

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a),
o texto completo desta dissertação será disponibilizado
somente a partir de 19/02/2021.

MODELAGEM MATEMÁTICA E OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOHIDROGÊNIO VIA FERMENTAÇÃO ESCURA

Felipe Teles Barbosa

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” para a obtenção do título de Mestre em Biometria.

BOTUCATU, SP - BRASIL
FEVEREIRO DE 2019

**MODELAGEM MATEMÁTICA E OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO
DE BIOHIDROGÊNIO VIA FERMENTAÇÃO ESCURA**

Felipe Teles Barbosa

Orientadora: **Prof^a. Dra. Helenice de Oliveira Florentino Silva**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” para a obtenção do título de Mestre em Biometria.

**BOTUCATU, SP - BRASIL
FEVEREIRO DE 2019**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Barbosa, Felipe Teles.

Modelagem matemática e otimização da produção de biohidrogênio via fermentação escura / Felipe Teles Barbosa. - Botucatu, 2019

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Helenice de Oliveira Florentino Silva
Capes: 30000006

1. Energia renovável. 2. Fermentação. 3. Modelos matemáticos. 4. Tecnologia de bioprocessos. 5. Programação dinâmica.

Palavras-chave: Biohidrogênio; Energia Renovável; Fermentação Escura; Metaheurísticas; Modelagem Matemática.

Agradecimentos

À Professora Doutora Helenice de Oliveira Florentino Silva, minha querida orientadora, pela imensurável dedicação e paciência, além de sua sabedoria e contribuições para meu crescimento.

À Professora Doutora Marianna Cerasuolo, do *Department of Mathematics* da *University of Portsmouth*, no Reino Unido, pela colaboração neste trabalho. Tenho imensa gratidão por ter me convidado a realizar parte da pesquisa em intercâmbio, mesmo que por curto tempo, o que me agregou diversas experiências profissionais e pessoais.

Aos meus pais, Adair e Kilza, e minha avó, Onilda. Não há amor maior do que aquele que sinto por vocês e saibam que cada linha desta dissertação é um símbolo de vitória nosso!

Aos meus amigos de longa data, Gabriela, Nádia e Lucas Gonçalves. A distância pode ter nos separado um pouco, mas os desabafos e alegrias continuam os mesmos.

Às amigadas que cultivei aqui, em especial, Aruane, Daniel, Eduardo, Fátima, Jacqueline e Lucas. Saibam que estão no meu coração por toda a vida.

Ao Grupo de Otimização, em especial à Camila de Lima, pelo suporte computacional e desabafos durante os cafés. Suas ideias engrandeceram este trabalho e espero que colhamos vários frutos na forma de artigos!

À Livia Paschoalino, por todos os momentos compartilhados. Sua amizade é para mim uma dádiva e um porto seguro e você é, definitivamente, minha família em Botucatu.

À Marta Helena, por ter me incentivado, desde a graduação, a seguir os passos

da pesquisa e por ter colhido tantos frutos comigo. Obrigado pelos caminhos que me ajudou a trilhar.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Sumário

	Página
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	ix
RESUMO	x
SUMMARY	xi
1 INTRODUÇÃO	1
2 FERMENTAÇÃO ESCURA	3
2.1 Matriz energética e sustentabilidade	3
2.2 Biohidrogênio e seu potencial como fonte de energia	4
2.3 Condução em batelada	6
2.4 Mosto e inóculo	8
2.5 Cinética de fermentação	9
2.5.1 Velocidade de reação	9
2.5.2 Crescimento microbiano	13
2.5.3 Influência de parâmetros físico-químicos em μ	15
3 MODELO MATEMÁTICO	19
3.1 Modelagem Matemática	19
3.2 Propriedades do modelo	23
3.3 Estabilidade das soluções	29

	vi
3.3.1 Equilíbrio na ausência total de substratos	31
3.3.2 Demais pontos de equilíbrio	38
4 OTIMIZAÇÃO	40
4.1 Algoritmo de Busca em Vizinhança Variável	42
4.2 Algoritmo Memético	44
5 SIMULAÇÕES COMPUTACIONAIS	48
5.1 Simulação computacional do Sistema Dinâmico (31)	48
5.2 Resultados computacionais para o Problema de Otimização (39)-(53) . .	55
5.2.1 VNS	56
5.2.2 Algoritmo Memético	58
5.3 Simulação numérica e comparação dos resultados do VNS e do MA . . .	59
6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
APÊNDICES	75

Lista de Figuras

		Página
1	Esquema de um biorreator em operação.	7
2	Perfis de concentração de substrato (S), produto (P) e microrganismos (X) em uma fermentação idealizada.	10
3	Curva de crescimento microbiano. Simulação dos dados de Schmidell et al. (2001),p.116.	13
4	Cinética de crescimento de Monod.	16
5	Diagrama esquemático das reações bioquímicas que ocorrem na FE considerando a rota do acetato.	21
6	Consumo de polímeros industriais em 1000 h de FE.	50
7	Geração e consumo de glicose em 1000 h de FE.	51
8	Geração e consumo de propionato em 1000 h de FE.	51
9	Geração de acetato em 1000 h de FE.	52
10	Geração de dióxido de carbono em 1000 h de FE.	52
11	Geração de biohidrogênio em 1000 h de FE.	53
12	Crescimento de bactérias hidrolíticas em 1000 h de FE.	53
13	Crescimento de bactérias acidogênicas em 1000 h de FE.	54
14	Crescimento de bactérias acetogênicas em 1000 h de FE.	54
15	Convergência da função objetivo ao longo de 100 iterações no VNS na primeira repetição.	57
16	Perfil da função objetivo ao longo de 100 iterações no MA na primeira repetição.	59

17	Consumo de S_1 ao longo de 1000 h de fermentação.	61
18	Geração e consumo de S_2 ao longo de 1000 h de fermentação.	62
19	Geração e consumo de S_3 ao longo de 1000 h de fermentação com v_{VNS}^*	62
20	Geração e consumo de S_3 ao longo de 1000 h de fermentação com v_{MA}^*	63
21	Geração de P_1 ao longo de 1000 h de fermentação.	63
22	Geração de P_2 ao longo de 1000 h de fermentação.	64
23	Geração de P_3 ao longo de 1000 h de fermentação.	64
24	Crescimento de X_1 ao longo de 1000 h de fermentação.	65
25	Crescimento de X_2 ao longo de 1000 h de fermentação.	65
26	Crescimento de X_3 ao longo de 1000 h de fermentação.	66

Lista de Tabelas

	Página
1	Diferentes formulações para μ 17
2	Condições iniciais, em $g L^{-1}$ 48
3	Valores dos parâmetros do modelo. 49
4	Médias dos resultados do VNS em três repetições. 56
5	Médias dos resultados do MA em três repetições. 58

MODELAGEM MATEMÁTICA E OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOHIDROGÊNIO VIA FERMENTAÇÃO ESCURA

Autor: FELIPE TELES BARBOSA

Orientadora: Prof^a. Dra. HELENICE DE OLIVEIRA FLORENTINO SILVA

RESUMO

A escassez de combustíveis fósseis e a demanda por fontes alternativas de energia renovável e limpa são impulsionadores para o desenvolvimento de biocombustíveis, tais como o biohidrogênio. Este gás é conhecido por seu alto valor calorífico, extrema leveza e baixa densidade, além de, ao ser queimado, produzir apenas vapor d'água e calor. Dentre os modos de produção, destaca-se a fermentação escura, a qual gera biohidrogênio e subprodutos através do tratamento microbiológico de resíduos agroindustriais. O objetivo deste trabalho foi modelar matematicamente este bioprocessos, estudar suas propriedades à luz da teoria de estabilidade, além de propor um modelo de otimização que determine uma combinação das concentrações de substrato e bactérias, tais que maximizem o rendimento da produção de biohidrogênio. Foram propostas duas heurísticas para a resolução do modelo, Algoritmo de Busca em Vizinhança Variável e Algoritmo Memético. Os resultados das simulações numéricas mostraram que o modelo obtido corrobora com a dinâmica bioquímica e microbiológica do bioprocessos.

Palavras-chave: Biohidrogênio, Fermentação Escura, Modelagem Matemática, Energia renovável, Metaheurísticas.

MATHEMATICAL MODELING AND OPTMIZATION OF BIOHYDROGEN PRODUCTION BY DARK FERMENTATION

Author: FELIPE TELES BARBOSA

Adviser: Prof^a. Dra. HELENICE DE OLIVEIRA FLORENTINO SILVA

SUMMARY

The lack of fossil fuels and the demand of alternative, renewable and clean energy sources promote development in biofuels, as biohydrogen. It is known by its high heat, extreme lightness and low density and also when it burns, the products are only steam and energy. Among the productions ways, we highlight dark fermentation, which generates biohydrogen and subproducts through organic waste microbiological treatment. The aim of this work was to mathematical model this bioprocess, to study its properties via stability analysis, besides to propose a optmization model to determine a combination of substract and bacteria concentrations, in order to maximize biohydrogen production yield. To solve the mathematical model have been proposed two heuristics: Variable Neighbor Search Algorithm and Memetic Algorithm. Numeric simulations showed that the mathematical model corroborates with the bioprocess microbial and biochemical dynamics.

Key-words: Biohydrogen, Dark Fermentation, Mathematical Modelling, Renewable Energy, Metaheuristics.

1 INTRODUÇÃO

A escassez de combustíveis fósseis e as mudanças climáticas globais são impulsionadores do desenvolvimento de novos combustíveis, como bioetanol, metano e biohidrogênio (Chong et al., 2009). Dentre todos os biocombustíveis, o biohidrogênio é o único que não se encontra quimicamente ligado aos átomos de carbono, conferindo a ele alto poder calorífico (Khan et al., 2017).

Durante sua combustão, apenas vapor d'água e calor são liberados no meio ambiente, o que permite classificar este gás como uma fonte renovável e limpa de energia. Além disto, a utilização deste biogás é vantajosa por ele ser altamente compressível e de baixa densidade, características desejáveis para armazenamento e transporte, e possuir calor de combustão muito maior que fontes tradicionais de energia, como a gasolina e o etanol (Omar et al., 2014; Khan et al., 2017; Singh et al., 2013).

O hidrogênio produzido por vias biológicas é denominado biohidrogênio e este pode ser gerado na presença ou ausência de fontes luminosas (Romão et al., 2014). No caso da fermentação escura, a matéria orgânica inserida no biorreator é convertida em ácidos orgânicos, biohidrogênio e outros subprodutos, na ausência de fonte luminosa. Isto confere ao bioprocesso baixo custo operacional e permite a geração de biogás através do tratamento de resíduos orgânicos (CHU et al., 2013).

Um dos grandes desafios atuais na produção de biohidrogênio é tornar a fermentação escura comercializável, pois grande parte do volume deste gás ainda é produzido em laboratórios de pesquisa. Para isto é preciso automatizar, controlar e otimizar o processo, de forma que a conversão de resíduos em fontes limpas de energia seja eficiente.

O objetivo deste trabalho é modelar matematicamente o conjunto de reações que resultam na geração de biohidrogênio e, investigando características do bioprocesso, inferir propriedades que auxiliem na automação, controle e otimização da fermentação escura.

Este trabalho está organizado em cinco capítulos. No Capítulo 2, descreve-se a fermentação escura, ressaltando as principais características de um bioprocessos; no Capítulo 3, propomos um modelo matemático para descrever a fermentação escura e suas propriedades são analisadas; no Capítulo 4, propomos um modelo de otimização para o problema e o resolvemos com duas metaheurísticas (Algoritmo de Busca em Vizinhança Variável e Algoritmo Memético); no Capítulo 5 são apresentadas algumas simulações computacionais e no Capítulo 6 apresentam-se as conclusões do trabalho e perspectivas futuras.

2 FERMENTAÇÃO ESCURA

O biohidrogênio é uma fonte de energia alternativa àquelas conhecidas e de ampla aplicabilidade. Sua produção pode ser feita de forma sustentável e pode ser associada ao tratamento de resíduos orgânicos de origem agroindustrial. Este capítulo é dedicado a descrever os processos de obtenção bioquímica de hidrogênio, via fermentação escura, e apresentar conceitos de cinética de reações químicas para embasar a modelagem deste bioprocessos.

2.1 Matriz energética e sustentabilidade

Combustíveis como petróleo e carvão são amplamente utilizados desde a Revolução Industrial e, juntamente com o gás natural, estima-se que, na atualidade, 86,4% de toda energia consumida mundialmente provenha destas três fontes (Leite, 2010; Abas et al., 2015; Dürre & Richard, 2011). Em 1973 a Organização dos Países Exportadores de Petróleo (OPEC) quadruplicou o valor de seu barril, devido a motivos políticos decorrentes da Guerra de Yom Kippur entre Israel, Egito e Síria, impossibilitando a aquisição deste produto (Heubaum & Biermann, 2015). A fim de garantir independência energética, diversos países começaram a busca por recursos não esgotáveis e renováveis, destacando as energias eólica, solar e da biomassa (Abas et al., 2015; Omar et al., 2014).

Além da esgotabilidade dos recursos fósseis, outro aspecto relevante para a inovação no setor energético foi a demanda por combustíveis que gerassem menos impactos ambientais (Chong et al., 2009; Omar et al., 2014). A combustão do petróleo e seus derivados produz uma gama de substâncias nocivas à atmosfera, como óxidos

de carbono, nitrogênio e enxofre, que são os principais responsáveis pela destruição da camada de ozônio e formação de chuvas ácidas (Moreira et al., 2017; Leite, 2010).

Ao contrário das fontes energéticas baseadas em petróleo, que emitem gases estufa, a biomassa, ao ser queimada, não produz dióxido de carbono (CO_2) adicional ao meio ambiente, isto é, todo CO_2 gerado é contabilizado no balanço material do ecossistema, porém incorporado nos tecidos vivos de plantas e animais (Twidell & Weir, 2006). Assim, derivados de organismos vivos, como resíduos industriais de processamento vegetal e animal, podem ser convertidos em biocombustíveis através de processos fermentativos, como a biodigestão anaeróbica (BA) e a fermentação escura (FE) (Dong et al., 2009; Romão et al., 2014; Moreira et al., 2017).

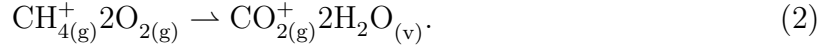
A BA e a FE são processos economicamente vantajosos por utilizar resíduos orgânicos industriais como substrato para a geração de energia, que pode ser empregada no aquecimento de caldeiras, fornos e fogões, na geração de energia elétrica e no resfriamento de geladeiras, entre outras aplicações (Abas et al., 2015; Balmant, 2009; Moreira et al., 2017). O tratamento anaeróbico dos efluentes garante, além de metano (CH_4) e hidrogênio (H_2), a redução dos impactos ambientais causados pelo descarte incorreto de tais resíduos em corpos d'água, como a eutrofização¹ (Ansari et al., 2011; Ziemiński & Frąc, 2012; Manyi-Loh et al., 2013; Romão et al., 2014).

2.2 Biohidrogênio e seu potencial como fonte de energia

O hidrogênio é o elemento químico mais abundante no universo e, atualmente, é o único combustível conhecido que não se encontra quimicamente ligado a átomos de carbono. Além disso, é uma substância incolor, inodora, insípida e não tóxica que, ao entrar em combustão, libera apenas vapor de água, ao contrário dos combustíveis baseados em carbono, como os fósseis (Chong et al., 2009; Singh et al., 2013). As Equações (1) e (2) representam, respectivamente, a combustão do hidrogênio e do metano. Em (1), é observada a combustão do gás hidrogênio (reação

¹Processo no qual um corpo d'água adquire níveis altos de matéria orgânica, podendo acarretar na diminuição do pH do meio, diminuição da oxigenação e extinção de espécies aquáticas endêmicas.

com oxigênio), gerando apenas vapor d'água, o que permite afirmar que esta é uma fonte limpa de energia. Já na Equação (2), as moléculas resultantes da combustão de um combustível baseado em carbono são o dióxido de carbono e o vapor d'água:



Além de suas baixa densidade e alta compressibilidade, que são características importantes para seu estoque e transporte, H_2 possui o maior conteúdo energético por massa (143 kJ g^{-1}) entre qualquer combustível, por exemplo, a gasolina, $46,4 \text{ kJ g}^{-1}$, e o metano, $55,6 \text{ kJ g}^{-1}$ (Khan et al., 2017).

Segundo Romão et al. (2014), H_2 obtido a partir de bioprocessos é chamado de biohidrogênio (*bioH₂*). Sua produção pela fermentação escura é uma alternativa para a geração de energia limpa e renovável devido à capacidade deste processo ser realizado em condições de temperatura e pressão ambientais normais, uma vez que os agentes conversores de matéria orgânica em *bioH₂* são bactérias. Outra vantagem da FE é que diversos tipos de matéria prima orgânica podem ser utilizados, incluindo águas residuárias e efluentes industriais, conferindo grande importância deste bioprocessos no tratamento de resíduos Moreira et al. (2017).

Nath & Das (2004) definem FE como um fenômeno ubíquo sobre condições anóxicas ou anaeróbicas, onde bactérias degradam matéria orgânica por oxidação em diversas biorreações. Sua grande vantagem é a ausência de luz, isto é, toda a fermentação ocorre sem a necessidade de iluminação por uma fonte externa (Trchounian et al., 2017).

Palomo-Briones et al. (2017) definem FE como a oxidação parcial de substratos orgânicos sem aceptores de elétrons (e^-) externos. Uma molécula libera e^- quando é oxidada e estas partículas são aceptadas por estruturas químicas como o oxigênio, em reações aeróbicas, e prótons (H^+) ou outras substâncias, nos casos anaeróbicos. O objetivo desta reação, exemplificada pela Equação (3), é de catalizar

a redução de H^+ a hidrogênio molecular através de hidrogenases ou nitrogenases, a fim de garantir a homeostase do sistema, ou seja,



O biohidrogênio pode ser obtido por intermédio de diferentes vias metabólicas sob condições anaeróbicas, devido às diversidades de matéria prima e de espécies de bactéria envolvidas na biorreação. Neste trabalho será desenvolvido um modelo matemático baseado na via metabólica do acetato para a geração de *bioH₂*. Entretanto, é necessário apresentar, primeiramente, alguns conceitos sobre a cinética de fermentação e a operação do biorreator, como: condução em batelada, inóculo e mosto.

2.3 Condução em batelada

Segundo Shijie (2013), reator pode ser definido como uma unidade (ou dorna) em que reações ocorrem. Analogamente, biorreatores são unidades operacionais em que reações bioquímicas ocorrem e eles podem ser classificados de acordo com o modo de condução (batelada, batelada alimentada ou contínuo) ou a dependência de suas variáveis em relação ao tempo (estacionário ou transiente).

A Figura 1 representa um biorreator de modo de condução genérico, em que Q_0 e Q representam as vazões volumétricas de entrada e saída na unidade operacional, nesta ordem, e S_0 a concentração inicial de substrato.

Vazão volumétrica (Q) é definida como a quantidade de volume (V) que atravessa uma secção transversal de um conduto num intervalo de tempo (Δt) durante o processo, isto é,

$$Q = \frac{V}{\Delta t}. \quad (4)$$

Antes do processo fermentativo, a dorna é abastecida com o mosto (ou meio de cultura, cuja composição garante minerais, vitaminas e complementos nutritivos para o crescimento bacteriano). O substrato inicial pode ser adicionado diretamente ao mosto ou ser carregado para dentro do reator através de uma vazão não nula

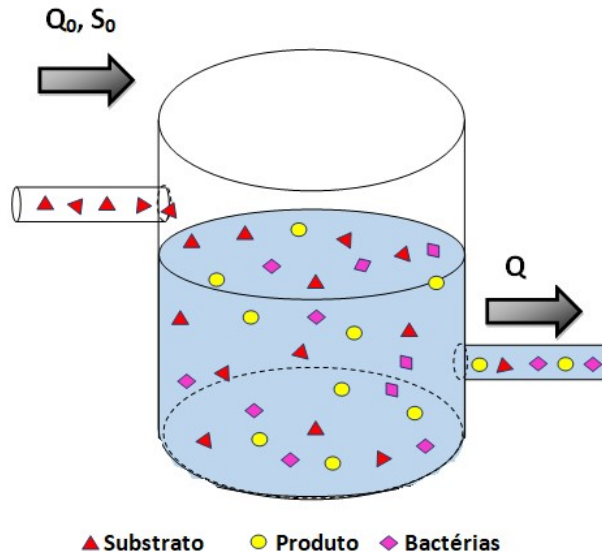


Figura 1: Esquema de um biorreator em operação.

Fonte: Adaptado de Bernard (2002).

durante a fermentação. Na condução em batelada, a vazão de entrada é nula, $Q_0=0$ $\text{m}^3 \text{s}^{-1}$, ou seja, após o início da fermentação, nada mais adentra no reator Schmidell et al. (2001).

Quanto à vazão de saída, ela é responsável pela retirada dos produtos e resíduos do fermentador durante a reação. Os efluentes podem abandonar o volume reacional de duas formas: continuamente enquanto ocorre o bioprocessamento ou apenas quando ele for finalizado, definindo assim se Q é nulo ou não Schmidell et al. (2001).

Diz-se que um biorreator opera em batelada quando não há entrada nem saída de elementos materiais durante o processo, ou seja, $Q_0 = Q = 0$. Este modo de condução permite que as reações ocorram em um sistema fechado, evitando a contaminação com substâncias externas ao processo, isto é, após esterilizado, o biorreator se mantém asséptico (Schmidell et al., 2001).

Intrinsecamente, a condução em batelada implica que os elementos do volume reacional estejam sob um estado transiente, uma vez que neste regime a concen-

tração química das espécies varia com o tempo. Por exemplo, no início da reação a concentração dos produtos é zero e dos substratos é máxima, todavia, no fim, a concentração de substratos tende ao zero, enquanto que a de produtos aumenta, devido ao consumo do primeiro elemento pelo inóculo.

2.4 Mosto e inóculo

A concentração inicial de microrganismos em um volume de suspensão que garante o início de um processo fermentativo economicamente viável é denominada inóculo, pé de cuba ou pé de fermentação (Bastos, 2016). O inóculo pode ser caracterizado por uma população (cultura pura) ou comunidade de microrganismos (cultura mista ou consórcio), isto é, uma ou mais espécies podem formar a cultura microbiana.

Assim como os demais seres vivos, os microrganismos necessitam de nutrientes para que possam realizar suas atividades metabólicas basais, se multiplicar e garantir a homeostase. Os nutrientes necessários para tal desenvolvimento, como carboidratos, proteínas, lipídios, sais minerais e vitaminas, constituem o meio de cultura ou mosto, sendo este último termo mais utilizado para processos bioquímicos industriais (Borzani et al., 2001).

A composição do mosto varia consoante à necessidade do microrganismo que será cultivado. Em geral, ele é a mistura do substrato de interesse com suplementos nutricionais, caso seja necessário. Para produzir *bioH₂*, variados tipos de substrato orgânico podem ser incorporados ao meio de cultura (Guo et al., 2010). Isto imprime à fermentação escura um importante papel ambiental, que é a degradação de resíduos industriais.

Especificamente, para a produção desta fonte renovável e limpa de energia, é necessário que o consórcio seja livre de bactérias hidrogenotróficas², como as metanogênicas (Khan et al., 2017). Logo, para satisfazer esta condição, diversos métodos de esterilização do mosto podem ser empregados, sendo mais comum os processos

²Bactérias consumidoras de hidrogênio. Geralmente o consomem para a produção de metano.

térmicos de inativação.

Segundo Romão et al. (2014) e Zhang & Shen (2006), além de garantir a ausência de consumidores de H_2 , é imprescindível que no mosto haja sais de ferro (Fe), como o sulfato ferroso ($FeSO_4$) e cloreto de ferro ($FeCl_2$), já que as enzimas ferredoxina e hidrogenase, as quais reduzem H^+ em $bioH_2$, são Fe-dependentes. Além disto, a presença de Fe no mosto promove maior rendimento na produção de $bioH_2$ e previne a perda das características do consórcio microbiano (Moreira et al., 2017).

A fim de estudar o perfil da concentração de microrganismos ao longo do tempo, o que influencia diretamente nas quantidades de substrato e produto no interior da dorna, são apresentados a seguir alguns conceitos sobre a cinética de fermentação.

2.5 Cinética de fermentação

Nesta seção serão abordados conceitos de cinética de reações químicas, especificamente de processos fermentativos, como velocidade instantânea e rendimento de uma reação, modelos de crescimento microbiano e influência de variáveis físico-químicas na velocidade específica de crescimento.

2.5.1 Velocidade de reação

Os microrganismos são inoculados no biorreator com uma concentração inicial X_0 . À medida que consomem o substrato, de concentração inicial S_0 , geram produtos (P) de interesse econômico e promovem o aumento do número de células no meio (Bastos, 2016).

No instante t^* , as inclinações das retas tangentes A , B e C das curvas $S(t)$, $P(t)$ e $X(t)$ apresentadas na Figura 2 definem as velocidade instantâneas de consumo de substrato (r_S), formação de produtos (r_P) e crescimento celular (r_X), cujas unidades são expressas em múltiplos de massa por volume por tempo (por exemplo,

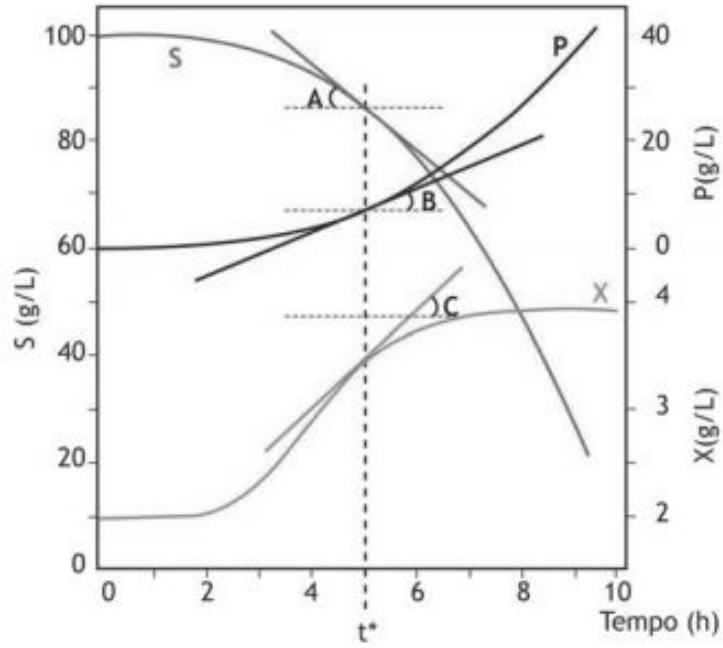


Figura 2: Perfis de concentração de substrato (S), produto (P) e microrganismos (X) em uma fermentação idealizada.

Fonte: Bastos (2016).

$\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$):

$$r_S = -\frac{dS}{dt}, \quad (5)$$

$$r_P = \frac{dP}{dt}, \quad (6)$$

$$r_X = \frac{dX}{dt}. \quad (7)$$

De acordo com Schmidell et al. (2001), uma vez que a concentração de microrganismos aumenta durante a fermentação e, conseqüentemente, a concentração do complexo enzimático catalisador de S em P também se eleva, é mais coerente estudar as velocidades instantâneas com relação à X .

Por conseguinte definem-se as velocidades específicas de consumo de substrato (μ_S), formação de produtos (μ_P) e crescimento celular (μ_X), cujas unidades são

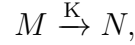
múltiplas de 1/tempo (por exemplo, h^{-1}):

$$\mu_S = \frac{1}{X} r_S = -\frac{1}{X} \frac{dS}{dt}, \quad (8)$$

$$\mu_P = \frac{1}{X} r_P = \frac{1}{X} \frac{dP}{dt}, \quad (9)$$

$$\mu_X = \frac{1}{X} r_X = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt}. \quad (10)$$

Além das velocidades específicas, outro indicador de produção é o coeficiente de rendimento de uma reação. Bastos (2016) define coeficiente de rendimento como a razão entre as quantidades de material consumido e gerado em uma reação. Seja uma reação química genérica de transformação do substrato M no produto N na presença de um catalisador K :



o coeficiente de rendimento de substrato em produto é definido por

$$y_{N/M} = \frac{N - N_0}{M_0 - M}$$

e o coeficiente de rendimento de substrato em catalisador é

$$y_{K/M} = \frac{K - K_0}{M_0 - M}.$$

Analogamente, quando este catalisador é um microrganismo, definem-se os rendimentos de substrato em produto e em células pelas Equações (11) e (12), respectivamente.

$$y_{P/S} = \frac{P - P_0}{S_0 - S} = \frac{\Delta P}{-\Delta S} \quad (11)$$

e

$$y_{X/S} = \frac{X - X_0}{S_0 - S} = \frac{\Delta X}{-\Delta S}, \quad (12)$$

que podem ser reescritas como:

$$y_{P/S} = \frac{\frac{\Delta P}{\Delta t}}{\frac{-\Delta S}{\Delta t}}$$

e

$$y_{X/S} = \frac{\frac{\Delta X}{\Delta t}}{\frac{-\Delta S}{\Delta t}}.$$

Fazendo $\Delta t \rightarrow 0$, tem-se que

$$y_{P/S} = \lim_{\Delta t \rightarrow 0} \frac{\frac{\Delta P}{\Delta t}}{\frac{-\Delta S}{\Delta t}} = \frac{\frac{dP}{dt}}{\frac{-dS}{dt}} = \frac{r_P}{r_S} = \frac{\mu_P}{\mu_S}$$

e

$$y_{X/S} = \lim_{\Delta t \rightarrow 0} \frac{\frac{\Delta X}{\Delta t}}{\frac{-\Delta S}{\Delta t}} = \frac{\frac{dX}{dt}}{\frac{-dS}{dt}} = \frac{r_X}{r_S} = \frac{\mu_X}{\mu_S}.$$

Consequentemente, as velocidades específicas μ_S e μ_P podem ser escritas em função do crescimento celular μ_X :

$$y_{X/S} = \frac{\mu_X}{\mu_S} \implies \mu_S = \frac{1}{y_{X/S}} \mu_X$$

e

$$y_{P/S} = \frac{\mu_P}{\mu_S} \implies \mu_P = y_{P/S} \mu_S = \frac{y_{P/S}}{y_{X/S}} \mu_X.$$

$$\text{Fazendo } \frac{1}{y_{X/S}} = Y_{X/S} \text{ e } \frac{y_{P/S}}{y_{X/S}} = Y_{X/P},$$

$$\mu_S = Y_{X/S} \mu_X \tag{13}$$

e

$$\mu_P = Y_{X/P} \mu_X. \tag{14}$$

Portanto, conhecendo-se a estequiometria das reações químicas de interesse e a velocidade de crescimento dos microrganismos, é possível determinar as velocidades de consumo de substrato e formação de produto (Schmidell et al., 2001; Bastos, 2016).

2.5.2 Crescimento microbiano

A velocidade de crescimento celular não é constante dentro do biorreator. Durante a fermentação são observadas sete fases para a variação do número de células: lag (I), transição (II), log (III), linear (IV), desaceleração (V), estacionária (VI) e lise (VII), as quais estão ilustradas na Figura 3.

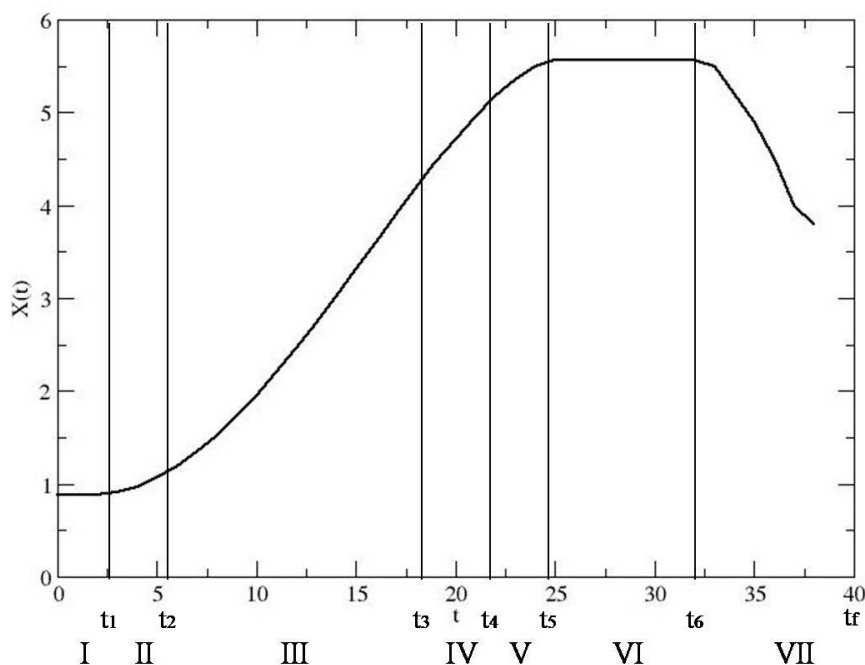


Figura 3: Curva de crescimento microbiano. Simulação dos dados de Schmidell et al. (2001), p.116.

A fase lag ou de latência é caracterizada pela inoculação dos microrganismos no mosto e sua duração varia de acordo com o estado fisiológico, idade e composição do inóculo. Bastos (2016) afirma que neste período não há reprodução, em razão da necessidade do inóculo se adaptar às condições do mosto, por isso $X(t) = X_0, \forall t \in (0, t_1)$. Monod (1949) relata que os microrganismos, ao serem inoculados, podem entrar em contato com alguma substância do mosto que não estava presente no meio

de cultura e, a fim de promover adaptação ao novo ambiente, um novo complexo enzimático é desenvolvido por eles, o que pode levar de minutos a dias.

Para Schmidell et al. (2001) a fase de transição é o intervalo de tempo (t_1, t_2) em que a população de bactérias já está adaptada ao meio e inicia o ciclo reprodutivo, mesmo que a uma velocidade baixa e oscilante. É importante salientar que somente no fim deste período toda a população microbiana começará a se dividir regularmente à mesma velocidade.

Monod (1949) define a fase log como aquela em que os microrganismos se reproduzem a uma taxa exponencial. No intervalo de tempo (t_2, t_3) , $\mu_X = \mu_{max}$, constante, e a velocidade de crescimento é diretamente proporcional à concentração celular, ou seja,

$$\begin{aligned} \frac{dX}{dt} = \mu_{max}X &\implies \int_{X_0}^X \frac{1}{X} dX = \int_{t_2}^{t_3} \mu_{max} dt \implies \ln \left(\frac{X}{X_0} \right) = \mu_{max}(t_3 - t_2) \\ &\implies X = X_0 \exp \{ \mu_{max}(t_3 - t_2) \}, \end{aligned} \quad (15)$$

que, segundo Schmidell et al. (2001), considerando X_C como a concentração de bactérias atingida no tempo crítico t_C , isto é, a concentração atingida na fase de maior velocidade de crescimento, da Equação (15) tem-se:

$$X_C = X_0 \exp \{ \mu_{max}(t - t_2) \}, \forall t \in (t_2, t_3).$$

No caso de microrganismos não filamentosos, após o crescimento exponencial de X , a velocidade de duplicação é constante e linear, o que justifica o nome da fase IV:

$$\begin{aligned} \frac{dX}{dt} = r_X &\implies \int_{X_C}^X dX = r_X \int_{t_3}^{t_4} dt \implies X - X_C = r_X(t_4 - t_3) \\ &\implies X(t) = X_C + r_X(t - t_3), \forall t \in (t_3, t_4). \end{aligned}$$

Em decorrência do consumo dos nutrientes do mosto e da produção de metabólitos inibidores, a velocidade de crescimento começa a se reduzir. Este processo corresponde à fase de desaceleração, entre os tempos t_4 e t_5 .

No instante t_5 uma série de modificações bioquímicas ocorre no espaço intracelular dos agentes fermentadores, reduzindo suas velocidades de reprodução ao zero.

No intervalo de tempo (t_5, t_6) , o número de indivíduos gerados é equivalente à taxa de mortalidade da população, tornando $X(t)$ constante (Schmidell et al., 2001).

Salienta-se que no período estacionário a concentração de microrganismos é máxima e permanece assim até a próxima fase (lise), onde a taxa de mortalidade supera a geração de novos indivíduos (Bastos, 2016). A partir de t_6 , os microrganismos sofrem autólise ou rompimento da membrana plasmática, implicando na diluição de seu citoplasma e material genético no mosto.

2.5.3 Influência de parâmetros físico-químicos em μ

Leonor Michaelis e Maud Menten observaram que a velocidade de uma reação enzimática dependia essencialmente de duas quantidades: as concentrações da enzima e do substrato (Bastos, 2016). Por eles foi proposto então um modelo cinético, chamado de Equação de Michaelis-Menten (Equação (16)), relacionando as grandezas citadas:

$$v = v_{max} \frac{S}{K_m + S}, \quad (16)$$

em que v é a velocidade de catálise, v_{max} é a velocidade máxima de catálise, S a concentração do substrato a ser convertido e K_m a constante de Michaelis-Menten, a qual representa uma medida de afinidade entre enzima e substrato (Borzani et al., 2001).

Monod (1949) observou que a velocidade específica de crescimento das células possuía comportamento semelhante à Equação (16) ou a uma isoterma de adsorção³. Considerando que enzimas isoladas e microrganismos (que possuem enzimas) catalisam a reação de interesse, a Equação de Michaelis-Menten pode ser reescrita como

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_S + S}, \quad (17)$$

em que μ representa μ_X e K_S é a concentração de substrato de saturação, chamada de constante de Monod. Graficamente, μ versus S descreve um perfil hiperbólico, que pode ser observado na Figura 4.

³Curva que representa a variação da umidade de um material sob temperatura constante.

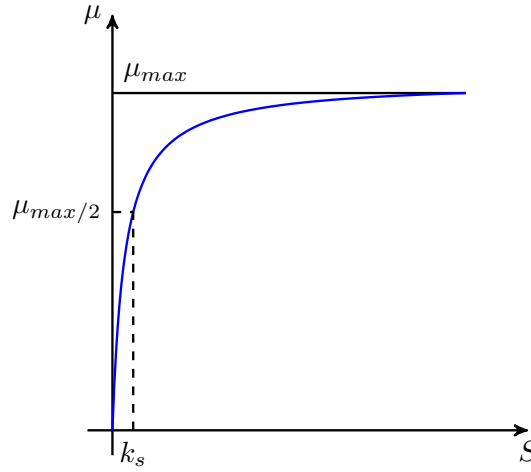


Figura 4: Cinética de crescimento de Monod.

Fonte: Adaptado de Bastos (2016).

Quando $S \ll K_S$, por exemplo, $S \leq 0,1K_S$,

$$\mu = \mu_{max} \frac{0,1K_S}{K_S + 0,1K_S} = \mu_{max} \frac{0,1K_S}{1,1K_S} \approx 0,09\mu_{max},$$

a velocidade específica possui caráter linear, sendo altamente dependente da concentração do substrato limitante (Schmidell et al., 2001). No instante em que $S = K_S$,

$$\mu = \mu_{max} \frac{K_S}{K_S + K_S} = \mu_{max} \frac{K_S}{2K_S} = 0,5\mu_{max}.$$

Este resultado possui implicações importantes para a condução de um experimento que envolva catálise microbiana. Sabe-se que, quando o substrato no meio equivale à constante de Monod, isto é, o mosto está saturado, os microrganismos atingem metade da velocidade máxima específica de crescimento. Portanto, quanto menor o valor de K_S , maior a afinidade pelo substrato escolhido e, por consequência, mais rápido se atingirá μ_{max} (Carcano, 2010; Schmidell et al., 2001).

À medida que a concentração S supera a constante K_S , a velocidade específica se aproxima da máxima. Por exemplo, $S = 10K_S$,

$$\mu = \mu_{max} \frac{10K_S}{K_S + 10K_S} = \mu_{max} \frac{10K_S}{11K_S} \approx 0,9\mu_{max},$$

ou $S = 100K_S$,

$$\mu = \mu_{max} \frac{100K_S}{K_S + 100K_S} = \mu_{max} \frac{100K_S}{101K_S} \approx 0,99\mu_{max},$$

Deste modo, uma vez que μ_{max} é atingido, perturbações positivas em S não alteram o valor de μ , sendo esta constante e máxima.

Estas definições, que compõem a cinética de Monod, são válidas para sistemas em batelada e na ausência de inibidores metabólicos. De acordo com Schmidell et al. (2001), Jerusalimsky & Neronova propuseram um modelo matemático (Equação (18)) que descreve o fenômeno de inibição do crescimento celular pela concentração do produto, isto é,

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{(K_S + S)} \frac{1}{\left(1 + \frac{P}{K_I}\right)}, \quad (18)$$

em que P é a concentração de produto gerado e K_I a constante de inibição por esta substância. Neste trabalho, a velocidade específica de crescimento microbiano será modelada pela Equação (18), todavia, apresentam-se na Tabela 1 outros estimadores para μ .

Tabela 1: Diferentes formulações para μ .

Modelo	Expressão	Referência
Teissier	$\mu = \mu_{max} \left(1 - \exp \left\{ \frac{-S}{K_S} \right\} \right)$	Bastos (2016)
Moser	$\mu = \mu_{max} \frac{S^n}{K_S + S^n}$	Schmidell et al. (2001)
Contois & Fugimoto	$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_S X + S}$	Bastos (2016)
Powell	$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_S + K_D + S}$	Schmidell et al. (2001)
Arrhenius	$\mu = A \exp \left\{ \frac{-E_a}{RT} \right\}$	Bastos (2016)

No modelo de Moser, n é um parâmetro intrínseco ao tipo de substrato. Powell introduz K_D como a constante de mortalidade celular. No modelo de Arrhenius, E_a

é a energia de ativação térmica, A a constante de Arrhenius, $R = 8,314 J K^{-1} mol^{-1}$ é a constante universal dos gases e T a temperatura absoluta em K .

Uma vez apresentados os conceitos sobre biorreatores, seus elementos e a cinética de processos bioquímicos, as modelagens química e matemática se tornam passíveis de realização. Portanto, este capítulo fornece informações suficientes e necessárias para o desenvolvimento do próximo, no qual o modelo deste projeto será proposto.

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Neste trabalho, foi proposto o desenvolvimento e análise de um modelo matemático para descrever a fermentação escura de resíduos industriais orgânicos através de um conjunto de equações diferenciais ordinárias, embasando-se no balanço de fluxo mássico em um biorreator que opera em batelada. Além disto, propôs-se um modelo de otimização para determinar combinações ótimas de reagentes e catalisadores visando maximizar o rendimento da produção de biohidrogênio.

Para o sistema dinâmico desenvolvido, de todos os pontos de equilíbrio determinados, somente um deles permite classificar o sistema como assintoticamente estável em relação aos substratos, isto é, diz-se que o sistema é assintoticamente estável com parte das variáveis. Foi possível também observar que o sistema possui memória, ou seja, a cada instante $t \geq 0$, a solução do Sistema de Equações (31) é calculada em relação às condições iniciais definidas, o que, juntamente com suas propriedades algébricas, permite dizer que o modelo tem grande potencial para representar a fermentação escura.

Quanto à otimização, o Algoritmo Memético se mostrou mais eficiente que o VNS para determinar uma combinação de polímeros industriais, bactérias hidrolíticas, acidogênicas e acetogênicas que maximize o rendimento da produção de biohidrogênio. Os métodos utilizados encontraram soluções que permitiram não apenas aumentar o rendimento do processo, como também diminuir a formação de subprodutos (CO_2), o que evidencia que a metodologia proposta tem grande potencial para auxiliar no planejamento da fermentação escura com bons rendimentos e baixo impacto ambiental.

Para trabalhos futuros, espera-se aprimorar o modelo, incluindo restrições

relativas aos balanços de energia e de momento do fermentador, além de inserir variáveis estocásticas a ele e almeja-se propor um controlador ótimo para esta fermentação escura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAS, N.; KALAIR, A.; KHAN, N. Review of fossil fuels and future energy technologies. **Futures**, v.6, p.31–49, 2015.

ANSARI, A. A.; GILL, S. S.; LANZA, G. R.; RAST, W. **Eutrophication: Causes, Consequences and Control**. New York: Springer, 2011. 394p.

ARGUN, H.; KARGI, F.; KAPDAN, I. K.; OZTEKIN, R. Batch dark fermentation of powdered wheat starch to hydrogen gas: Effects of the initial substrate and biomass concentrations. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.33, n.21, p.6109–6115, 2008.

BALMANT, W. Conceção, construção e operação de um biodigestor e Modelagem Matemática da biodigestão anaeróbica. Curitiba, 2009. 59p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná.

BASTOS, R. G. **Tecnologia das fermentações: fundamentos de bioprocessos**. São Carlos: EdUFSCar, 2016. 159p.

BERNARD, O. Mass balance modelling of bioprocesses. In: AGRACHEV, A. (Ed.). **Mathematical Control Theory**. France: ICTP Lecture Notes, 2002. p.769-812.

BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; DE ALMEIDA LIMA, U.; AQUARONE, E. **Biotecnologia Industrial - Volume I: Fundamentos**. São Paulo: Blucher, 2001. 254p.

BUONOMO, B.; CERASUOLO, M. Stability and bifurcation in plant–pathogens interactions. **Applied Mathematics and Computation**, v.232, p.858–871, 2014.

BUONOMO, B.; CERASUOLO, M. The effect of time delay in plant–pathogen interactions with host demography. **Mathematical Biosciences & Engineering**, v.12, n.3, p.473–490, 2015.

CARCANO, S. A MODEL FOR CELL GROWTH IN BATCH BIOREACTORS. Milano, 2010. 120p. Dissertação (Mestrado) - Facoltà di Ingegneria dei Sistemi - Politecnico di Milano.

CHELLABOINA, V.; HADDAD, W. M. A unification between partial stability and stability theory for time-varying systems. **IEEE Control Systems Magazine**, v.22, n.6, p.66–75, 2002.

CHONG, M.-L.; SABARATNAM, V.; SHIRAI, Y.; HASSAN, M. A. Biohydrogen production from biomass and industrial wastes by dark fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.34, n.8, p.3277–3287, 2009.

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

DAWKINS, R. **The Selfish Gene**. New York: Oxford Univ. Press, 1976. 121p.

DONG, L.; ZHENHONG, Y.; YONGMING, S.; XIAOYING, K.; YU, Z. Hydrogen production characteristics of the organic fraction of municipal solid wastes by anaerobic mixed culture fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.34, n.2, p.812–820, 2009.

DÜRRE, P.; RICHARD, T. Microbial Energy Conversion revisited. **Current Opinion in Biotechnology**, v.22, n.3, p.309–311, 2011.

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, n.19, p.10660–10673, 2010.

HEUBAUM, H.; BIERMANN, F. Integrating global energy and climate governance: The changing role of the International Energy Agency. **Energy Policy**, v.87, p.229–239, 2015.

JAMMAZI, C. On a sufficient condition for finite-time partial stability and stabilization: applications. **IMA Journal of Mathematical Control and Information**, v.27, p.29–56, 2010.

KHAN, M. A.; NGO, H. H.; GUO, W.; LIU, Y.; ZHANG, X.; GUO, J.; CHANG, S. W.; NGUYEN, D. D.; WANG, J. Biohydrogen production from anaerobic digestion and its potential as renewable energy. **Renewable Energy**, 2017.

KRASNOGOR, N.; SMITH, J. A tutorial for competent memetic algorithms: model, taxonomy, and design issues. **IEEE Transactions on Evolutionary Computation**, v.9, n.5, p.474–488, 2005.

LAPIN, K. S. Parital Uniform Boundedness of Solutions of Systems of Differential Equations with Partly Controlled Initial Conditions. **Differential Equations**, v.50, n.3, p.305–311, 2014.

LEITE, T. L. Produção de bio-hidrogênio a partir do efluente da parboilização do arroz. Pelotas, 2010. 74p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pelotas.

LYNCH, S. **Dynamical Systems with Applications using Mathematica**. Manchester: Birkhäuser Boston, 2007. 484p.

MANYI-LOH, C. E.; MAMPHWELI, S. N.; MEYER, E. L.; OKOH, A. I.; MAKAKA, G.; SIMON, M. Microbial Anaerobic Digestion (Bio-Digesters) as an Approach to the Decontamination of Animal Wastes in Pollution Control and the Generation of Renewable Energy. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v.10, n.9, p.4390–4417, 2013.

MLADENOVIC, N.; HANSEN, P. Variable neighborhood search. **Computers & Operations Research**, v.24, n.11, p.1097–1100, 1997.

MONOD, J. The Growth of Bacterial Cultures. **Annual Review of Microbiology**, v.3, n.1, p.371–394, 1949.

MOREIRA, F. S.; MACHADO, R. G.; ROMÃO, B. B.; BATISTA, F. R. X.; FERREIRA, J. S.; CARDOSO, V. L. Improvement of hydrogen production by biological route using repeated batch cycles. **Process Biochemistry**, v.58, p.60–68, 2017.

MOSCATO, P.; COTTA, C.; MENDES, A. Memetic Algorithms. In: **New Optimization Techniques in Engineering**. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 2004. p.53-85.

NATH, K.; DAS, D. Improvement of fermentative hydrogen production: various approaches. **Applied Microbiol Biotechnology**, v.65, n.5, p.520–529, 2004.

OMAR, E.; HAITAM, A. R.; FREDE, B. Renewable energy sources: Current status, future prospects and their enabling technology. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.30, p.748–764, 2014.

PALOMO-BRIONES, R.; RAZO-FLORES, E.; BERNET, N.; TRABLY, E. Dark-fermentative biohydrogen pathways and microbial networks in continuous stirred tank reactors: Novel insights on their control. **Applied Energy**, v.198, p.77–87, 2017.

PRAKASHAM, R. S.; BRAHMAIAH, P.; SATHISH, T.; RAO, K. R. S. S. Fermentative biohydrogen production by mixed anaerobic consortia: Impact of glucose to xylose ratio. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.34, n.23, p.9354–9361, 2009.

ROMAN, M.; SELIȘTEANU, D. Modeling of microbial growth bioprocesses: Equilibria and stability analysis. **International Journal of Biomathematics**, v.9, n.5, p.1–21, 2016.

ROMÃO, B. B.; BATISTA, F. R. X.; FERREIRA, J. S.; COSTA, H. C. B.; RESENDE, M. M.; CARDOSO, V. L. Biohydrogen Production Through Dark Fermen-

tation by a Microbial Consortium Using Whey Permeate as Substrate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.172, n.7, p.3670–3685, 2014.

SCHMIDELL, W.; BORZANI, W.; DE ALMEIDA LIMA, U.; AQUARONE, E. **Biotecnologia Industrial - Volume II: Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Blucher, 2001. 541p.

SHIJIE, L. . In: SHIJIE, L. (Ed.). **Bioprocess Engineering**. Amsterdam: Elsevier, 2013. p.85-140.

SINGH, L.; WAHID, Z. A.; SIDDIQUI, M. F.; AHMAD, A.; RAHIM, M. H. A.; SAKINAH, M. Biohydrogen production from palm oil mill effluent using immobilized *Clostridium butyricum* EB6 in polyethylene glycol. **Process Biochemistry**, v.48, n.2, p.294–298, 2013.

STROGATZ, S. H. **Nonlinear Dynamics and Chaos: with applications to physics, biology, chemistry and engineering**. Westview Press, 2001. 512p.

TRCHOUNIAN, K.; SAWERS, R. G.; TRCHOUNIAN, A. Improving biohydrogen productivity by microbial dark- and photo-fermentations: Novel data and future approaches. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.80, p.1201–1216, 2017.

TWIDELL, J. W.; WEIR, A. D. **Renewable energy resources**. New York: Taylor & Francis, 2006. 601p.

VOROTNIKOV, V. I. **Partial Stability and Control**. Basel, Boston: Birkhäuser, 1998. 430p.

ZHANG, Y.; SHEN, J. Effect of Temperature and Iron Concentration on the Growth and Hydrogen Production of Mixed Bacteria. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.31, p.441–446, 2006.

ZIEMIŃSKI, K.; FRĄC, M. Methane fermentation process as anaerobic digestion of biomass: Transformations, stages and microorganisms. **Academic Journals: African Journal of Biotechnology**, v.11, n.18, p.4127–4139, 2012.