a necessidade de um período inicial de estabilização para que eles possam ser comparados adequadamente.

Utilizou-se meio nutritivo padrão completo em macro e micronutrientes (LIN & LAY, 2005) nos biorreatores, que foram operados durante 35 dias em regime semicontínuo de alimentação. Foi mantida mistura constante, por agitador magnético, e a temperatura foi ajustada para 35 °C durante todo o período, durante o qual ambos os reatores foram alimentados diariamente com 10.000 mg/L de sacarose em meio nutritivo, além de 0,3 a 0,6 grama de bicarbonato de sódio por grama de DQO, dosado sob demanda de modo a manter o pH próximo ao valor de 5,5. Apenas o tempo de detenção celular variou entre os biorreatores, sendo de 2,5 dias no Reator 1 (traduzidos em um volume de 2 litros trocados diariamente) e 3,5 dias no reator 2 (1,42 litros trocados por dia).

O volume de gás produzido foi registrado aproximadamente a cada 24 horas através da sua captura em um recipiente hermético preenchido por água, semelhante a uma garrafa de Mariotte, e medição do volume de fluido deslocado do mesmo. Inicialmente foram utilizadas garrafas plásticas de 5 litros para este propósito, que posteriormente foram substituídas por galões de água de 20 litros (Figura 2). Este método se mostra vantajoso pelo baixíssimo custo e facilidade de operação, porém é necessário verificar cautelosamente a vedação do sistema, uma vez que qualquer entrada de ar pode levar à superestimação do volume de gás produzido.

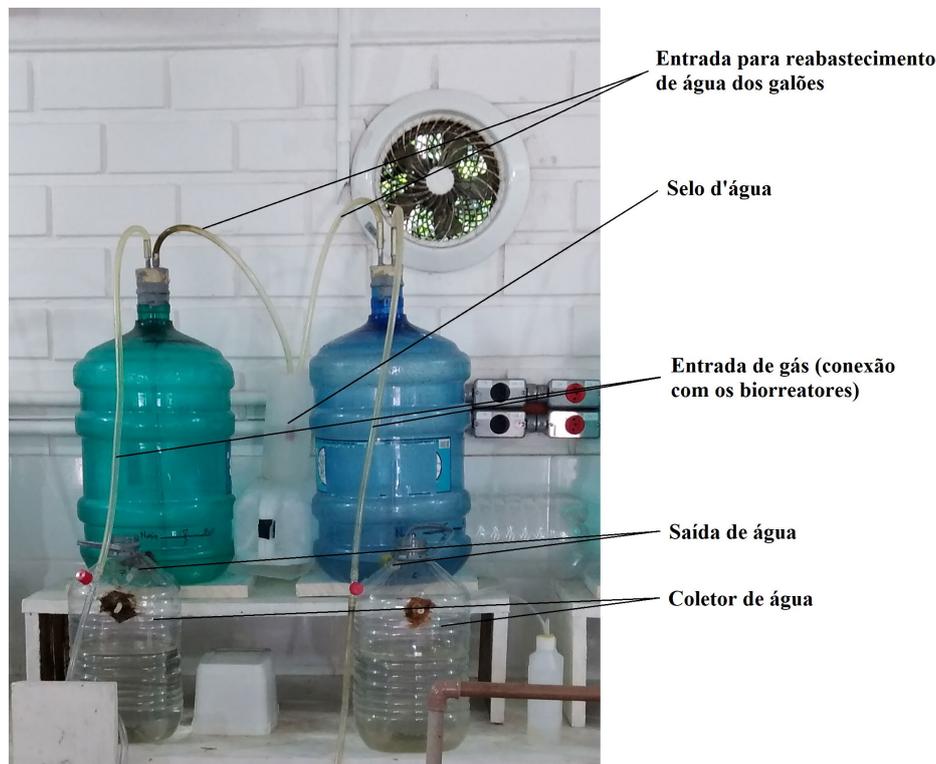


Figura 2: Galões de 20 litros de água adaptados para medição da vazão de gás dos biorreatores.

Para garantir a vedação dos medidores, foram adotadas duas abordagens: o sistema foi acoplado a um manômetro, cujo registro de pressão interna levemente superior à atmosférica foi indicativo da correta vedação; e observou-se o comportamento de liberação intermitente de água, sendo a liberação contínua considerada indicativa de vazamento no sistema.

A qualidade do biogás gerado foi verificada utilizando-se cromatógrafo gasoso Dani GC 1000 com detector de condutividade térmica (TCD) e coluna Molecular Sieve 80/100. As condições cromatográficas utilizadas foram: temperatura do injetor 50 °C; do detector 50 °C; da coluna 40 °C; gás hélio para o arraste, com fluxo de 25 ml/min; e volume de amostra injetada de 1 ml (MORIMOTO et al., 2004). Os parâmetros de pH, DQO e SVT foram determinados por leitura direta, método 5220-C e método 2540-E (ambos do Standard Methods), respectivamente.

RESULTADOS

Em decorrência da disseminação da pandemia de COVID-19 e consequentes medidas restritivas adotadas, o experimento, iniciado dia 14 de fevereiro e cuja duração inicial era prevista em dois meses, teve que ser interrompido após 35 dias. Apesar disso, os resultados obtidos até o momento apoiam a hipótese inicial, de que a redução no tempo de detenção celular pode ser capaz de aumentar a produção de biogás e inclusive a proporção de gás hidrogênio produzido.

Os parâmetros de pH (Figura 3) e DQO (Figura 4) foram monitorados diária e semanalmente, respectivamente, para controle do regime operacional dos reatores. Após ensaios preliminares, verificou-se a necessidade da adição frequente de um agente tamponante para evitar a acidificação exacerbada do meio e consequente colapso do reator. Optou-se pelo bicarbonato de sódio, cuja dose foi ajustada diariamente junto à alimentação a fim de manter o pH de ambos os reatores próximo ao valor de 5,5, pois faixas mais básicas promovem a formação de metano e, quando o meio é demasiadamente ácido (pH inferior a 4,3), a produção do hidrogênio é interrompida (KIM et al., 2004). Assim, quando o pH dos biorreatores se aproximava de 5, dosava-se até 0,6 g de bicarbonato, enquanto que, com o pH próximo de 6, a dose escolhida era em torno de 0,3 g. Em experimentos anteriores, foi constatado que, na ausência de agente tamponante, ocorre rápida acidificação do meio e consequente colapso dos reatores.



Figura 3: Oscilação do pH dos biorreatores registrada durante o experimento. As linhas vermelhas tracejadas indicam a faixa de pH mais favorável aos bioprocessos alvo.

Os resultados obtidos para DQO (Figura 4) indicam que durante o período do experimento não houve tempo para estabilização dos sistemas, uma vez que entre os dias 1 e 9 de março foi observada uma queda abrupta da carga orgânica em ambos os reatores. Para a repetição do experimento, planeja-se respeitar o período de, pelo menos, um mês para que essa estabilização ocorra.

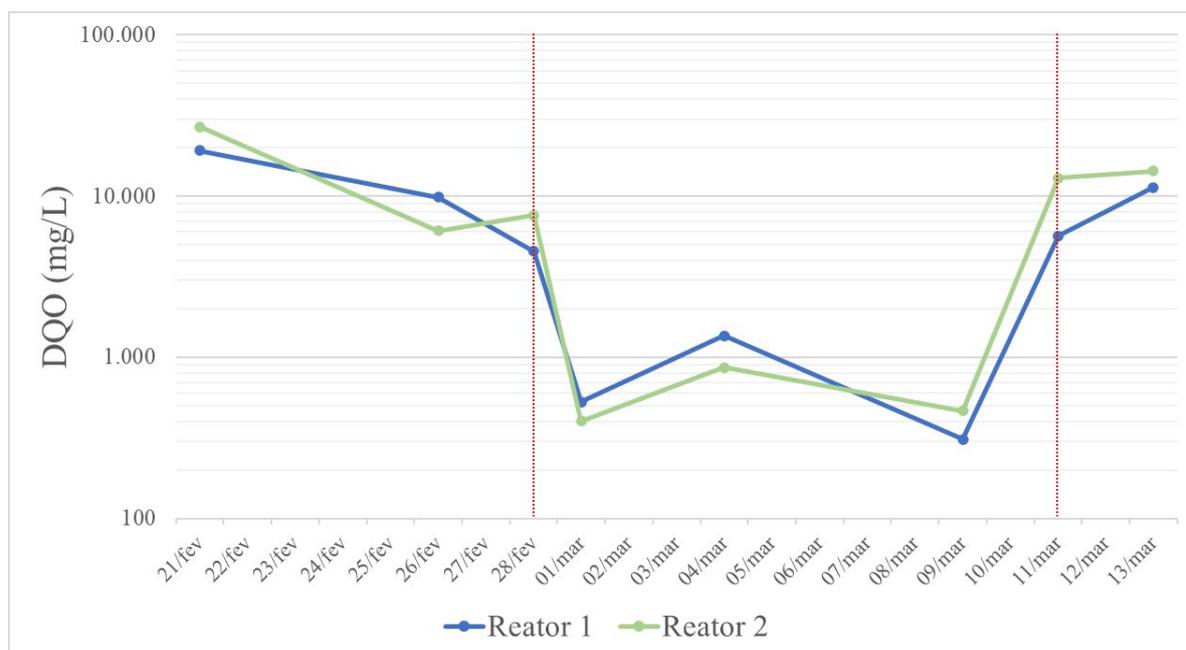


Figura 4: Variação da DQO dos biorreatores no experimento. As linhas vermelhas pontilhadas indicam um período de instabilidade na carga orgânica dos reatores, sugerindo que ainda não haviam ocorrido as suas estabilizações completas.

A concentração de SVT foi em média 57% superior no reator 2, no qual variou entre 3404 e 5036 mg/L, enquanto no reator 1 oscilou entre 2044 e 3322 mg/L (Figura 5), indicando que, pelo menos a partir de determinado ponto, uma concentração superior de biomassa não está necessariamente relacionada à maior produtividade de gás. Como ainda pode ser verificado na Figura 5, o reator com maior tempo de detenção celular apresentou entre 38,1 e 77,1% maior concentração de SVT do que o com menor.



Figura 5: Concentração de SVT nos biorreatores durante o experimento. Os valores percentuais indicam a diferença entre o Reator 2 e o Reator 1.

Como pode ser observado na Tabela 1, o reator com menor tempo de detenção celular (1) obteve volume de gás pelo menos 100 ml acima do com maior tempo de detenção (2) em 61% dos dias analisados. O oposto, ou seja,

análises nas quais o reator 1 produziu no mínimo 100 ml a menos que o reator 2, representam apenas 29% das totais. Além disso, a concentração de gás hidrogênio produzida pelo reator 1 foi pelo menos 0,7 ponto percentual superior à produzida pelo reator 2 em 85% das análises. As diferenças média e máxima foram de 2,2 e 6,6 pontos percentuais, respectivamente. Para facilitar a visualização, a Tabela 1 é também apresentada de forma gráfica na Figura 6.

Tabela 1: Produção de gás total e concentração de gás hidrogênio produzidos pelos biorreatores. As células marcadas em verde são as que diferem entre os reatores em pelo menos 100 ml (volume) ou meio ponto percentual (concentração de H₂).

Data	Hora	REATOR 1		REATOR 2	
		Volume (ml)	% H ₂	Volume (ml)	% H ₂
14/fev	09:40	3400	5,5	4000	5,7
15/fev	09:00	4300		4670	
17/fev	09:30	4760	12,1	4730	11,3
18/fev	10:45	3630		4610	
19/fev	10:55	4370		3650	
20/fev	10:14	4300	6	3940	5,3
21/fev	10:40	4750	6,5	4300	5
22/fev	11:40	4550		4750	
24/fev	09:50	4970	7,1	4770	6
26/fev	10:30	5060	6,3	4550	6
28/fev	11:00	5060		4720	
29/fev	11:00	5100	7,4	4760	5,5
02/mar	09:14	5050		4740	
03/mar	11:00	5050	8,1	5000	6
04/mar	11:00	5100		4800	
05/mar	15:00	5100	6,9	5000	6
06/mar	14:00	5100		5000	
07/mar	11:00	10200		9670	
09/mar	11:30	11580		11340	
10/mar	12:30	12240	11,6	11650	6,7
11/mar	17:00	12430		11880	
12/mar	12:00	11230	10,3	9740	5,6
13/mar	11:00	11510		11290	
14/mar	13:00	11100		12300	
16/mar	15:30	10420		10350	
17/mar	12:00	9960	8,4	10230	5,6
19/mar	10:30	11850	12,3	12490	5,7
20/mar	10:30	11330		12170	

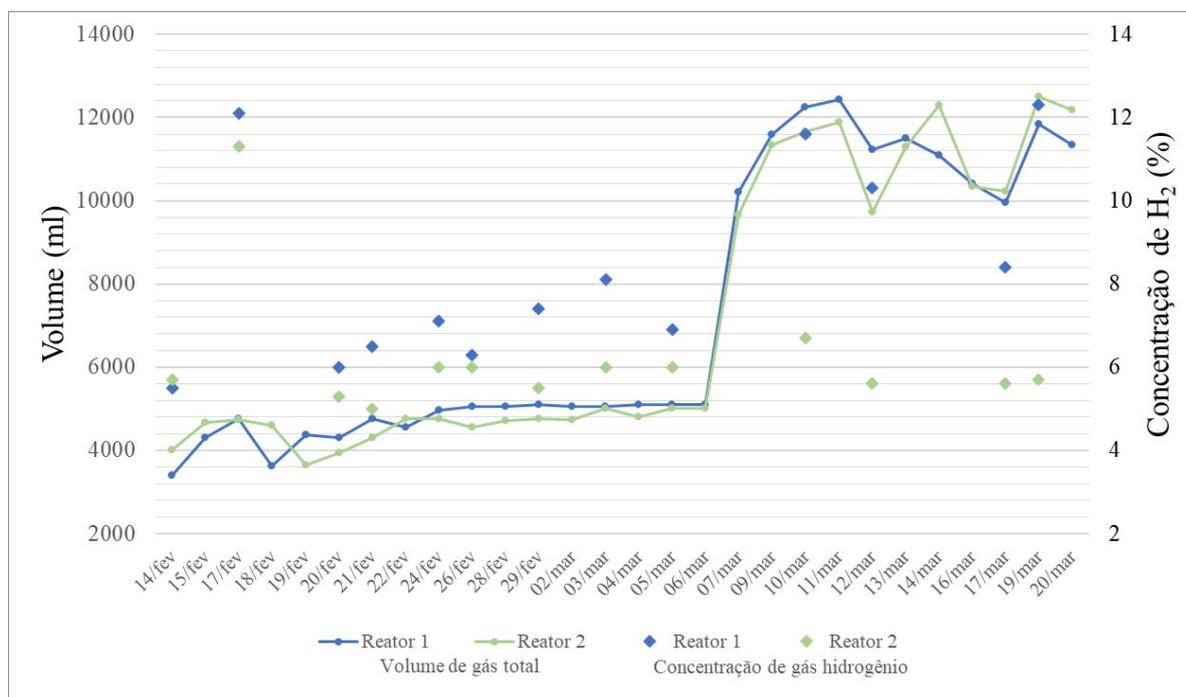


Figura 6: Volume de gás total produzido e concentração de H₂ observada nos biorreatores. A partir do dia 06 de março houve alteração no método de medição de vazão, o que explica o salto registrado.

Conforme descrito nos métodos, houve uma alteração dos frascos armazenadores de gás. A partir da segunda semana, detectou-se que o volume de gás produzido passou a exceder cinco litros em 24 horas, de forma que o excedente de gás era extravasado; assim, na terceira semana, os recipientes armazenadores de gás foram substituídos por bombonas de 20 litros, que comportam com folga o volume de gás produzido em um dia. Isto constitui uma limitação fundamental do estudo e, portanto, reforça-se a necessidade e a perspectiva de repetição do experimento, durante um intervalo de tempo maior, em duplicata e com a medição de vazão de gás apropriada desde o princípio, para que os resultados obtidos sejam validados estatisticamente.

Apesar disso, os dados sugerem que, para o cenário estudado (reator acidogênico em escala de bancada, semicontínuo e estabelecido com lodo residual do beneficiamento de soja), um expressivo aumento da produção total de gás e também da concentração de hidrogênio pode ser observado como consequência da redução do tempo de detenção celular de 3,5 dias para 2,5 dias. Isto provavelmente está associado à dinâmica de crescimento bacteriano do meio: com menor tempo de detenção dos microrganismos, há maior reciclagem celular e consequentemente taxas metabólicas mais elevadas. É possível que, com 3,5 dias de detenção celular, uma parcela significativa dos organismos encontre-se em estado letárgico, característico da fase estacionária da curva clássica de crescimento microbiano, enquanto que, em 2,5 dias, favorece-se que a tendência geral de crescimento seja deslocada, com taxas mais compatíveis às da fase logarítmica.

Cabe ressaltar que o tempo de detenção celular ótimo é variável com a função e tipo do biorreator específico, microrganismos utilizados, condições do ambiente tais como composição do meio, fonte de carboidrato, pH, temperatura, alcalinidade, entre outros. Portanto, o tempo de 2,5 dias não pode ser generalizado como ideal para condições diversas e, de fato, nem mesmo para as próprias do experimento: para isso, seria necessário testar tempos de detenção celular intermediários, estreitando o intervalo (e.g., os tempos de detenção celular de 2 e 3 dias), e mantendo um maior período de monitoramento.

As variações nos valores de DQO e SVT (Figura 4 e Figura 5) observadas indicam que, aos 35 dias, ainda não havia ocorrido estabilização completa dos reatores. Portanto, é necessário que o experimento seja reconduzido por um período maior (preferencialmente pelo menos dois meses, como proposto originalmente). Além da maior duração, planeja-se a repetição do experimento em duplicata, para que seja possível validar e conferir robustez estatística aos resultados obtidos.

Em experimentos anteriores, falhou-se em utilizar glicerol residual como fonte de carboidrato inicial pois rapidamente os biorreatores tenderam ao colapso. Portanto, uma vez estabelecido o tempo de detenção ótimo para a operação dos biorreatores e atingida a estabilização completa, tem-se como perspectiva a substituição gradual da fonte de carboidrato de sacarose para glicerol residual, aliando tratamento de efluentes e geração de produtos com potencial energético.

CONCLUSÕES

Para dimensionar adequadamente qualquer biorreator para a geração de hidrogênio, é necessário considerar o contexto e o objetivo da sua operação. Por exemplo, quando se busca a maior produção de gás possível, pode ser interessante efetuar testes sucessivos com a redução dos tempos de detenção celular. Entretanto, essa abordagem também tende a resultar numa maior carga orgânica efluente, sendo menos adequada aos cenários em que o tratamento de efluentes é o principal propósito do biorreator e a geração de biogás secundária.

Independente do objetivo, destaca-se que a maioria dos empreendimentos de produção de hidrogênio a partir de biorreatores podem se beneficiar com a condução de ensaios com variação do tempo de detenção celular. Essa estratégia permite a elaboração de curvas detalhadas com a relação entre produção de gás e eficiência de tratamento do efluente (ou resíduo) utilizado como fonte de carboidrato, norteando a operação dos biorreatores.

Em conjunto, nossos resultados sugerem que a redução do tempo de detenção celular pode ser capaz de aumentar tanto o volume total de biogás quanto a proporção de gás hidrogênio produzida em biorreatores acidogênicos. Para submeter essa hipótese à validação estatística compreensiva, pretende-se repetir o experimento em duplicata e durante pelo menos o dobro da duração (70 dias), uma vez que foi verificado que é necessário um maior período de tempo para atingir a estabilização completa dos reatores.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Agradecemos também ao Programa de Mestrado Profissional em Rede Nacional em Gestão e Regulação de Recursos Hídricos - ProfÁgua, Projeto CAPES/ANA AUXPE N°. 2717/2015, pelo apoio técnico científico aportado até o momento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. APHA, 1998. “2540 SOLIDS”, Standard Methods For the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association. DOI: [10.2105/SMWW.2882.030](https://doi.org/10.2105/SMWW.2882.030).
2. APHA, 1998. “5220 CHEMICAL OXYGEN DEMAND”, Standard Methods For the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association. DOI: [10.2105/SMWW.2882.103](https://doi.org/10.2105/SMWW.2882.103).
3. BAKONYI, P.; NEMESTÓTHY, N.; SIMON, V.; BÉLAFI-BAKÓ, K. Review on the start-up experiences of continuous fermentative hydrogen producing bioreactors. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 40, p. 806–813, 2014. DOI: [10.1016/j.rser.2014.08.014](https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.08.014).
4. CAVICCHIOLI, R.; RIPPLE, W. J.; TIMMIS, K. N.; AZAM, F.; BAKKEN, L. R.; (...); WEBSTER, N. S. Scientists’ warning to humanity: microorganisms and climate change. *Nature Reviews Microbiology*, v. 17, p. 569–586, 2019. DOI: [1038/s41579-019-0222-5](https://doi.org/10.1038/s41579-019-0222-5).
5. GEELS, F. W.; SOVACOOOL, B. K.; SCHWANEN, T.; SORRELL, S. Sociotechnical transitions for deep decarbonization. *Science*, v. 357, p. 1242–1244, 2017. DOI: [10.1126/science.aao3760](https://doi.org/10.1126/science.aao3760).
6. JUNG, K. W.; KIM, D. H.; KIM, S. H.; SHIN, H. S. Bioreactor design for continuous dark fermentative hydrogen production. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 8612–8620, 2011. DOI: [10.1016/j.biortech.2011.03.056](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.03.056).
7. KIM, I. S.; HWANG, M. H.; JANG, N. J.; HYUN, S. H.; LEE, S. T. Effect of low pH on the activity of hydrogen utilizing methanogen in bio-hydrogen process. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 29, p. 1133–1140, 2004. DOI: [10.1016/j.ijhydene.2003.08.017](https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2003.08.017).
8. LIN, C. Y.; LAY, C. H. A nutrient formulation for fermentative hydrogen production using anaerobic sewage sludge microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 30, p. 285–292, 2005. DOI: [10.1016/j.ijhydene.2004.03.002](https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2004.03.002).

9. MORIMOTO, M.; ATSUKO, M.; ATIF, A. A. Y.; NGAN, M. A.; FAKHRU'L-RAZI, A.; IYUKE, S. E.; BAKIR, A. M. Biological production of hydrogen from glucose by natural anaerobic microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 29, p. 709–713, 2004. DOI: [10.1016/j.ijhydene.2003.09.009](https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2003.09.009).
10. NOBLECOURT, A.; GWENDOLINE, C.; LARROCHE, C.; SANTA-CATALINA, G.; TRABLY, E.; FONTANILLE, P. High hydrogen production rate in a submerged membrane anaerobic bioreactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 42, p. 24656–24666, 2017. DOI: [10.1016/j.ijhydene.2017.08.037](https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.08.037).
11. PERNA, V.; CASTELLÓ, E.; WENZEL, J.; ZAMPOL, C.; FONTES LIMA, D. M.; BORZACCONI, L.; VARESCHE, M. B.; ZAIAT, M.; ETCHEBEHERE, C. Hydrogen production in an upflow anaerobic packed bed reactor used to treat cheese whey. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 38, p. 54–62, 2013. DOI: [10.1016/j.ijhydene.2012.10.022](https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.10.022).
12. ROSSI, D. M.; COSTA, J. B.; SOUZA, E. A.; PERALBA, M. C. R.; SAMIOS, D.; AYUB, M. A. Z. Comparison of different pretreatment methods for hydrogen production using environmental microbial consortia on residual glycerol from biodiesel. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 36, p. 4814–4819, 2011. DOI: [10.1016/j.ijhydene.2011.01.005](https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.01.005).
13. TURNER, J. A. Sustainable hydrogen production. *Science*, v. 305, p. 972–974, 2004. DOI: [10.1126/science.1103197](https://doi.org/10.1126/science.1103197).
14. WANG, H.; XU, J.; SHENG, L.; LIU, X.; LU, Y.; LI, W. A review on bio-hydrogen production technology. *International Journal of Energy Research*, v. 42, p. 3442–3453, 2018. DOI: [10.1002/er.4044](https://doi.org/10.1002/er.4044).
15. WANG, J.; WAN, W. Factors influencing fermentative hydrogen production: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 34, p. 799–811, 2009. DOI: [10.1016/j.ijhydene.2008.11.015](https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.11.015).