

Avaliação do efeito de metais constituintes do chorume na produção biológica de hidrogênio.

I. A. da SILVA¹, S. T. de LIMA¹, M. R. SIQUEIRA¹, M. A. M. S. da VEIGA¹, e V. REGINATTO¹

¹ Universidade de São Paulo, Departamento de Química
E-mail para contato: inarinha.amoroso@gmail.com

RESUMO – Neste trabalho foi estudado o efeito de metais encontrados no chorume, tais como o Cu, Cd, Pb e Hg na produção de H₂, bem como a utilização do chorume como substrato. A cultura mista utilizada foi seca a 105°C/ 24 h para o enriquecimento em bactérias produtoras de H₂. Para a realização de ensaios cinéticos foi utilizado 3,33 g do lodo seco com 45 % de sólidos voláteis, solução de glicose (10 g/L), adicionada de macro e micronutrientes, além de 5 diferentes concentrações dos metais: Cu de 0,010 a 0,050 mg/L; Cd de 0,015 a 0,035 mg/L; Pb de 0,030 a 0,0120 mg/L e Hg de 0,050 a 1,500 mg/L. As velocidades de produção de H₂ por fermentação na presença dos metais foram estimadas pelo modelo de Gompertz modificado. As concentrações dos metais próximas às encontradas no chorume não apresentaram efeito inibitório sobre a produção de H₂. Ao contrário, o Cu estimulou a produção de H₂. O Pb na concentração mais elevadas (0,12 mg/L) apresentou efeito inibitório. O Hg acima de 0,100 mg/L apresentou inibição de cerca de 50 % do processo. Não foi observada produção de H₂ utilizando apenas o chorume como substrato, mas em combinação com a glicose, a produção de H₂ aumentou em 2 vezes comparado ao controle (apenas glicose), demonstrando ser um bom co-substrato.

1. INTRODUÇÃO

O H₂ é considerado um combustível limpo, pois é uma molécula livre de carbono, cuja combustão resulta apenas em água. Entretanto, os atuais métodos para a sua obtenção utilizam combustíveis fósseis e demandam elevada quantidade de energia (Chaubey *et al.*, 2013). A obtenção de H₂ por fermentação apresenta vantagens sobre os métodos químicos, pois são operados à pressão e temperatura baixas, além de possibilitarem a utilização de matérias-primas renováveis (Lin *et al.*, 2012).

Porém, a produção de H₂ por fermentação apenas se torna competitiva se forem usados substratos baratos, tais como resíduos e efluentes. Neste sentido, o chorume tem sido estudado na produção biológica de H₂ como substrato (Hafez *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2011), inóculo (Watanabe e Yoshino, 2011), ou como fonte de nutrientes (Liu *et al.*, 2011). O chorume formado em aterros sanitários apresenta elevado teor de matéria orgânica e metais em sua composição. Metais tóxicos, tais como o Pb, Cd, Cu e Hg em chorume são derivados de descartes de plásticos, pilhas, baterias e lâmpadas de mercúrio, entre outros (Renou *et al.*, 2008). Os metais tem grande influência na

produção de H_2 uma vez que várias enzimas envolvidas na via metabólica dependem da presença de metais (Li e Fang, 2007). Entretanto, alguns estudos relatam a inibição da produção de H_2 por fermentação ocasionada por alguns metais (Yu e Fang, 2001).

Neste trabalho foi verificado o efeito dos metais Cd, Cu, Pb e Hg na faixa de concentração encontrada no chorume de um aterro sanitário localizado em São Paulo, Brasil, sobre a produção de H_2 . Além disso, o chorume foi utilizado em combinação com a glicose como co-substrato para a produção de H_2 por fermentação.

2. MATERIAL e MÉTODOS

2.1. Caracterização dos substratos

A concentração dos metais no chorume foi determinada segundo o procedimento descrito em EPA 3051 (modificado). A digestão da amostra foi feita em microondas utilizando 4 mL de chorume e 10 mL de HNO_3 concentrado, à temperatura de $175^\circ C$ por 5 minutos. A amostra digerida foi analisada por ET AAS (Espectrometria de Absorção Atômica com Atomizador Eletrotérmico) para o Pb e Cu e HR CS AAS (Espectrômetro de Absorção Atômica de Alta Resolução com Fonte Contínua) para o Cd e o Hg. Para as determinações usou-se os seguintes comprimentos de onda: Pb (283,3 nm); Cu (324,8 nm); Cd (213,3 nm) e Hg (253,6 nm).

Para a análise de açúcares redutores totais (ART) utilizou-se o método do ácido 3,5 dinitrosalicílico – DNS, segundo Miller, (1959). O analisador utilizado para análise de Carbono Orgânico Total (COT) foi Shimadzu- Modelo TOC-VCPN, pelo método de medida “Direto-Combustão-Oxidação catalítica” a $680^\circ C$.

2.2. Ensaios cinéticos de produção de H_2

Para a realização dos ensaios de produção de H_2 foi utilizada cultura mista (lodo) coletada de um reator anaeróbio, utilizada no tratamento de vinhaça de uma usina de açúcar e etanol. Antes de sua utilização o lodo foi secado a $105^\circ C$ por 24 h para o enriquecimento em bactérias esporuladas, sabidamente produtoras de H_2 .

Para a realização dos ensaios foi adicionado ao biorreator de 125 mL de volume útil, 3,33 g de inóculo (lodo seco) contendo 45 % de sólidos voláteis (SV), 100 mL de solução de glicose (10 g/L) e 1 mL de soluções de macro e micronutrientes (GONZALEZ-GIL *et al.*, 2002). Nos ensaios realizados com os metais, além da adição de glicose, nutrientes e lodo, foram introduzidos diferentes volumes de solução estoque de Cu, Cd, Pb e Hg, de modo a perfazer as concentrações estudadas. Para o cobre as concentrações utilizadas foram 0,010, 0,020, 0,030, 0,040 e 0,050 mg/L. Para o cádmio foram 0,015, 0,020, 0,025, 0,030, 0,035 mg/L. Para o chumbo as concentrações foram 0,030, 0,050, 0,070, 0,090, 0,120 mg/L. Para o Hg utilizou-se as concentrações de 0,050, 0,100, 0,500, 1,000, 1,500 mg/L.

Também foram realizados ensaios para a produção de H_2 utilizando apenas o chorume como substrato e o chorume (sem solução nutriente) e adição de glicose (10 g/L). Os ensaios foram realizados em duplicata, nos quais o volume de gás total produzido foi medido em função do tempo.

A quantificação do volume de gás gerado foi realizada em um sistema de frascos invertidos, onde o gás produzido desloca um volume de solução de NaOH 5 % (m/v) contida no frasco invertido, conforme representado na Figura 1. Este volume era multiplicado pela percentagem do H₂ contido no gás para a obtenção do volume de H₂.

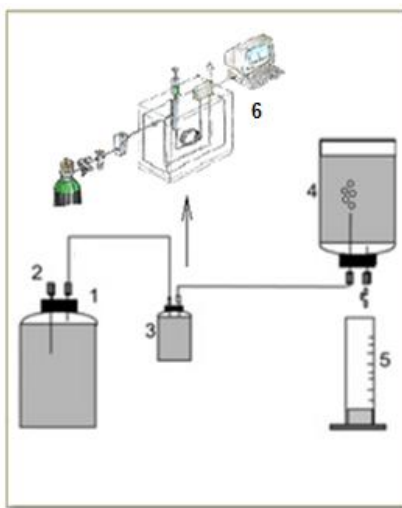


Figura 1 - Sistema para a realização de ensaios cinéticos em batelada para a produção de H₂ por fermentação: 1- Biorreator, 2- Ponto de borbulhamento de gás argônio, 3- Frasco de segurança e de amostragem de gás, 4-Frasco invertido contendo solução de NaOH 5%, 5- Frasco graduado para recolher o volume de NaOH 5 % deslocado, 6- cromatógrafo a gás.

A composição dos gases do biorreator foi analisada em cromatógrafo a gás da marca Shimadzu GC-2014, equipado com detector de condutividade térmica (TCD). A coluna utilizada foi Restek Shincarbon ST 100/120, 2m, 1mm ID, 1/16" OD Silico, e o argônio como gás de arraste, com vazão de 10 mL/min. As temperaturas do injetor, da coluna e do detector foram 80°C, 50°C e 100°C, respectivamente.

A velocidade de produção de H₂, o potencial de produção máxima e a fase de latência (tempo para o início da produção de H₂) foram estimados pelo ajuste dos dados experimentais (volume de H₂ em função do tempo) ao modelo de Gompertz modificado, conforme Equação 1.

$$P = H_{max} \cdot \exp \left\{ -\exp \left[\frac{R_m \cdot s}{P} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad \text{Eq. 1}$$

Onde: P: representa o volume de H₂ acumulado (mL); Hmax: o potencial máximo de produção de H₂ (mL); Rm: velocidade máxima de produção de H₂ (mL/h); λ: tempo da fase lag (h); t: tempo do experimento (h).

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Na tabela 1 estão apresentadas a concentração de Cu, Cd, Pb e Hg, o COT e ART do chorume. A partir das concentrações de metais encontradas no chorume foi escolhida a faixa de concentração dos mesmos para a realização dos ensaios de produção de H_2 .

Tabela 1: Caracterização química do chorume.

| Cu (mg/L) | Cd (mg/L) | Pb (mg/L) | Hg (mg/L) | COT (mg/L) | ART (mg/L) |
|---------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------------|------------------------|
| 0,026 ($\pm 0,0064$) | 0,00055 ($\pm 0,017$) | 0,030 ($\pm 0,0079$) | 0,058 ($\pm 0,0018$) | 1326,0 ($\pm 3,0$) | 150,9 ($\pm 0,5$) |

As Figuras 2a, b, c e d ilustram a produção de H_2 em função do tempo em ensaios de fermentação em batelada, com a adição de diferentes concentrações dos metais, Cu, Cd, Pb e Hg, respectivamente, e o controle, sem a adição do metal estudado (0 g/L).

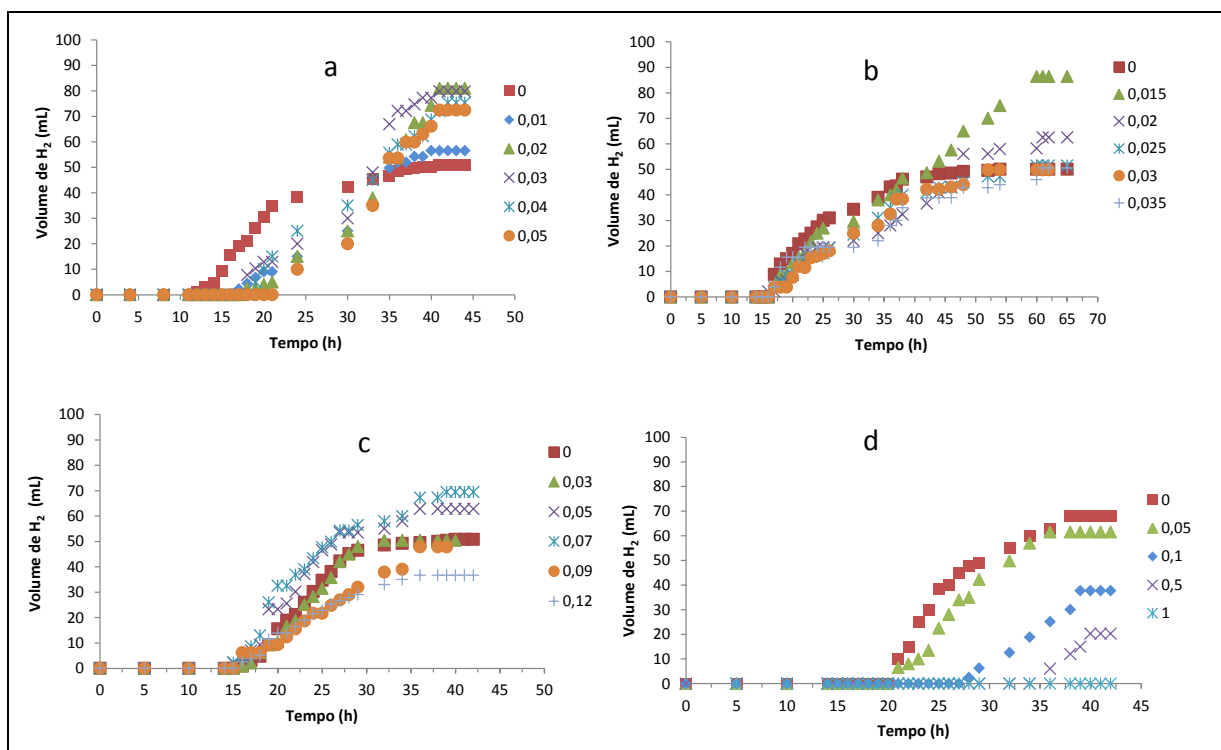


Figura 2 - Volume de H_2 produzido em ensaio de cinéticos contendo glicose e diferentes concentrações de cobre (a), cádmio (b), chumbo (c) e mercúrio (d).

Analisando a Figura 2a, observa-se que a adição de Cu, nas concentrações estudadas, resultou num aumento do volume de H_2 produzido, entretanto, retardaram o início da produção de H_2 .

Para o teste com Cd (Figura 2b) foram utilizadas concentrações entre 0,015 e 0,035 mg/L. Observa-se que a menor concentração de Cd (0,015 mg/L) estimulou a produção de um volume maior de H₂. Porém, nas demais concentrações de Cd adicionadas aos ensaios, o volume de H₂ produzido foi similar ao do controle.

Para o teste com o chumbo (Figura 2c) foram estudadas as concentrações entre 0,030 e 0,120 mg/L. Os resultados da produção de H₂ sob estas condições mostram que as concentrações intermediárias de chumbo (0,050 e 0,070 mg/L) estimularam a produção de H₂. Na concentração mais elevada 0,12 mg/L, houve uma inibição de cerca 40 % em relação ao volume produzido pelo controle. Efeito similar foi encontrado por LI e FANG (2007), que afirmaram que o chumbo provoca aumento na produção de H₂ quando em baixas concentrações.

Os resultados referentes à produção de H₂ com adição de Hg podem ser observados na Figura 2d. Estes resultados revelam que a concentração de 0,050 mg/L não inibiu a produção de H₂, mas a concentração de 0,100 mg/L inibiu em cerca de 50 % e partir de 1,000 mg/L não há mais produção de H₂.

Na Tabela 2 podem ser observados os parâmetros cinéticos obtidos pelo modelo de Gompertz para a produção de H₂ na presença de diferentes concentrações dos metais estudados.

Tabela 2: parâmetros cinéticos de Gompertz para a produção de H₂ por fermentação na presença de diferentes concentrações de Cu, Cd, Pb e Hg.

| Cu | | 0 | 0,01 | 0,02 | 0,03 | 0,04 | 0,05 |
|--------|----------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| (mg/L) | Hmáx (mL) | 55,70 | 58,07 | 62,73 | 71,00 | 65,70 | 64,47 |
| | Rm (mL/h) | 2,30 | 3,39 | 3,52 | 5,08 | 4,38 | 4,61 |
| | λ (h) | 15,86 | 19,23 | 18,60 | 19,27 | 18,70 | 17,81 |
| | R ² | 0,9763 | 0,9797 | 0,9555 | 0,927 | 0,9525 | 0,9541 |
| Cd | | 0 | 0,015 | 0,2 | 0,025 | 0,03 | 0,035 |
| (mg/L) | Hmáx (mL) | 49,37 | 116,35 | 80,43 | 52,05 | 51,43 | 54,16 |
| | Rm (mL/h) | 2,74 | 2,05 | 1,53 | 1,83 | 1,87 | 1,27 |
| | λ (h) | 14,23 | 16,18 | 15,61 | 15,60 | 16,41 | 11,33 |
| | R ² | 0,9883 | 0,9845 | 0,9743 | 0,9933 | 0,9924 | 0,9571 |
| Pb | | 0 | 0,03 | 0,05 | 0,07 | 0,09 | 0,12 |
| (mg/L) | Hmáx (mL) | 51,94 | 52,31 | 60,60 | 65,31 | 53,94 | 35,88 |
| | Rm (mL/h) | 4,78 | 4,83 | 5,07 | 4,88 | 2,58 | 2,26 |
| | λ (h) | 17,22 | 17,71 | 15,57 | 14,67 | 16,12 | 14,92 |
| | R ² | 0,9868 | 0,9948 | 0,9887 | 0,9789 | 0,9941 | 0,9832 |
| Hg | | 0 | 0,05 | 0,1 | 0,5 | 1,0 | - |
| (mg/L) | Hmáx (mL) | 61,98 | 59,27 | 53,33 | 55,19 | 0 | |
| | Rm (mL/h) | 7,09 | 6,18 | 4,12 | 3,16 | 0 | |
| | λ (h) | 19,88 | 21,5 | 30,99 | 34,58 | 0 | |
| | R ² | 0,9764 | 0,9875 | 0,9931 | 0,9952 | 0 | |

Na Figura 3 está representada a velocidade de produção de H_2 com a adição de cada uma das concentrações dos metais (R_m) em relação à velocidade de seu respectivo controle (R_{mc}). De acordo com esta figura pode-se observar mais claramente que os metais estudados podem tanto estimular, como inibir a produção de H_2 por fermentação, dependendo da concentração adicionada ao ensaio. A partir desta figura pode-se verificar que o Cu, na faixa de concentração estudada, estimulou a produção de H_2 . Já o Cd teve o efeito oposto, ou seja, diminuiu a velocidade de produção de H_2 , para todas as concentrações estudadas. O Pb até a concentração de 0,075 mg/L não alterou a velocidade de produção de H_2 e o Hg diminuiu em cerca de 20 e 50 % a velocidade de produção com a adição de 0,05 e 0,1 mg/L, respectivamente. Portanto, a partir destes resultados pode-se afirmar que o metal com maior efeito negativo sobre a produção de H_2 foi o Cd.

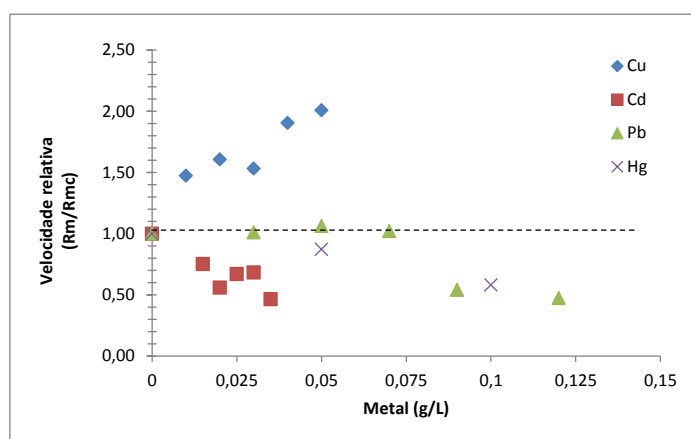


Figura 3: velocidades relativas de produção de H_2 na presença de diferentes concentrações de Cu, Cd, Pb e Hg.

Comparando-se os resultados da Figura 3 com as características do chorume mostradas na Tabela 1 pode-se inferir que as concentrações dos metais encontradas no chorume, não são inibidoras da formação de H_2 , ao contrário, no caso do Cu, estimulam a produção. Deve-se ressaltar a dificuldade de se comparar as concentrações dos metais adicionados aos ensaios com a concentração dos metais encontradas no chorume, pois no chorume estes ainda podem se apresentar unidos à matéria orgânica e neste caso, serem indisponíveis aos microrganismos.

Em estudo realizado por Yu e Fang, (2001a e b) o cobre foi reportado ser mais tóxico do que o cádmio e o cromo, apresentando inibição de 50 % da velocidade de produção de H_2 (C_{50}) na presença de 65 mg/L, 72 mg/L e 170 mg/L destes metais, respectivamente. A presença de 6,5 mg/L de cobre inibiu em 50 % a produção de H_2 a partir de sacarose (LI e FANG, 2007). Entretanto, as concentrações inibitórias dos metais, reportadas nos trabalhos mencionados anteriormente são bem mais elevadas do que as estudadas neste trabalho.

Para verificar o efeito do chorume sobre a produção de H_2 foram realizados ensaios de produção de H_2 utilizando apenas o chorume como substrato, e com chorume adicionado de 10 g/L de glicose (Figura 4). Não foi observada a produção de H_2 quando apenas o chorume foi adicionado como

substrato. Entretanto, o chorume adicionado de glicose dobrou o volume de H_2 produzido em relação a um controle contendo apenas glicose e uma solução de nutrientes.

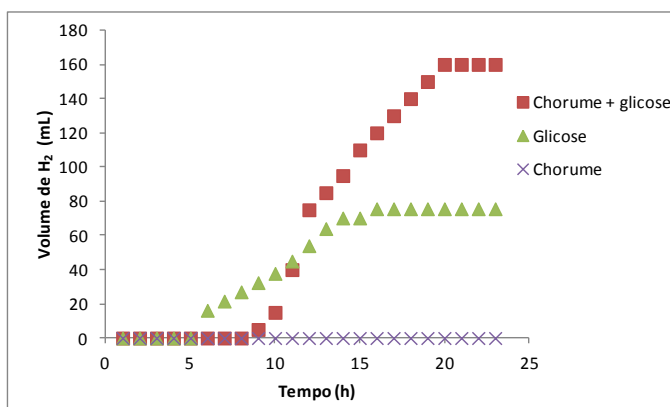


Figura 4: Volume de H_2 produzido em ensaio de fermentação, contendo chorume e glicose, e o controle contendo glicose e nutrientes do meio de cultura.

4. CONCLUSÕES

Os principais metais tóxicos encontrados na composição do chorume, Cu, Cd, Pb e Hg, podem tanto estimular como inibir a produção de H_2 por fermentação, dependendo das suas concentrações. Os metais estudados, nas concentrações encontradas no chorume, não produzem efeito negativo sobre a produção de H_2 . No caso do Cu, na mesma concentração encontrada no chorume este promoveu um aumento da produção. Não foi possível produzir H_2 utilizando apenas o chorume como substrato, apesar de apresentar elevado COT. Entretanto, o chorume demonstrou ser um excelente cosubstrato, em combinação com a glicose.

5. REFERÊNCIAS

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. *Renew Sust Energ Rev.*, v. 23, p. 443-462, 2013.

GONZALEZ-GIL, G.; KLEEREBEZEM, R.; LETTINGA, G. Assessment of metabolic properties and kinetic parameters of methanogenic sludge by on-line methane production rate measurements. *Appl Microbial Biotechnol.*, v. 58, p. 248-254, 2002.

HAFEZ, H.; NAKHALA, G.; NAGGAR, H. An integrated system for hydrogen and methane production during landfill leachate treatment international. *Journal of Hydrogen Energy.*, v. 35, p. 5010–5 014, 2010.

<http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3051a.pdf>, acessado em 28/04/2014.

LIN, C. Y.; LAY, C. H.; SEN, B, CHU, C. Y, KUMAR, G.; CHEN, C. C, CHANG, J. S. Fermentative hydrogen production from wastewaters: A review and prognosis. *Int J of Hydrogen Energy.*, v. 37, p. 15632-15642, 2012.

LIU, C.; FANG, H, P. Inhibition of heavy metals on fermentative hydrogen production by granular sludge. *Chemosphere.*, v. 67, p. 668-673, 2007.

LIU, Q.; ZHANG, X.; YU, L.; ZHAO, A.; TAI, J.; LIU, J.; QIAN, G.; XU, Z. P. Fermentative hydrogen production from fresh leachate in batch and continuous bioreactors. *Bioresource Technology.*, v. 102, p. 5411-5417, 2011.

LIU, Q.; ZHANG, X.; ZHOU, Y.; ZHAO, A.; CHEN, S.; QIAN, G.; XU, Z. P. Optimization of fermentative biohydrogen production by response surface methodology using fresh leachate as nutrient supplement. *Bioresource Technology.*, v. 102, p. 8661-8668, 2011.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.*, v. 31, p. 426, 1959.

RENOU, S.; GIVAUDANA, J. G.; POULAIN, S.; DIRASSOUYAN, F.; MOULIN, P. Review: Landfill leachate treatment: Review and opportunity. *Journal of Hazardous Materials.*, v. 150, p. 468-493, 2008.

WATANABE, H.; YOSHINO, H. Biohydrogen using leachate from an industrial waste landfill as inoculums. *J Mater Cycles Waste Manag.*, v. 13, p. 113-117, 2011.

YU, H. Q.; Fang, H, H. P. Inhibition on acidogenesis of dairy wastewater by zinc and copper. *Environ. Technol.*, v. 22, p. 1459-1465, 2001a.

YU, H. Q.; Fang, H, H. P. Inhibition by chromium and cadmium of anaerobic acidogenesis. *Water Sci. Technol.*, v. 43, p. 267-274, 2001b.