LÍVIA SILVA BOTTA

Papel como fonte alternativa para produção anaeróbia de hidrogênio

VERSÃO CORRIGIDA
São Carlos
2012

LÍVIA SILVA BOTTA

Papel como fonte alternativa para produção anaeróbia de hidrogênio

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos, da Universidade de São Paulo, para obtenção de título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Engenharia Hidráulica e Saneamento.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Bernadete Amâncio Varesche

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos

2012

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Tratamento
da Informação do Serviço de Biblioteca – EESC/USP

Botta, Livia Silva

B551p

Papel como fonte alternativa para produção anaeróbia de hidrogênio. / Livia Silva Botta ; orientador Maria Bernadete Amâncio Varesche Silva. São Carlos, 2012.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento e Área de Concentração em Hidráulica e Saneamento)-- Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2012.

1. Fermentação. 2. Papel sulfite. 3. Celulase. 4. Fluido de rúmen. 5. Pré-tratamento ácido. 6. *Clostridium* sp. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Licenciada **LIVIA SILVA BOTTA**.

Título da dissertação: "Papel como fonte alternativa para produção anaeróbia de hidrogênio".

Data da defesa: 22/03/2012

Comissão Julgadora:

Prof^ª. Dr^ª. **Maria Bernadete Varesche (Orientadora)**
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)

Prof. Associado **Marcelo Zaiat**
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)

Prof^ª. Dr^ª. **Marcia Nitschke**
(Instituto de Química de São Carlos/USP)

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento:

Prof. Titular **Edson Cezar Wendland**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:
Prof. Associado **Paulo Cesar Lima Segantine**

Resultado:

Aprovada

Aprovado

APROVADO

Dedico aos meus avós Romeu e Lourdes (in memorian) e aos meus pais Romeu e Renata.

Com gratidão e carinho.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, saúde e capacidade de desenvolver esse trabalho;

Aos meus pais, Romeu e Renata, pelo imensurável amor, carinho, dedicação, apoio, compreensão durante todos esses anos;

À minha orientadora Profa. Dra. Maria Bernadete Amâncio Varesche pela oportunidade, orientação, atenção e ensinamentos durante a realização desse trabalho;

Às pesquisadoras Dra. Sandra Imaculada Maintinguer e Dra. Regiane Priscila Ratti Sartori pelas sugestões no exame de qualificação;

Às pesquisadoras Msc. Carolina Zampol Lazaro e Dra. Regiane Priscila Ratti Sartori por compartilharmos experiências e conhecimento e pela ajuda na execução desse trabalho;

À especialista de laboratório Dra. Isabel Kimiko Sakamoto pelos preciosos ensinamentos e ajuda nas análises de Biologia Molecular e pela amizade;

À técnica Maria Ângela Talarico Adorno pela constante ajuda durante a execução desse trabalho e pela amizade;

À Dra. Lorena Lima de Oliveira pela ajuda com o Microsoft Excel e outros softwares;

Aos amigos do laboratório Filipe, Mara Rúbia, Carol, Mari Carosia, Regiane Ratti, Regiane Corrêa, Juliana, Lorena, Tiago, Fabrício, Dagoberto, Djalma, Priscila, Adriana, Bruna, Eduardo, Rafael, Sandra, Isabel, Eloísa, Flávia, Pilar, Rogério, Vinícios, Betão, Prof. Eugênio Foresti, Profa. Márcia Damianovick, Prof. Wyclef, Prof. Marcelo Zaiat pela convivência amistosa e divertida.

Ao Victor da Cruz Coelho, pela paciência, carinho e apoio, mesmo de longe, durante a execução desse trabalho;

À USP, EESC, SHS; LPB;

À FAPESP e CNPq pelo apoio financeiro.

RESUMO

BOTTA, L.S. **Papel como fonte alternativa para produção anaeróbia de hidrogênio.** 2012. São Carlos – SP, 134 F. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos – Departamento de Hidráulica e Saneamento.

O objetivo desse trabalho foi avaliar a produção de H_2 a partir da degradação de papel sulfite com a utilização de consórcio microbiano obtido do fluido ruminal, na presença e ausência da celulase. Para obtenção de consórcio de bactérias essencialmente produtoras de H_2 , fluido de rúmen *in natura*, utilizado como inóculo, foi submetido a tratamento ácido (pH 3 por 24 h), e posteriormente enriquecido em meio de cultura Del Nery modificado em diluições seriadas. Nos ensaios de produção de H_2 foi utilizado 10% (v/v) desse inóculo em reatores com diferentes concentrações de papel e celulase, e em reatores controle, nos quais não houve adição de celulase. Reator anaeróbio em batelada, em triplicata, com papel sulfite e meio Del Nery modificado, foi mantido a 37 °C, pH inicial 7,0, com *headspace* preenchido com N_2 (100%) para os seguintes ensaios: (1) 0,5 g papel/L e 4 mL celulase/L; (2) 2,0 g papel/L e 15 mL celulase/L; (3) 4,0 g papel/L e 30 mL celulase/L; (CT 1) 0,5 g papel/L; (CT 2) 2,0 g papel/L; (CT 3) 4,0 g papel/L. Os rendimentos de H_2 foram 42, 26,6 e 24 mmol H_2 /g papel para os ensaios 1, 2 e 3, respectivamente. Não houve produção de H_2 nos reatores controle. O consumo de substrato, avaliado como glicose, foi de 56%, 56,6% e 65,4% para os ensaios 1, 2 e 3, respectivamente. Nos reatores controle não foi detectado consumo de papel. Em todos os reatores com celulase foi detectado principalmente ácido butírico, além de ácido acético e álcoois. Nos reatores controle foram detectados principalmente ácido acético e ácido isobutírico. Para os ensaios 1, 2, 3, CT 1, CT 2 e CT 3, os valores de pH final foram 4,6; 3,7; 3,5; 6,8; 6,6 e 6,5, respectivamente. Bacilos Gram positivos e formadores de endósporos foram predominantes em todos os reatores. A partir da análise de PCR/DGGE foi possível observar alteração de 78% entre a comunidade original do fluido de rúmen e a comunidade microbiana presente ao final dos ensaios. Por meio da clonagem e sequenciamento do gene RNAr 16S, verificou-se similaridade de 95% a 99% com *Clostridium* no consórcio bacteriano do reator com papel e celulase. A produção biológica de H_2 nos reatores com celulase foi provavelmente devido as bactérias que estiveram presentes nas condições estudadas, identificadas, principalmente, como *Clostridium* sp., reconhecidas como produtoras de H_2 , ácidos voláteis e álcoois. A adição de celulase foi essencial para a hidrólise do papel em carboidratos solúveis, permitindo a produção de H_2 pelas bactérias presentes no consórcio microbiano.

Palavras – chaves: fermentação, papel sulfite, celulase, fluido de rúmen, pré-tratamento ácido, *Clostridium* sp.

ABSTRACT

BOTTA, L.S. **Paper as an alternative source for anaerobic hydrogen production.** 2012. São Carlos – SP, 134 F. Dissertation (Master) – Escola de Engenharia de São Carlos – Departamento de Hidráulica e Saneamento.

The aim of this study was to evaluate the production of H₂ from office paper degradation by using a microbial consortium obtained from rumen fluid, in the presence and absence of cellulase. In order to obtain a microbial consortium consisting mainly of hydrogen producing bacteria, rumen fluid, used as inoculum, was subjected to acid pretreatment (pH 3 for 24 h), and subsequently enriched in the modified Del Nery medium in serial dilutions. In hydrogen production assays there was used 10% (v / v) of the pretreated inoculum in reactors with different concentrations of paper and cellulase, and in control reactors, without cellulase. Anaerobic batch reactor (5 L), in triplicate, with office paper and modified Del Nery medium, was kept in 37 °C and initial pH 7,0, with *headspace* filled with N₂ (100%), for the following assays: (1) 0,5 g paper/L e 4mL cellulase/L; (2) 2,0 g paper/L e 15 mL cellulase/ L; (3) 4,0 g paper/L e 30 mL cellulase/L; (CT 1) 0,5 g paper/L; (CT 2) 2,0 g paper/L; (CT 3) 4,0 g paper/L. Hydrogen yields were 42, 26,6 and 24 mmol H₂/g paper for the assays 1, 2 and 3, respectively. Hydrogen production was not detected in the control reactors. Substrate consumption percentage, measured as glucose, was 56%, 56,6% and 65,4%, respectively for the assays 1, 2 and 3. Paper consumption was not detected in the control reactors. Butyric acid, low concentration of acetic acid, and alcohols were detected in the reactors with cellulase. In the control reactor it was observed mainly acetic and iso-butyric acids. Final pH values were 4,6; 3,7; 3,5; 6,8; 6,6 and 6,5 for the assays 1, 2, 3, CT 1, CT 2 and CT 3, respectively. It was observed a predominance of Gram positive endospore-forming rods. From PCR/DGGE analysis it was possible to observe an alteration of 78% between the original microbial community of the ruminal fluid and the microbial community present at the end of the assays. From cloning and sequencing analysis of RNAr 16S gene, there was verified similarity of 95-99% with *Clostridium* in the microbial consortium. The biological hydrogen production in the assays with cellulase was probably due to bacteria present in the conditions studied, mainly identified as *Clostridium* sp., known as producers of hydrogen, organic acids and alcohols. The addition of cellulase was essential to promote paper breakdown into soluble carbohydrates, which allowed hydrogen production by bacteria present in the consortium.

Keywords: fermentation, office paper, cellulase, ruminal fluid, acid pretreatment, *Clostridium* sp.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 - Etapas do metabolismo de geração de (A) ácido acético e (B) ácido butírico.....	31
Figura 3.2 - Arranjo químico da celulose: polímero de β – glicose	34
Figura 3.3 - Esquema da hidrólise enzimática da celulos.....	39
Figura 4.1 - Esquema operacional	45
Figura 4.2 - Coleta do fluido ruminal: (A) Fístula permanente na porção do rúmen; (B) Retirada do material ligno-celulósico embebido no fluido ruminal; (C) Vasilhame térmico para transporte do fluido ruminal “ <i>in natura</i> ”; (D) Filtração do material celulósico para coleta do fluido ruminal	50
Figura 4.3 - Esquema dos ensaios de hidrólise enzimática	55
Figura 5.1 - Microscopia óptica comum da biomassa de reatores com papel: (A) bacilos e endósporos terminais em reatores com enzima; (B) bacilos Gram positivos e Gram negativos em reatores com enzima; (C) bacilos e endósporos terminais no reator controle; (D) Bacilos Gram positivos e Gram negativos no reator controle	66
Figura 5.2 - Dendrograma baseado no índice de similaridade de Jaccard a partir do padrão de bandas do DGGE. i: inóculo do rúmen; 0,5 CT: controle com 0,5 g/L de papel; 2 CT: controle 2,0 g/L de papel; 4CT: controle com 4,0 g/L de papel; 0,5: 0,5 g/L de papel e 4 mL de celulase/L ; 2: 2,0 g/L de papel e 10 mL de celulase/L ; 4: 4,0 g/L de papel e 30 mL de celulase/ L.....	67
Figura 5.3 - Perfil das bandas de DGGE de amostras dos reatores anaeróbios alimentados com papel, na presença e ausência da celulase.com <i>primer</i> específico para o Domínio <i>Bacteria</i> ; (i) Inóculo; (4CT) Controle 4 g papel/L; (4) 4 g papel/L e 30 mL celulase/L; (2CT) Controle 2 g papel/ L; (2) 2 g papel/ L e 15 mL celulase/L; (0,5CT) Controle 0,5 g papel/L; (0,5) 0,5 g papel/L e 4 mL celulase/L. As bandas indicadas e numeradas foram recortadas, seqüenciadas e identificadas de acordo com a aproximação filogenética com seqüências depositadas no GenBank	69
Figura 5.4 - Aproximação da identidade filogenética do consenso baseada nas seqüências dos clones da biomassa presente na amostra do ensaio 4 g.L-1 de papel com celulase. Os valores presentes nos nós da árvore indicam a porcentagem que o ramo se repetiu (1000 reamostragens de bootstraps). A barra de escala 0,05 indica a substituição de nucleotídeos por sítio. As seqüências de referência foram obtidas a partir do GenBank (NCBI).....	77
Figura 5.5 - Produção acumulada temporal de H ₂ : (A) 0,5 g/L + 4 mL/L celulase; (B) 2,0g/L + 15 mL/L celulase; (C) 4,0 g/L + 30 mL/L celulase. Os valores representam a média das triplicatas e desvio padrão	81

Figura 5.6 - (A) Variação temporal de pH; (B) Produção acumulada de compostos orgânicos para o ensaio 1.....	90
Figura 5.7 - (A) Variação temporal de pH; (B) Produção acumulada de compostos orgânicos para o ensaio 2.....	91
Figura 5.8 - (A) Variação temporal de pH; (B) Produção acumulada de compostos orgânicos do ensaio 3	92
Figura 5.9 - Concentração final de compostos orgânicos nos reatores controle.....	93
Figura 5.10 - Pressão parcial de H ₂ nos ensaios 1 (0,5 g papel/L e 4 mL celulase/ L); 2 (2,0 g papel/L e 15 mL celulase/L) e 3 (4,0 g papel/L e 30 mL celulase/L).....	97
Figura 5.11 - Concentração de Carboidratos Solúveis (mg/L) ao longo do tempo (h): (A) 1; (B) 2 e (C) 3. Os valores representam a média das triplicatas e desvio padrão.....	99
Figura 5.12 - Produção acumulada de H ₂ nos ensaios com celulase: (-◆-) ensaio 1; (-■-) ensaio 2 e (-▲-) ensaio 3	106

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 - Concentração de celulase adicionada nos ensaios com papel	47
Tabela 4.2 - Composição do Meio Del Nery modificado.....	48
Tabela 4.3 - Composição da Solução de Vitaminas	49
Tabela 4.4 - Composição da Solução de Solubilização.....	50
Tabela 4.5 - Pré-tratamentos aplicados no fluido ruminal	51
Tabela 4.6 - <i>Primers</i> para PCR/DGGE do Domínio Bacteria.....	58
Tabela 4.7 - Condições utilizadas na PCR para o DGGE	58
Tabela 4.8 - Soluções para amplificação usando os <i>primers</i> 27F e 1100R.....	59
Tabela 4.9 - <i>Primers</i> para amplificação da região RNAr 16S.....	59
Tabela 4.10 - Composição do Meio de Cultivo Luria-Bertani	60
Tabela 4.11 - Componentes adicionados ao meio de cultivo Luria-Bertani	60
Tabela 4.12 - Primers para amplificação do DNA plasmidial.....	61
Tabela 4.13 - Soluções para reação de sequenciamento com <i>primer</i> 27F.....	61
Tabela 4.14 - Programação do termociclador para reações de sequenciamento	62
Tabela 5.1 - Caracterização do filtrado resultante da solução de papel triturado e água ultra-purificada	64
Tabela 5.2 - Valores de carboidratos solúveis e DQO das soluções com diferentes concentrações de papel e ácido sulfúrico concentrado.....	64
Tabela 5.3 - Sequências obtidas no GenBank relacionadas às bandas re-amplificadas do gel de DGGE	70
Tabela 5.4 - Sequências obtidas no GenBank relacionadas aos clones da amostra do ensaio 3..	73
Tabela 5.5 - Comparação dos rendimentos de H ₂	84
Tabela 5.6 - Potencial de Produção de H ₂ (P), Taxa Máxima de Produção de H ₂ (R _m), Fase lag (λ) e R ² obtidos na equação de Gompertz modificada	88
Tabela 5.7 - Valores de Sólidos Totais (ST) e Sólidos Totais Voláteis (STV) para os ensaios 1; 2 ; 3; CT 1; CT 2; CT 3	103

Tabela 5.8 - DQO inicial e final nos ensaios	104
Tabela 5.9 - Valores de DQO inicial e final detalhados	104
Tabela 5.10 - Resumo geral dos parâmetros obtidos dos reatores anaeróbios para as diferentes condições com papel e celulase	108

LISTA DE SIGLAS

DGGE – Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DQO – Demanda Química de Oxigênio

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

LPB – Laboratório de Processos Biológicos

PCR – Reação em Cadeia de Polimerase

pH – Potencial Hidrogeniônico

RNA – Ácido Ribonucleico

ST – Sólidos Totais

STV – Sólidos Totais Voláteis

LISTA DE SÍMBOLOS

Ensaio com celulase

Ensaio 1 – 0,5 g/L de papel sulfite e 4 mL/L celulase

Ensaio 2 – 2,0 g/L de papel sulfite e 15 mL/L celulase

Ensaio 3 – 4,0 g/L de papel sulfite e 30 mL/L celulase

Ensaio controle – sem celulase

Ensaio CT 1 – 0,5 g/L de papel sulfite

Ensaio CT 2 – 2,0 g/L de papel sulfite

Ensaio CT 3 – 4,0 g/L de papel sulfite

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	iii
LISTA DE SIGLAS	v
LISTA DE SÍMBOLOS	vi
1. INTRODUÇÃO.....	25
2. OBJETIVOS	27
2.1. Geral	27
2.2. Específicos.....	27
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	28
3.1. Gás Hidrogênio: combustível e vetor de energia.....	28
3.2. Produção Biológica de Hidrogênio	28
3.3. Substratos para a Produção de Hidrogênio.....	32
3.3.1. Celulose e Resíduos Ligno-celulósicos	33
3.3.2. Celulase	38
3.4. Microrganismos Produtores de Hidrogênio pela Via Fermentativa	40
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	44
4.1. Esquema Operacional	44
4.2. Substrato	46
4.3. Celulase	46
4.4. Meio Nutricional	47
4.4.1. Solução de Biotina e Ácido p-aminobenzoico	48
4.4.2. Solução de Vitamina B12	49
4.5. Inóculo	49
4.5.1. Processamento e Armazenamento do Inóculo.....	50
4.5.2. Pré-tratamentos do Inóculo.....	51

4.6. Enriquecimento e Manutenção do Inóculo Pré-tratado	52
4.7. Reativação da biomassa enriquecida	52
4.8. Ensaios com reatores anaeróbios com papel sulfite, na presença ou ausência da enzima celulase	53
4.9. Ensaios de Hidrólise Enzimática	54
4.10. Análises cromatográficas	55
4.10.1. Biogás	55
4.10.2. Subprodutos Orgânicos	55
4.11. Análise do Consumo de Papel	56
4.12. DQO	56
4.13. pH	56
4.14. Sólidos Totais Voláteis	57
4.15. Análises Microbiológicas	57
4.15.1. Análises Microscópicas	57
4.15.2. Análises de Biologia Molecular	57
4.15.2.1. PCR/DGGE	58
4.15.2.2. Clonagem e Sequenciamento do gene RNAr 16S	58
4.15.2.3. Análise das Sequências de DNAr 16S	62
4.16. Cálculo do Balanço de Massa em termos de Demanda Química de Oxigênio	62
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
5.1 Caracterização do Papel	63
5.2. Caracterização do Consórcio Microbiano	64
5.2.1. Caracterização Filogenética	66
5.2.1.1. PCR/ DGGE	66
5.2.1.2. Clonagem e Sequenciamento do gene RNAr 16S	72
5.2.2. Considerações sobre a Caracterização Filogenética	78
5.3. Produção de Hidrogênio	79

5.3.1. Produção de Hidrogênio	79
5.3.1.1. Cinética da Produção de Hidrogênio	87
5.3.2. Subprodutos Orgânicos.....	89
5.3.3. Consumo de Papel.....	97
5.4 Sólidos Totais Voláteis	102
5.5. Balanço de massa em termos de Demanda Química de Oxigênio.....	103
5.6. Análise Comparativa dos Ensaios com Celulase	105
6. CONCLUSÕES	110
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	111
ANEXO I - Curva de Hidrogênio – Cromatógrafo gasoso GC 2010	124
ANEXO II - Curva de calibração para determinação de glicose	125
ANEXO III – Curvas: DQO x Concentração de papel; Glicose x Concentração de papel; DQO x Concentração de celulase.....	126
ANEXO IV - Ajuste da Produção acumulada de H ₂ na equação de Gompertz modificada.....	128
ANEXO V – Variação temporal da concentração de subprodutos orgânicos nos ensaios.....	130
ANEXO VI - Pressão Parcial de H ₂ nos reatores dos ensaios 1, 2 e 3.....	132

1. INTRODUÇÃO

O aumento da demanda por energia em consequência do elevado crescimento populacional e a necessidade de buscar alternativas que minimizem os efeitos poluidores da utilização de combustíveis fósseis incentivaram pesquisadores a estudar um combustível cujas características principais fossem inesgotabilidade e sustentabilidade.

O gás hidrogênio, um potencial vetor energético, tornou-se um substituinte promissor dos combustíveis fósseis por apresentar alta densidade energética, aproximadamente 2,75 vezes maior que o petróleo, por ser inesgotável, já que o elemento hidrogênio é o mais abundante do planeta, e pela sua combustão da qual é liberada apenas energia e vapor de água. No entanto, este gás não está prontamente disponível na atmosfera e para que sua utilização seja viabilizada, devem ser estudados métodos de produção com relação custo e benefício satisfatória.

Atualmente, o gás hidrogênio é utilizado em baixa escala, principalmente por indústrias químicas. A principal forma de produção desse gás refere-se a métodos físico-químicos, extremamente custosos, além de consumirem grande quantidade de energia e apresentarem potencial poluidor. Uma alternativa para viabilizar o processo de produção de H_2 é a utilização de processos biológicos que consistem na geração do gás pela utilização de microrganismos.

A via fermentativa é, dentre os processos biológicos de produção de H_2 , o mais vantajoso, já que a fermentação ocorre em condição anaeróbia e na ausência de luz, levando à economia de iluminação e aeração, além de se poder utilizar grande variedade de substratos orgânicos e microrganismos.

Os principais critérios a serem considerados na escolha do substrato são disponibilidade, custo, teor de carboidratos e biodegradabilidade. Compostos prontamente assimiláveis são os preferenciais para o alto rendimento de produção. Entretanto, fontes de carboidratos puros encarecem o processo e dificultam a utilização de H_2 em escala real. Neste contexto, é interessante o uso de fontes renováveis e de baixo custo, como resíduos sólidos orgânicos e águas residuárias ricas em matéria orgânica, gerando o chamado hidrogênio de segunda geração.

Compostos ricos em celulose ou ligno-celulose têm sido estudados como fontes renováveis potenciais de substratos para a produção de hidrogênio, especialmente pela

celulose ser a biomassa mais abundante do planeta. Tais compostos compreendem resíduos florestais, resíduos da agricultura e o papel, por exemplo.

A utilização de papel como substrato para a geração de H_2 é atrativa, todavia, existem poucos resultados disponíveis na literatura sobre essa possibilidade alternativa. O uso do papel como substrato para a produção de hidrogênio pode ainda ser analisado como medida mitigatória para os atuais modelos de disposição de resíduos sólidos em aterros sanitários, uma vez que haverá reutilização do papel para a geração de energia.

Em suma, a produção de hidrogênio a partir da degradação de papel por microrganismos fermentativos apresenta vantagens como simplicidade operacional, além de ser atividade livre de poluição. Esta atividade pode ainda ser considerada duplamente vantajosa quando se diz respeito à preservação ambiental. Primeiro, porque a combustão do gás hidrogênio libera apenas energia e vapor de água, incomparável com os diversos compostos poluentes lançados na atmosfera pela combustão dos combustíveis fósseis. Segundo, pela utilização de resíduos de papel como substrato orgânico para fermentação, o que consiste em uma forma de contrabalancear o aumento da porcentagem de resíduos de papel dentre o total de resíduos sólidos dispostos em aterros sanitários nas últimas décadas.

2. OBJETIVOS

2.1. *Geral*

O objetivo geral dessa pesquisa foi avaliar a produção do gás hidrogênio por bactérias anaeróbias fermentativas, em reator de batelada, utilizando papel como substrato orgânico.

2.2. *Específicos*

Os objetivos específicos do projeto foram:

- Obter consórcio de bactérias anaeróbias fermentativas produtoras de gás hidrogênio a partir de inóculo proveniente de fluido de rúmen bovino;
- Comparar a produção de gás hidrogênio na presença e ausência da celulase em reatores anaeróbios em batelada alimentados com papel sulfite;
- Avaliar a produção de ácidos orgânicos e álcoois nos reatores anaeróbios.
- Caracterizar o consórcio microbiano por meio de técnicas de Microbiologia clássica e Biologia Molecular;

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. *Gás Hidrogênio: combustível e vetor de energia*

A utilização de combustíveis fósseis como a principal fonte de energia em todo o mundo apresenta desvantagens, considerando principalmente os aspectos ambientais. Tais combustíveis são recursos naturais não facilmente renováveis que, diante da exploração, podem rapidamente se esgotar. A combustão destes leva a alterações climáticas, degradação ambiental e até problemas de saúde pública (GUO et al., 2010). Entretanto, a demanda de energia é cada vez maior em todo o mundo (KAPDAN, KARGI, 2006).

O gás hidrogênio pode ser utilizado em uma variedade de aplicações, como por exemplo, combustível para motor de combustão interna ou como vetor energético para célula de combustível (KOTAY, DAS, 2008). Além disso, é 2,75 vezes mais energético do que os hidrocarbonetos (KAPDAN, KARGI, 2006). O grande interesse na implementação de H_2 como principal vetor energético em todo o mundo se deve ao fato de que a combustão desse gás é inofensiva ao ambiente, já que são liberados apenas energia e vapor de água, por não haver átomos de carbono na molécula (HAWKES et al., 2007). Diferentemente dos combustíveis fósseis, etanol e metano, o uso de H_2 pode contribuir para significativa redução dos impactos ambientais relacionados à geração de energia, pela diminuição da emissão de gases estufa, da chuva ácida e da depleção da camada de ozônio (KOTAY, DAS, 2008).

As características do H_2 descritas acima motivaram o desenvolvimento de metodologias viáveis para a produção desse gás, já que este elemento está ligado, em sua maioria, a moléculas de água e hidrocarbonetos, sendo apenas 1% na forma de hidrogênio molecular na natureza (SCHLAPBACH, ZÜTTEL, 2005).

3.2. *Produção Biológica de Hidrogênio*

Os processos físico-químicos utilizados para a produção de H_2 são de elevado custo e gasto energético, além de potencialmente poluentes.. Para exemplificar, alguns dos processos de produção de H_2 , usado como matéria-prima para indústrias, são a hidrólise de hidrocarbonetos, liberando água e gás carbônico, e a dissociação térmica direta da molécula de água, o que requer temperaturas maiores que 2.000 °C (SCHLAPBACH, ZÜTTEL, 2005). Essas características inviabilizam a utilização de H_2 como vetor energético em escala

mundial. Por outro lado, a produção biológica de H_2 fazendo uso de microrganismos é alternativa aos processos citados acima. Métodos biológicos de produção de hidrogênio incluem a biofotólise direta ou indireta da água, a foto-fermentação e fermentação da matéria orgânica (KAPDAN, KARGI, 2006).

Os processos biológicos de produção de H_2 podem ser realizados a temperatura e pressão ambiente, o que acarreta menor gasto energético. Outra vantagem desses processos é que ampla diversidade filogenética e fisiológica de microrganismos são capazes de produzir H_2 (NATH, DAS, 2004). A produção biológica de H_2 é decorrente da ação das enzimas hidrogenase e nitrogenase, que regulam o metabolismo de H_2 em incontáveis organismos procariotos e alguns eucariotos, incluindo as algas verdes (KOTAY, DAS, 2008). Segundo Chang et al. (2006), fisiologicamente, as hidrogenases são indispensáveis para a produção de H_2 por microrganismos. As hidrogenases são classificadas dentro de quatro grupos com base na sequência de proteínas: Ni-Fe hidrogenases (presente em bactérias aeróbias, anaeróbias e anaeróbias facultativas), Ni-Fe-Se hidrogenases (presente em bactérias redutoras de sulfato), Fe-Fe hidrogenases (presente em bactéria estritamente anaeróbia) e hidrogenase livre de metal (presente em arqueias metanogênicas) (DAS et al., 2006; JO et al., 2008). As principais hidrogenases que atuam na produção de H_2 são a Fe-Fe hidrogenase e Ni-Fe hidrogenase (CHIN et al., 2003; HALLENBECK, 2004; YOSHIDA et al., 2006; MAEDA et al., 2007; XING et al., 2008).

Resumidamente, a biofotólise envolve a decomposição da água pela luz, na presença de micro-algas ou cianobactérias, e a foto-fermentação refere-se à produção de H_2 a partir de matéria orgânica na presença da luz por bactérias fototróficas (KOTAY, DAS, 2008), de acordo com as equações (3.1) e (3.2), respectivamente.

Apesar dos baixos rendimentos de H_2 , a fermentação da matéria orgânica é o método mais promissor para produção de H_2 devido à elevada taxa de evolução do gás na ausência de luz, bem como pela diversidade de substratos usados pelos microrganismos nesse processo metabólico.

Pela via fermentativa, os microrganismos crescem pela oxidação parcial da matéria orgânica, gerando energia e biomassa. Esta oxidação libera elétrons que são neutralizados

pelos prótons, aceptores de elétrons disponíveis no meio, resultando em hidrogênio molecular pela ação das enzimas hidrogenases (NANDI, SENGUPTA, 1998). Os principais produtos resultantes da fermentação anaeróbia de produção de H₂ são ácido acético e ácido butírico (KAPDAN, KARGI, 2006). Para estimar os rendimentos teóricos de biohidrogênio, a reação de biotransformação de glicose a ácido acético é a mais aceita como referência (Eq. 3.3):

De acordo com essa reação, o rendimento teórico máximo obtido pela fermentação da glicose é de 4 mol H₂/ mol hexose (THAUER et al., 1977; SOLOMON et al., 1995). No caso do ácido butírico ser o principal composto orgânico formado, o rendimento teórico máximo passa para 2 mol H₂/ mol de hexose, segundo a reação (3.4) (THAUER et al., 1977):

A produção de H₂ somada à formação de ácido acético e ácido butírico é conhecida como uma rota metabólica típica de espécies de *Clostridium* no processo fermentativo (CHEN et al., 2005). As etapas detalhadas dos processos metabólicos de produção de ácido acético e ácido butírico estão ilustradas na Figura 3.1A e 3.1B, respectivamente. A substância-chave para a produção de hidrogênio a partir de matéria orgânica é a Acetil-CoA, produzida a partir do piruvato (reação 3.5). A acetil-CoA pode ser metabolizada tanto a ácido acético quanto a ácido butírico e, nos dois casos, a partir da re-oxidação de cada mol de ferredoxina, um mol de hidrogênio é gerado pela enzima hidrogenase. No caso da formação de ácido acético, um mol de hidrogênio extra é liberado a partir da redução de cada mol de NADH, produzido durante a glicólise, a NAD, levando a rendimento teórico de hidrogênio de 4 mol/ mol de glicose consumida. Quando o ácido butírico é formado, NADH produzido na glicólise é usado na oxidação de acetoacetil-CoA a ácido butírico, e portanto, o rendimento de hidrogênio teórico é 2 mols/ mol de glicose consumida.

Figura 3.1 – Etapas do metabolismo de glicose a (A) ácido acético e (B) ácido butírico
Fonte: modificada de Ntaikou et al. (2010)

O rendimento teórico máximo de 4 mol H_2 / mol de glicose pode também ser obtido via formação de ácido fórmico, por meio da enzima ferredoxina, cujas reações são as seguintes:

Essa última reação (3.6) é catalisada pela enzima piruvato-liase (KNAPPE et al., 1974), sendo típica do metabolismo de enterobactérias em condição anaeróbia, tais como *Enterobacter aerogenes* e *Escherichia coli* (NANDI, SENGUPTA, 1996). Outros compostos reduzidos resultantes do processo, tais como, etanol e butanol, por exemplo, são indesejáveis, pois implicam em menor rendimento de H_2 (GOTTSCALK, 1986).

Muitos fatores influenciam a atividade fermentativa para produção de H_2 , entre eles: inóculo, substrato, concentração de nutrientes, disponibilidade de elementos traço, pressão

parcial de H_2 e principalmente, temperatura e pH (van GINKEL et al., 2005; WANG, WAN, 2009).

A temperatura ótima da fermentação pode ser variável, porém, em geral, ocorre em faixa mesofílica (próximo a 37°C) (XING et al., 2008) e termofílica (próximo a 55°C) (VALDEZ-VAZQUEZ et al., 2005), sendo que na última condição tem-se obtido maior produção de H_2 (ADAMS, 1990). O pH também é fator muito importante pois pode afetar a atividade da enzima hidrogenase, bem como direcionar a rota metabólica dos microrganismos. Espécies de *Clostridium* sp. são capazes de alterar a rota metabólica de acidogênese para solvetogênese em baixo valor de pH, abaixo de 5, por exemplo, reduzindo os rendimentos de produção de H_2 (LAY, 2001). Kirkpatrick et al. (2001) relataram que em reatores com *Escherichia coli* em operação com pH menor do que 7, a geração de lactato como produto final da fermentação foi favorecida em relação à produção de outros ácidos orgânicos e H_2 .

A elevada pressão parcial de H_2 na fase líquida é um dos fatores que afetam a produção de H_2 . De acordo com Kim et al. (2006), a pressão parcial de H_2 , quando elevada, tem um efeito negativo na produção de H_2 por reduzir a atividade da hidrogenase e tornar a produção desse gás termodinamicamente desfavorável. Van Ginkel, Logan (2005) obtiveram produções elevadas de H_2 com mecanismos que reduziram as pressões parciais exercidas no *headspace*, tal como aspergir N_2 no meio líquido para evitar *stripping* de H_2 .

Os principais gêneros relacionados com a produção de H_2 são *Clostridium* e *Enterobacter* (HAWKES et al., 2002; NTAIKOU et al., 2010). Muitos estudos utilizam culturas puras para a produção de H_2 , justificando o uso pela possibilidade de se obter maiores rendimentos de H_2 , além de se controlar as condições operacionais, de forma a reduzir a produção de subprodutos indesejáveis da fermentação (LEVIN et al., 2006; NTAIKOU et al., 2009). Entretanto, algumas desvantagens estão relacionadas ao elevado custo de manutenção das culturas puras, sendo necessária condição asséptica de cultivo devido à alta sensibilidade a contaminações. Dessa forma, o uso de culturas mistas é favorável para aplicação em sistemas de grande escala, uma vez que não se faz necessário a esterilização do meio de cultura, tornando o processo mais simplificado e de menor custo. Ademais, é possível selecionar gama maior de substratos a serem utilizados (NTAIKOU et al., 2010).

3.3. Substratos para a Produção de Hidrogênio

Teoricamente, qualquer substrato orgânico rico em carboidratos, gorduras e proteínas poderia ser considerado possível para a produção de hidrogênio. Entretanto, os compostos orgânicos na forma de açúcares puros ou ricos em açúcares são os principais substratos para a produção de biohidrogênio via processo fermentativo. Lay et al. (2003) fizeram estudo comparativo com substratos de três diferentes composições químicas nas mesmas condições de operação e com o mesmo consórcio microbiano. Os autores detectaram potencial de produção de H_2 aproximadamente 20 vezes maior com resíduo composto de carboidrato, em comparação com aqueles de gordura ou proteína.

Os principais critérios para a seleção do substrato a ser utilizado são os seguintes: disponibilidade, custo, teor de carboidratos, visto que este leva à maior eficiência de produção e biodegradabilidade (KAPDAN, KARGI, 2006). A utilização de substratos prontamente assimiláveis, tais como, glicose, sacarose e lactose é ideal em termos de facilidade de utilização pelos microrganismos e rendimento de H_2 .

São muitos os estudos científicos com carboidratos simples e puros, usando tanto culturas mistas quanto culturas puras. Podestá et al., (1997) obtiveram $4,73 \times 10^{-8}$ mol H_2 / mol de glicose consumida em reatores em batelada com 20g/L de glicose em cultura pura de *Escherichia coli*. Em outro experimento, Lin e Chang (2004) obtiveram rendimento de 1,42 mol H_2 / mol de glicose com cultura predominante de *Clostridium* sp. em quimiostato com 20g/L DQO. Khanal et al., 2004 verificaram produção máxima de 300 mL H_2 / g DQO em reator em batelada com 6g/L de sacarose e cultura mista proveniente de composteira.

Maintinguer et al., (2008) e (2011) avaliaram a produção de H_2 em temperatura mesofílica para concentrações progressivas de sacarose e xilose, respectivamente. O rendimento máximo obtido foi 1,6 mol H_2 / mol do substrato e 0,8 mol H_2 / mol de substrato consumido no reator com 1.184 g/L de sacarose 3.588 mg/L de xilose, respectivamente. Tais açúcares são considerados substratos-modelo, porém a utilização destes eleva o custo da produção de H_2 e inviabiliza o processo em escala real (NTAIKOU et al., 2010).

O substrato ideal para produção de H_2 sustentável seria aquele com grande teor de carboidratos, obtido a partir de fonte sustentável, por exemplo, resíduos ricos em matéria orgânica, e de baixo custo, que requeresse mínimo pré-tratamento possível. É neste contexto que muitas pesquisas estão sendo realizadas com a celulose como substrato para produção biológica de hidrogênio (LAY, 2001; UENO et al., 2001; REN et al., 2007; REN et al., 2010).

3.3.1. Celulose e Resíduos Ligno-celulósicos

A celulose, que compreende de 30 a 50% em peso seco da biomassa vegetal, é o biopolímero mais abundante da Terra. Mundialmente, por ano, são produzidas 30 bilhões de toneladas de celulose terrestre (COX et al., 2000). A quantidade e disponibilidade de celulose fazem dela o melhor recurso renovável para a produção de energia (SCHWARZ, 2001).

A molécula de celulose, diferentemente de outros polímeros de glicose, como amido e glicogênio, é formada por uma cadeia de subunidades de glicose com ligações do tipo β -glicosídica. Um aspecto importante da celulose, relativamente incomum em polissacarídeos, é a estrutura cristalina que a molécula apresenta. Uma característica desse arranjo cristalino é que as microfibrilas são acondicionadas tão firmemente para prevenir a entrada, não apenas de enzimas, mas também de moléculas pequenas, como a da água, por exemplo (LYND et al., 2002). Embora a celulose forme uma estrutura cristalina distinta, o grau de cristalinidade pode variar de puramente amorfo a puramente cristalino, de acordo com a distribuição das fibrilas (LYND et al., 2002).

Figura 3.2 - Arranjo químico da celulose: polímero de β – glicose.

Fonte: <http://cvmnaturplas.dnsalias.com/>

A fermentação das subunidades de glicose presentes na celulose em H_2 é um meio de combinar degradação de biomassa com produção de energia. O interesse em obter resultados satisfatórios a partir da fermentação da celulose é justamente o fato dela compor ampla diversidade de substratos potenciais para a produção de H_2 . Parece ser economicamente viável

e tecnicamente praticável a produção de H_2 a partir de resíduos ligno-celulósicos, por meio de processo integrado que envolve pré-tratamento e hidrólise do substrato para otimizar a liberação de açúcares de menor complexidade, seguido da fermentação (LO et al., 2008; LO et al., 2009). A aplicação de pré-tratamentos do substrato celulósico não restringe a utilização de inóculos celulolíticos ou de linhagens celulolíticas, de forma que qualquer espécie capaz de fermentar glicose ou celobiose, por exemplo, pode ser utilizada. Alguns pré-tratamentos já descritos são os seguintes: mecânico (de VRIJE et al., 2009), hidrólise ácida (KÁDAR et al. 2003; 2004), hidrólise alcalina (CHAIRATTANAMANOKORN et al., 2009) e hidrólise enzimática com celulasas (LO et al., 2009; GUO et al., 2010). Dentre esses, a lise por celulase é a mais importante nos processos de tratamento de resíduos pela maior recuperação de energia se comparada com os métodos físicos ou químicos (REDDY et al., 2005; PAN et al., 2009). Além disso, a hidrólise ácida ou alcalina pode resultar em efluentes com compostos poluentes e/ou tóxicos.

Lo et al. (2009) fizeram ensaios de produção de H_2 com diversos substratos celulósicos puros (carboximetilcelulose, xilano, avicel e celobiose) e naturais (palha de arroz, bagaço de cana e capim). Primeiramente, os substratos foram incubados em meio com cultura de *Cellulosomas uda*, em temperatura que favorecia a atividade celulolítica, mas não o crescimento celular (45°C). Em seguida, o substrato hidrolisado, na forma de açúcares redutores foi incubado em meio com *Clostridium butyricum* CG55. O melhor rendimento obtido foi de $4,79 \text{ mmol } H_2 / \text{g açúcares redutores}$ a partir da fermentação do hidrolisado de carboximetilcelulase. Essa bactéria, que não sintetiza enzimas celulolíticas, foi capaz de produzir H_2 devido ao pré-tratamento enzimático aplicado ao substrato. Kádar et al. (2003; 2004) realizaram pré-tratamento ácido, seguido de incubação com celulase, para hidrólise de papel. O produto da hidrólise foi utilizado com sucesso como fonte de carbono para produção de H_2 por *Thermotoga elfii* e *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* em temperatura termofílica (60°C).

As bactérias fermentativas podem usar efluentes industriais e esgoto sanitário ricos em matéria orgânica, bem como resíduos sólidos, como fonte de carbono e energia, por exemplo. Dentre estes, há vasta quantidade de resíduos ligno-celulósicos que têm sido estudados como matérias-primas renováveis para a produção do chamado H_2 de segunda geração (NTAIKOU et al., 2010). Estes incluem resíduos florestais, como ripas de madeira (LEVIN et al., 2006); resíduos da agricultura, como bagaço de cana-de-açúcar (PATTRA et al., 2008), espiga de milho (PANAGIOTOPOULOS et al., 2009), palha de trigo (IVANOVA et al., 2009), entre outros; e até mesmo resíduos sólidos, como o papel (NTAIKOU et al., 2009).

Os resíduos sólidos domésticos podem se tornar abundante fonte de substratos orgânicos de baixo custo para produção de H_2 porque é composto de aproximadamente 70% de matéria orgânica, sendo o papel o principal componente (ZEIKUS, 1980; GIALLO et al., 1985)..

Troschinetz e Mihelcic (2009) fizeram estudo de caso com dados dos resíduos sólidos municipais de 19 países em desenvolvimento e compararam com aqueles dos Estados Unidos (EUA) e União Européia (UE). As porcentagens médias de papel no resíduo sólido municipal foram de 35%, 25% e 15%, nos EUA, UE e nos países em desenvolvimento, respectivamente. Estes resultados apontam elevada quantidade de resíduos de papel, mesmo com o avanço tecnológico e predomínio de meios digitais de comunicação e entretenimento.

O aumento do volume de resíduos gerados não seria um problema se eles fossem vistos como recurso e a partir disso fossem gerenciados apropriadamente (UNEP, 2001). A utilização de papel como reserva de carbono e energia permite a redução de resíduos a serem dispostos em aterros sanitários, o que pode mitigar problemas de falta de espaço e custo para manejo de resíduos urbanos, bem como possibilita agregar valores aos subprodutos da degradação desse substrato.

O papel como substrato orgânico já foi bastante estudado para diversas propostas. Saxena et al. (1992) usaram papel jornal como doador de elétrons para produção do combustível etanol, com a utilização simultânea do fungo *Trichoderma reesei* (celulase) e da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (atividade fermentativa). Houve aumento da produção de etanol com a elevação de 1% para 5% de substrato e, a produção máxima foi de aproximadamente 15 mg/L após 96h de incubação.

Lark et al. (1997) também estudaram a produção de etanol a partir de papel reciclado. Foram realizadas sacarificação e fermentação simultâneas do papel para a produção de etanol por ação de celulase obtida de fungo e da levedura *Kluveromyces marxianus*. Os autores obtiveram máximo de 35g/L de etanol a partir de 190g/L de substrato após 72h de incubação e rendimento de 72% na conversão de celulose a etanol. Schmidt et al. (1997) estudaram a produção de ácido láctico pela fermentação de papel realizada por *Lactobacillus delbrueckii* B445.

O uso de papel como substrato para produção de H_2 pela ação de bactérias anaeróbias tem sido estudado por alguns autores. Ntaikou et al. (2009) compararam a produção fermentativa de H_2 , por cultura pura de *Ruminococcus albus*, pela degradação de cinco diferentes tipos de papel. Os cinco tipos de papel avaliados foram os seguintes: lenços de papel (A), papel A4 (B), papel de revista (C), papelão (D) e papel de jornal (E). Os autores verificaram que a taxa de produção de H_2 e eficiência final variaram para cada tipo de papel.

Dentre esses, os que continham maior teor de celulose e menor de lignina foram os que apresentaram maior produtividade de H_2 ; ou seja, 282,76 LH_2 / kg de lenços de papel e 242,83 LH_2 / kg de papel sulfite. Além disso, nesses dois casos, os autores verificaram 100% de consumo de carboidratos (NTAIKOU et al., 2009). A possibilidade de bioconversão do papel em H_2 sem a aplicação de um pré-tratamento do substrato celulósico se deve ao uso da bactéria celulolítica *Ruminococcus albus*. Essa bactéria é originária do rúmen e tem capacidade de sintetizar enzimas celulases extracelulares responsáveis pela quebra de carboidratos complexos em açúcares solúveis e então metabolizá-los em H_2 , CO_2 , ácido acético, ácido fórmico e etanol (PAVSLOSTATHIS et al., 1988). Kádar et al. (2003) fizeram ensaios de produção de H_2 em temperatura termofílica (65°C e 70°C), usando lodo de papel hidrolisado como substrato orgânico, testando as bactérias hipertermofílicas *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* e *Thermotoga elfii*. A última apresentou maior rendimento de H_2 em comparação com a primeira, porém foi fortemente dependente da presença de extrato de levedura e sais minerais.

Kádar et al. (2004) também estudaram a produção de H_2 pela cepa *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* a partir de lodo de papel hidrolisado. Os autores aplicaram pré-tratamento do substrato papel: hidrólise ácida com ácido sulfúrico seguida de hidrólise enzimática com celulase. Foram comparados os rendimentos obtidos em ensaios com papel hidrolisado (glicose e xilose), além de glicose e xilose puras como controles. A taxa máxima de produção de H_2 a partir do papel hidrolisado foi de 5 a 6 mmol/ L.h, ou seja, menor em relação àquela observada para glicose, xilose e combinação desses açúcares, sendo obtido 9 a 11 mmol/ L.h. A produção máxima de H_2 obtida pela fermentação de glicose, xilose e hidrolisado de papel foi de 129,5; 138,1 e 85 mmol de H_2 , respectivamente.

A degradação de papel para produção de H_2 também foi realizada com sucesso com inóculo misto obtido de reator anaeróbio no estudo feito por Valdez-Vazquez et al. (2005). Esses autores realizaram ensaios em batelada de produção de H_2 pela fermentação anaeróbia de papel moído com culturas mistas obtidas de reator anaeróbio metanogênico de resíduos sólidos, a 37 °C. Após a evolução de H_2 atingir o platô de estabilização, os reatores foram despressurizados mais duas vezes subsequentes e submetidos à atmosfera de N_2 para a produção adicional de H_2 . Os dois platôs seguintes e a taxa de evolução de H_2 decresceram em cada ciclo subsequente de incubação, porém a quantidade total de H_2 produzida foi aproximadamente o dobro daquela produzida no primeiro ciclo, ou seja, 34 e 17 mmol H_2 / reator. A retirada de H_2 do *headspace* deve ter amenizado o efeito inibitório da elevada

pressão parcial de H₂ na atividade de algumas bactérias fermentativas, permitindo aumento na geração desse gás.

3.3.2. *Celulase*

A degradação natural da celulose se dá por hidrólise enzimática a partir de enzimas produzidas por microrganismos celulolíticos, que podem ser isoladas e comercializadas. Os microrganismos celulolíticos são capazes de digerir esse substrato insolúvel e de difícil degradação biológica pela síntese de notável variedade de enzimas denominadas celulases que hidrolisam diferentes partes da molécula. Tais enzimas são extracelulares e podem ser livres ou associadas às células (LYND et al., 2002). Há variedade de fungos e bactérias aeróbias e anaeróbias que produzem as celulases. Os microrganismos anaeróbios celulolíticos possuem um complexo multi-enzimático denominado celulosoma que ocorre na interface célula-substrato. O celulosoma está presente, por exemplo, em algumas espécies de *Clostridium*, tal como *Clostridium thermocellum* (BAYER et al., 1983; LAMED, BAYER, 1988; LYND et al., 2002). *Ruminococcus albus* compõe a microbiota celulolítica do rúmen pela síntese de enzimas hidrolíticas extracelulares capazes de degradar a celulose (PAVLOSTATHIS et al., 1988) e hemicelulose (DEHORITY et al., 1973). Essa bactéria tem se tornado alvo de estudo, pois além de degradar compostos celulolíticos, é capaz de fermentar açúcares a acetato, formiato, H₂ e CO₂, dependendo da condição de crescimento (NTAIKOU et al., 2008; 2009).

Três principais tipos de atividade enzimática são encontrados nos microrganismos: (i) endoglucanases ou 1,4 β-D-glucan-4-glucanohidrolases (EC 3.2.1.4), (ii) exoglucanases, incluindo 1,4 β-D-glucan glucanohidrolases (também conhecidas como cellodextrinases) (EC 3.2.1.74) e 1,4 β-D glucan celobiohidrolases (celobiohidrolases) (EC 3.2.1.91), e (iii) β-glicosidases ou β-glicosídeo-glicohidrolases (EC3.2.1.21) (LYND et al., 2002). As endoglucanases hidrolisam aleatoriamente a porção amorfa interna da cadeia de polissacarídeos da celulose, gerando oligossacarídeos de vários comprimentos e novas cadeias são formadas. As exoglucanases, por sua vez, processam as cadeias de polissacarídeos reduzidas e não reduzidas resultantes, liberando, tanto glicose (glucanohidrolases), quanto celobiose (celobiohidrolase) como principais produtos. As exoglucanases, ainda, podem agir na porção cristalina do polímero, presumivelmente descamando a estrutura cristalina da celulose. Por fim, as glucosidases hidrolisam celodextrina e celobiose em glicose (TEERI, 1997; LYND et al., 2002). As celulases se distinguem de outras hidrolases de açúcares pela

habilidade de hidrolisar as ligações β -1,4 glicosídica entre os radicais glicosil, responsáveis por unir a cadeia de glicose para formar a celulose (LYND et al., 2002). A ação das celulasas na quebra da molécula de celulose em monômeros de glicose está representada na Figura 3.2.

Figura 3.3 - Esquema da hidrólise enzimática da celulose

Fonte: modificado de Mathew et al. (2008)

Rezaei et al. (2008) realizaram um dos primeiros estudos, utilizando celulase para degradação de celulose e produção de energia elétrica. Neste trabalho foram feitos quatro experimentos com os seguintes substratos para 1,3 g/L DQO: celulose, celulase, celulose mais celulase e glicose (controle). A maior densidade energética obtida foi 100 mW/m² com celulose mais celulase, quando comparado com 12 mW/m² na ausência da enzima. Esse resultado com enzima foi muito próximo daquele obtido com glicose; ou seja, 102 mW/m². Portanto, ocorreu eficiente hidrólise enzimática da celulose.

Guo et al. (2010) também fizeram uso da celulase na produção de hidrogênio quando o substrato foi celulose ou resíduos de celulose. A primeira etapa do trabalho consistiu em produzir e isolar a celulase a partir da fermentação de resíduos de trigo e milho pelo fungo

Trichoderma viride, que é produtor desta enzima. Produzidas as celulases, estas foram aplicadas diretamente no processo de produção de H_2 pela celulose. O rendimento máximo obtido no processo foi de 122mL H_2 / g STV com 20g/L de substrato e tempo de cultivo de 53h.

Van Wyk e Mohulatsi (2002) realizaram experimento que consistiu em incubar em tampão acetato de sódio, concentrações crescentes de enzima (0,07-0,32 mg/mL) e de papel (2,5-60 mg/mL). Os papéis testados foram os seguintes: papel almaço (A), papel sulfite (B), papel filtro (C), papelão (D) e papel de jornal (E). Os melhores resultados de bio-conversão foram observados para os papéis A, seguido por B e C; todavia, para C e D ocorreu resistência à biodegradação, quando foram aumentadas gradativamente as concentrações de papel para uma mesma de enzima.

3.4. Microrganismos Produtores de Hidrogênio pela Via Fermentativa

As bactérias produtoras de H_2 são ubíquas sendo encontradas no solo, lodo de esgoto, lodo de reator anaeróbio, composteiras, esterco, lixiviado de aterro sanitário e até mesmo no rúmen. (WEIMER et al., 1990; MOHAN et al., 2008; WANG, WAN, 2009). Muitas dessas fontes têm sido utilizadas como inóculo. A utilização de culturas mistas para a produção de hidrogênio apresenta vantagens do ponto de vista econômico e operacional, uma vez que o processo é de simples operação e fácil controle. Além disso, é possível utilizar ampla variedade de substratos, entre eles, resíduos sólidos orgânicos e águas residuárias ricas em compostos orgânicos (WANG, WAN, 2009; NTAIKOU et al., 2010).

Apesar dessas vantagens, as culturas mistas anaeróbias são compostas de microrganismos, tais como as arqueias metanogênicas e bactérias homoacetogênicas, que rapidamente consomem o H_2 produzido pelas bactérias fermentativas acidogênicas. Isto implica na necessidade de submeter o inóculo à pré-tratamentos para eliminar o máximo possível de bactérias indesejáveis ao processo de produção de H_2 , e favorecer a manutenção das bactérias produtoras desse gás (WANG, WAN, 2008; NTAIKOU ET AL., 2010). O choque térmico é o tratamento mais comumente utilizado (KIM et al., 2006). Outros pré-tratamentos, tais como, ácido, básico, adição de compostos químicos e aeração já foram relatados em várias pesquisas (MOHAN et al., 2008, WANG, WAN, 2008).

Cheong, Hansen (2006) compararam cinco métodos de pré-tratamento para enriquecer cultura acidogênica proveniente de esterco bovino. Os métodos testados foram ácido,

incubação com 2-bromoetanosulfonato de sódio, choque-térmico úmido, choque térmico seco e congelamento/descongelamento. Os autores concluíram que o tratamento ácido foi o melhor dentre os métodos estudados. Maintinguer et al. (2011) realizou tratamento térmico em inóculo obtido de reator UASB usado no tratamento de água residuária de abatedouro de aves. Os autores obtiveram sucesso na inibição de arqueias metanogênicas e favorecimento das bactérias acidogênicas, dentre elas, *Clostridium* sp.

Para inibição das arqueias metanogênicas presentes no lodo anaeróbio usado como inóculo, os compostos químicos acetileno (1% v/v *headspace*) e 2-bromoetanosulfonato (BES – 25mM) foram adicionados em reatores diferentes para se comparar a eficiência de cada composto na inibição da atividade metanogênica. Ambos os compostos foram satisfatórios na inibição das arqueias metanogênicas, e concentrações similares de H₂, aproximadamente 34 mmol H₂, foram encontradas nos reatores, embora no reator com BES tenha sido pouco menor (VALDEZ-VAZQUEZ et al., 2005).

Entre as bactérias produtoras de H₂, os gêneros mais estudados são *Clostridium* sp. e *Enterobacter* sp. São inúmeros os estudos que utilizaram culturas puras com espécies desses gêneros para a produção de H₂. *C. butyricum*, *C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii*, *C. thermolacticum*, *C. tyrobutyricum*, *C. thermocellum*, e *C. paraputrificum* são exemplos de bactérias anaeróbias estritas, formadoras de endósporo, capazes de produzir H₂ (LEVIN et al., 2006; LIN et al., 2007; CHONG et al., 2009; LO et al., 2009). *Clostridium beijerinckii* que era conhecida como eficiente para produção de butanol (EZEJI et al., 2003; LEE et al., 2008), foi descoberta recentemente como espécie produtora de H₂ (HATCH, FINNERAN, 2008; KIM et al., 2008; PAN et al., 2008). Entre as bactérias anaeróbias facultativas, as espécies mais estudadas são *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes* e *Enterobacter cloacae* (TANISHO, ISHIWATA, 1994; KUMAR, DAS, 2001).

As bactérias do gênero *Clostridium* sp. são bacilos Gram positivos formadores de endósporos, capazes de fermentar compostos orgânicos a ácido acético, ácido butírico, H₂ e CO₂ como subprodutos principais (LIN et al., 2007). A maioria das bactérias desse gênero é endósporo positivo. Os endósporos correspondem a estruturas de resistência capazes de suportar condições adversas de temperatura, pH e presença de compostos tóxicos, por exemplo. Dessa forma, *Clostridium* sp. são em geral as populações dominantes em lodos anaeróbios acidogênicos que foram submetidos à pré-tratamentos antes de serem utilizados como inóculo para produção de H₂ (FANG et al., 2002; IYER et al., 2004).

Fontes de inóculo ricas em bactérias celulolíticas têm atraído atenção de pesquisadores no caso de produção de H₂ a partir da degradação de celulose ou resíduos ligno-celulósicos.

Por exemplo, o rúmen é fonte de ampla diversidade de microrganismos anaeróbios celulolíticos e fermentativos. As principais espécies de bactérias celulolíticas encontradas no rúmen são *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens* e *Fibrobacter succinogenes* (PETTIPHER, LATHAM, 1979). Por exemplo, bactérias celulolíticas provenientes do rúmen foram usadas em estudos de degradação de celulose (WEIMER et al., 1998), de produção de H₂ a partir da degradação de sorgo (NTAIKOU et al., 2008) e de hidrólise e fermentação de papel para produção de H₂ (NTAIKOU et al., 2009). Espécies de *Clostridium*, como por exemplo, *Clostridium beijerinckii*, também estão presentes no rúmen bovino (CHANG et al., 2010; HO et al., 2011).

Chang et al. (2010) avaliaram consórcio funcional, obtido do fluido de rúmen, para sacarificação e fermentação simultâneas de substratos celulósicos para produção de H₂. Para tanto, foram feitas diluições seriais em batelada para purificação do inóculo, usando gramínea como substrato, a 38 °C. Houve fermentação de açúcares redutores no meio, 27% advindos da hemicelulose e 2% da celulose, resultantes da degradação do substrato, e produção de H₂. A diversidade da cultura obtida nos reatores de batelada foi analisada por PCR/DGGE. Algumas bandas do gel de DGGE foram recortadas, clonadas e seqüenciadas. Foi constatada similaridade com *Clostridium xylanolyticum*, *Clostridium papyrosolvens*, *Clostridium beijerinckii*, *Ruminococcus* sp., entre outras. Segundo os autores, *Clostridium* foi dominante no sistema e contribuiu para a produção de biohidrogênio.

Ho et al. (2011) utilizaram consórcio microbiano obtido do rúmen para a produção de H₂ e bioetanol a partir de substrato celulósico. Para a purificação do inóculo em cultura celulolítica e produtora de H₂ foram realizadas repicagens subseqüentes. A produção máxima de H₂ foi de 90 mL pela fermentação de açúcares redutores advindos da hidrólise da gramínea em pó adicionada (1,5 massa/volume). A técnica de PCR/DGGE foi realizada para a análise da estrutura da comunidade microbiana presente nesse consórcio. A maioria das seqüências obtidas do fragmento RNA 16S de algumas bandas recortadas do gel de DGGE foi similar à espécies de *Clostridium*, dentre elas, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium puniceum* e *Clostridium xylanolyticum*. Segundo esses autores, os herbívoros têm sido selecionados como alvo para o estudo da degradação de ligno-celulose, entre eles, bovinos por se alimentarem de biomassa potencialmente energética e por conterem os microrganismos celulolíticos habitantes do rúmen.

Ho et al. (2011) realizaram ensaios para testar a capacidade celulolítica de cepas de *Clostridium puniceum* e *Clostridium xylanolyticum* isoladas do rúmen bovino, usando xilano, pectina e celulose como substratos. A cepa de *Clostridium xylanolyticum* degradou os três

substratos testados, e portanto, foi positiva para a expressão de xilanase, pectinase e celulase (endoglucanase). Por outro lado, a cepa de *C. puniceum* expressou atividade enzimática para xilanase e pectinase, todavia, foi negativa para endoglucanase. Entretanto, quando os autores realizaram ensaios de produção de H_2 com os isolados acima, usando glicose como fonte de carbono e temperatura de incubação 37 °C, foi observada elevada produção de H_2 e ácido butírico, além de outros ácidos e solventes por *Clostridium puniceum*. Todavia, para *Clostridium xylanolyticum* foi observado menor rendimento de H_2 , e elevada produção de solventes. O elevado rendimento de H_2 observado para *C. puniceum* levou os autores a julgarem essa cepa como uma das mais importantes produtoras de H_2 na cultura purificada do fluido de rúmen, ainda que ela não tenha apresentado atividade celulolítica. Segundo Ho et al. (2011), uma microflora celulolítica consiste de bactérias celulolíticas e não-celulolíticas que podem interagir sintroficamente para realizar variadas funções em um hábitat natural ou no reator de produção de H_2 , por exemplo.

Os microrganismos fermentativos produtores de H_2 são muito diversos em termos de substrato preferencial, pH e temperatura ideais (WANG, WAN, 2009). Estes parâmetros constituem as condições operacionais do sistema e não apenas determinam o crescimento dos microrganismos, mas também têm papel crucial na via metabólica a ser seguida por eles, afetando fortemente o rendimento final de H_2 obtido e os subprodutos orgânicos a serem gerados no processo (NTAIKOU et al., 2010).

Para exemplificar, o crescimento de *Clostridium beijerinckii* ocorre na presença de açúcar fermentável e requer uma mistura complexa de fatores de crescimento como aqueles presentes no extrato de levedura. Essa espécie é capaz de fermentar, entre substratos mais complexos, pectina, glicopiranosídeo, turanose e dextrina. Os principais produtos de fermentação são ácidos butírico e ácido acético, além de quantidade moderada de ácidos láctico e succínico. *Clostridium diolis* é capaz de crescer em meio mineral com carbono, contendo biotina como único fator de crescimento. Entre outros compostos orgânicos, é capaz de fermentar glicose, xilose e celobiose, liberando produtos como ácido acético e ácido butírico. *Clostridium puniceum*, ao contrário da maioria dos outros clostrídios, apresenta coloração geralmente Gram negativa, mas também é formadora de endósporos. Linhagens de *C. puniceum* são produtoras de H_2 em abundância, e os produtos de fermentação incluem os ácidos acético, butírico e fórmico, além de n-butanol. Assim como as espécies descritas acima, é capaz de fermentar pectina, e provavelmente essa é uma razão da existência dessas bactérias no rúmen bovino (KEYS et al., 2001; BIEBEL, SPROER, 2001).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Esquema Operacional

Os reatores anaeróbios foram operados em batelada com inóculo proveniente do fluido de rúmen bovino, após pré-tratamento ácido. Esse trabalho contou com três ensaios de produção de H_2 com diferentes concentrações de papel na presença da celulase. Ensaios controle sem adição da celulase foram realizados para fins de comparação (Figura 4.1).

Figura 4.1- Esquema operacional

4.2. Substrato

O papel sulfite (Chamex Multi - International Paper) foi utilizado como substrato na dimensão de 0,5 x 0,5 cm. Os fragmentos de papel foram transferidos para placas de petri com auxílio de pinça e esterilizados em autoclave a 121°C e 1 atm, por 20 minutos.

Para a caracterização do substrato foi colocado 0,05% em peso de papel em água ultra purificada (5g papel/ L água ultra-purificada) e deixado em repouso por 24 horas. Após esse período, o papel foi triturado nessa mesma água em liquidificador. Novamente, deixou-se de repouso por 4 horas a solução de papel triturado e água. Após esse período, o papel foi filtrado em bomba à vácuo, sendo o lixiviado resultante submetido à análises de DQO, carboidratos (glicose) e sulfato.

Segunda etapa de caracterização foi realizada dissolvendo-se papel em ácido sulfúrico concentrado em concentração 1g papel/L. Após alguns minutos, o papel foi totalmente hidrolisado pela ação do ácido sulfúrico. Essa solução-mãe foi utilizada para análises de DQO e carboidratos (glicose) para as concentrações 0,5g papel/ L; 2,0g papel/L e 4,0g papel/L (ANEXO III). Não foi realizada análises para detecção de outros açúcares redutores, além da glicose.

4.3. Celulase

A celulase utilizada foi isolada de *Trichoderma reesei* ATCC 26921 (1,4-(1,3:1,4)- β -D-Glucan 4-glucano-hydrolase Celluclast[®] 1.5L), comercializadas pela Sigma-Aldrich (G2730).

Para o cálculo da concentração de enzima adicionada em cada ensaio, levou-se em conta a quantidade teórica de unidades de enzima necessária para catalisar a quebra de toda a massa de celulose (em termos de papel) em glicose durante 1 hora. Para tanto, a partir da densidade da celulase foi possível calcular a massa de enzima contida no frasco comercializado de 50 mL. Cada mililitro da enzima é composto por 700 unidades e cada unidade é capaz de render 1 μ mol de glicose/hora, em pH 5,0 e temperatura de incubação 37 °C, de acordo com o Catálogo SIGMA Life Science (2011-2012). A quantidade em mililitro adicionada correspondeu à quantidade necessária de unidades de enzima em relação à massa de substrato adicionada para que todo o papel fosse quebrado em glicose em 1 hora.

Tabela 4.1 - Concentração de celulase adicionada nos ensaios com papel

Ensaio	Papel (g/L)	Papel ($\mu\text{mol/L}$) *	Celulase (mL/L)	Unidades Celulase
1	0,5	2.777	4,0	2.800
2	2,0	11.111	15,0	10.500
3	4,0	22.222	30,0	21.000

*Assumindo que massa de papel = massa de glicose

4.4. Meio Nutricional

Para o cultivo da biomassa celulolítica e fermentativa utilizou-se meio Del Nery modificado pela adição de extrato de levedura e das vitaminas biotina e B12 (Tabela 4.2). A concentração dos componentes adicionados no meio de cultura aplicado nos ensaios para 1 L de água purificada estão delineados na Tabela 4.2. O meio nutricional foi filtrado em sistema *Millipore* com membrana de poro 0,22 μm , previamente esterilizado em autoclave a 121°C e 1 atm, por 20 minutos.

Tabela 4.2 - Composição do Meio Del Nery modificado

Composição	Concentração (mg/L)
Solução A	
NiSO ₄ .6H ₂ O	0,50
FeSO ₄ .7H ₂ O	2,50
FeCl ₃ .6H ₂ O	0,25
CoCl ₂ .2H ₂ O	0,04
Solução B	
CaCl ₂ .6H ₂ O	2,06
Solução C	
SeO ₂	0,14
Solução D	
KH ₂ PO ₄	5,36
K ₂ HPO ₄	1,30
Na ₂ HPO ₄ H ₂ O	2,76
Uréia	40
Extrato de Levedura	1000

Fonte: Del Nery (1987) modificado

4.4.1. Solução de Biotina e Ácido *p*-aminobenzóico

A composição da solução de vitaminas descrita por Widdel, Pfennig (1984) para 1000 mL de água ultra – purificada está delineada na Tabela 4.3. A solução-estoque de biotina e ácido *p*-aminobenzóico foi preparada por meio da dissolução dos componentes em água ultra – purificada e esterilizada por filtração em sistema *Millipore* com membrana de poro 0,22 µm, previamente esterilizado em autoclave a 121°C e 1 atm por 20 minutos. Procedeu-se a distribuição da solução em frascos de antibióticos (30 mL), sob fluxo de N₂ (100%) e condições de assepsia. Os frascos foram fechados com tampas de butila, lacrados e armazenados sob refrigeração a 4°C.

Tabela 4.3 - Composição da Solução de Vitaminas

Composto	Concentração (mg/L)
Ácido <i>p</i> -aminobenzóico	40
Biotina	10
Água ultra-purificada	1000 ml
Fonte: Widdel, Pfenning (1984)	

4.4.2. Solução de Vitamina B12

A solução-estoque de vitamina B12 foi preparada pela dissolução de 8,0 mg desse reagente em 200 mL de água ultra - purificada. A solução foi esterilizada em sistema *Millipore* com membrana de poro 0,22 µm, previamente esterilizado em autoclave a 121°C e 1 atm durante 20 minutos. Procedeu-se a distribuição da solução em frascos de antibióticos (30 mL), sob fluxo de gás N₂ (100%) e condições de assepsia. Os frascos foram fechados com tampas de butila, lacrados e armazenados sob refrigeração a 4°C.

4.5. Inóculo

Para a obtenção de bactérias celulolíticas e fermentativas foi usado inóculo proveniente do fluido de rúmen bovino, cedido pela Embrapa-Pecuária Sudeste (Fazenda Canchim, São Carlos – SP). O fluido ruminal foi retirado *in natura* da porção do estômago do animal correspondente ao rúmen por meio de uma fístula permanente. O volume coletado foi filtrado em tecido de algodão para retirada do material ligno-celulósico grosseiro, e posteriormente transportado em vasilhame térmico. No laboratório fez-se o processamento do fluido ruminal para uso e armazenamento.

Figura 4.2 - Coleta do fluido ruminal: (A) Fístula permanente na porção do rúmen; (B) Retirada do material ligno-celulósico embebido no fluido ruminal; (C) Vasilhame térmico para transporte do fluido ruminal “*in natura*”; (D) Filtração do material celulósico para coleta do fluido ruminal

4.5.1. Processamento e Armazenamento do Inóculo

Em frascos de Duran® preparados com 20g de pérolas de vidro e 250 mL de solução de solubilização (Tabela 4.4), previamente esterilizada e mantida sob condição de anaerobiose, foram acondicionados 100 mL do fluido ruminal. Essa transferência foi realizada sob atmosfera de N_2/CO_2 (70/30%), mantendo-se ainda o sistema por mais 10 minutos nessa condição. Os frascos foram fechados com tampa de butila e rosca plástica e submetidos a agitação manual por 30 minutos em temperatura ambiente, a fim de proporcionar a homogeneização da amostra. Os frascos contendo inóculo foram estocados sob refrigeração a 4 °C (GIAJ-LEVRA, 1991). Esse material foi utilizado como inóculo para os ensaios de enriquecimento.

Tabela 4.4 - Composição da Solução de Solubilização

Composição	Volume (mL)
Resazurina	0,25
$NaHCO_3$ 10%	2,50
$Na_2S \cdot 9 H_2O$ 5%	2,50
Água Ultra purificada	245
Atmosfera Gasosa	N_2/CO_2 (70/30%)

Fonte: Gijaj-Levra (1991)

4.5.2. Pré-tratamentos do Inóculo

Com o intuito de eleger o melhor tratamento do fluido ruminal para a eliminação das bactérias consumidoras de H_2 e seleção das bactérias produtoras do H_2 , o inóculo foi submetido a diferentes pré-tratamentos (Kim et al., 2006; Mohan et al., 2008; Wang, Wan, 2008). Os pré-tratamentos aplicados estão descritos na Tabela 4.5.

Tabela 4.5 - Pré-tratamentos aplicados no fluido ruminal

Pré-tratamento	Condição	Referência
Aeração	Aerar o inóculo por 1 hora (modificado)	Modificado de Mohan et al. (2008)
Ácido	Ajustar o pH para 3 com HCl 1M por 24 h	Wang, Wan (2008)
Alcalino	Ajustar o pH para 10 com NaOH 1 M por 24 h	Wang, Wan (2008)
Térmico	Aquecer o inóculo a 90 °C por 15 min	Kim et al. (2006)

Para cada pré-tratamento, foram utilizados 200 mL de fluido de rúmen que estava armazenado em geladeira após o processamento. Esse volume de fluido de rúmen foi transferido para um béquer, e então foi submetido a um tratamento. No caso da aeração, fluido de rúmen foi submetido ao fluxo de O_2 durante 1 hora, e posteriormente, foi aplicado nos ensaios subsequentes. O tratamento ácido consistiu em diminuir o pH do fluido de rúmen para 3,0 e mantê-lo nessa condição por 24 horas. Após esse período, o pH foi aumentado para 7,0 e o inóculo foi aplicado nos ensaios subsequentes. No tratamento alcalino, o pH do fluido de rúmen foi aumentado para 10,0 e mantido nessa condição por 24 horas. Após esse período, o pH foi corrigido para 7,0 e o inóculo foi aplicado nos ensaios subsequentes. O tratamento térmico, por sua vez, consistiu em submeter o fluido de rúmen à temperatura de 90 °C por 15 minutos. Esse inóculo tratado foi aplicado nos ensaios subsequentes.

As quatro amostras de fluido de rúmen obtidas após cada pré-tratamento foram aplicadas como inóculo em ensaios para testar a eficiência do pré-tratamento na inibição de arqueias metanogênicas e no enriquecimento de bactérias produtoras de H_2 . Os ensaios foram realizados em reatores de 100 mL com 50% de volume reacional, incluindo 10% do inóculo

(v/v) e 50% de *headspace* (N₂, 100%). O meio Del Nery modificado foi utilizado com adição de 0,5 g/L de celulose. Todos os reatores foram incubados a 37° C. O pré tratamento mais eficiente, capaz de inibir microrganismos consumidores de H₂ em um longo período de tempo, foi selecionado para aplicação nos ensaios de produção de H₂. O inóculo pré-tratado selecionado foi enriquecido por meio de constante reativação da biomassa, com adição de 2 g/L de celulose e 10 mL/L de celulase em meio Del Nery modificado. Após crescimento da biomassa, essa passou a ser cultivada com papel e celulase para o uso em ensaios com celulase; e somente com papel para o uso em ensaios controle. O enriquecimento celular foi monitorado com análises esporádicas de produção de H₂ e microscopia de luz comum.

4.6. Enriquecimento e Manutenção do Inóculo Pré-tratado

A cada sete dias, uma duplicata de reatores anaeróbios de batelada era montada, a fim de enriquecer e aumentar a biomassa enriquecida. Foram preparados 2 litros (L) de meio Del Nery modificado, conforme descrito na Tabela 4.1, para alimentar dois reatores de 1L de volume reacional, contendo 0,5 g/L de papel como substrato orgânico e 4 mL/L de celulase. Sob condições assépticas foram adicionados 10% (v/v) de inóculo pré-tratado. Após a inoculação, os reatores foram submetidos à atmosfera de N₂ (100%), durante 20 minutos, para manutenção das condições de anaerobiose. Após a distribuição do meio de cultivo e do inóculo, e troca gasosa no *headspace*, os reatores foram fechados com tampa de butila e rosca plástica, e incubados a 37° C por sete dias. Para esses reatores foram realizadas análises de produção de H₂ a fim de verificar se o enriquecimento do inóculo foi eficiente, além de exames microscópicos da biomassa. Foi também montada duplicata de reatores com meio Del Nery modificado, contendo 0,5 g/L de papel, contudo sem a adição de celulase, para a manutenção da biomassa usada nos ensaios controle (sem celulase). Uma vez detectado o crescimento da biomassa e a produção de H₂, a biomassa era armazenada a 4 °C para posterior reativação.

4.7. Reativação da biomassa enriquecida

A três dias de se iniciar cada ensaio de produção de H₂, nos quais foram testados diferentes concentrações de papel, a biomassa enriquecida, mantida a 4 °C, foi reativada em

reator anaeróbio com 1L de meio Del Nery modificado, 0,5 g/L de papel e 4mL/ L de celulase. Para tanto, a biomassa purificada (10% v/v) foi transferida para frascos apropriados (50 mL) e submetida à lavagem, em meio de cultura estéril, em centrífuga refrigerada a 4° C, a 8.500 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* (biomassa) suspenso em meio de cultivo novo, sendo transferido para frasco de Duran ® sob condição de assepsia. Os reatores anaeróbios de batelada (2 L) continham 1L de volume reacional e 1L de *headspace*, este submetido à atmosfera de N₂ (100%) por 20 minutos. Os reatores foram incubados a 37°C, sem agitação, por 72 horas. Para a reativação da biomassa usada nos ensaios controle, os reatores foram igualmente montados, excluindo-se a adição de celulase.

4.8. Ensaios com reatores anaeróbios com papel sulfite, na presença ou ausência da enzima celulase

Foram operados reatores anaeróbios em triplicata para três condições distintas: (1) 0,5 g/L de papel sulfite e 4 mL/L de celulase; (2) 2,0 g/L de papel sulfite e 15 mL/L de celulase; (3) 4,0 g/L de papel sulfite e 30 mL/L de celulase. Para todas as condições testadas, foram feitos reatores controle com as mesmas concentrações de papel, porém sem adição de enzima. Devido ao aumento de pressão resultante da produção de biogás nos reatores contendo enzima, os ensaios foram realizados em frascos Duran ® de 5L, sendo 1L de volume reacional e 4L de *headspace*, cuja atmosfera original constitui-se de N₂ (100%). Foram preparados, para cada ensaio, 4L de meio Del Nery modificado, distribuídos em quatro reatores anaeróbios de batelada, 3 contendo papel e celulase, e um controle sem a enzima. Em cada reator foi adicionado 10% v/v de inóculo previamente reativado. O pH no início do período de incubação foi 7,0 e a temperatura de incubação foi 37 °C. Nesses ensaios foram efetuadas as seguintes análises: determinação de H₂ por cromatografia gasosa; ácidos voláteis, alcoóis e acetona por cromatografia líquida; sólidos totais voláteis (STV); consumo de papel sulfite, usando a glicose como padrão; exames microscópicos e análises de Biologia Molecular, tais como, PCR/DGGE, clonagem e seqüenciamento.

Os dados de produção acumulada de H₂ foram ajustados por meio da equação de Gompertz, modificada por Zwietering et al. (1990). O modelo de Gompertz modificado tem sido utilizado para descrever o progresso da produção cumulativa de H₂ e CH₄ em experimentos em batelada, baseado na relação entre crescimento e metabolismo bacteriano (LAY et al., 1997, 1999; Lay, 2001; CHEN et al., 2002; GUO et al., 2010). Dessa forma, a

partir da equação de Gompertz modificada foi possível estimar o Potencial de Produção de H₂ (P); Taxa Máxima de Produção de H₂ (R_m) e Tempo de Fase lag (λ). H e são os valores de produção acumulada de H₂ e tempo, respectivamente (Equação 4.1). Os gráficos com o ajuste estão apresentados no ANEXO IV.

$$H(t) = P \cdot \exp \left\{ - \exp \left[\frac{R_m \cdot e}{P} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (4.1)$$

4.9. Ensaios de Hidrólise Enzimática

Ensaios de hidrólise enzimática foram realizados, em duplicata, a fim de detectar a quantidade máxima de açúcares solúveis liberados na hidrólise da celulose presente na massa de papel adicionada, pela celulase, sem interferência de consumo por microrganismos. As concentrações de papel adicionadas nesses ensaios foram as mesmas utilizadas nos ensaios de produção de H₂, ou seja, 0,5 g/L; 2,0 g/L e 4,0 g/L. A quantidade de enzima adicionada para cada concentração de papel foi proporcional àquela usada nos ensaios de produção de H₂. Para a concentração 0,5 g/L, foram preparados 250 mL de meio Del Nery modificado (Tabela 4.2), no qual foi adicionado 0,125 g de papel e 1 mL de celulase. Para as concentrações 2,0 g/L e 4,0 g/L, foram preparados 200 mL de meio Del Nery, no qual foi adicionado 0,4 g de papel e 3 mL de celulase e 0,8 g de papel e 6 mL de celulase, respectivamente. Os ensaios foram realizados sem agitação, em temperatura de incubação 37 °C, pH inicial 7,0, e sob atmosfera anaeróbia de N₂ (100%). Não houve adição de microrganismos nesse ensaio, pois o objetivo foi analisar a atividade enzimática sobre o papel. Amostras líquidas foram coletadas ao longo do tempo e centrifugadas para posterior análise da concentração de açúcares solúveis. O período de operação dos ensaios de hidrólise enzimática foi de aproximadamente 24 horas, uma vez que após esse período, as concentrações de açúcares solúveis detectadas se encontravam estáveis, ou seja, a hidrólise do papel havia cessado. Açúcares insolúveis, como a celulose, por exemplo, não foram contabilizados uma vez que as amostras foram centrifugadas.

Figura 4.3 - Esquema dos ensaios de hidrólise enzimática

4.10. Análises cromatográficas

4.10.1. Biogás

A composição do biogás no *headspace* foi determinada por meio de cromatografia gasosa (GC 2010 Shimadzu) com detector de condutividade térmica (TCD) e gás argônio como carreador. As temperaturas de operação do injetor, detector e coluna foram 30° C, 200°C e 230°C, respectivamente. Para análise da geração de H₂ nos reatores anaeróbios foi feita uma curva de calibração (ANEXO I).

4.10.2. Compostos Orgânicos em Meio Líquido

A determinação de ácidos voláteis e alcoóis foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Usou-se um sistema para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (SHIMADZU®) equipado com bomba LC-10ADVP, amostrador automático SIL-20A HT, forno CT-20A, dois detectores ligados em série: um detector de ultravioleta (UV) com arranjo de diodos do modelo SDP-M10 AVP, o detector por índice de refração RID-10A; além do controlado SCL-10AVP. A coluna utilizada foi AMINEX® HPX-87H (300 mm x 7,8 mm; BioRad) e software Class-VP (SHIMADZU®) para analisar os resultados. Os ácidos foram detectados pelo SDP-M10 AVP, e os alcoóis pelo RID-10A. Como fase móvel (FM) usou-se solução de ácido sulfúrico 0,005 M, e as condições operacionais da coluna foram de fluxo de 0,5 mL/ min e temperatura de 43°C.

O preparo da amostra consistiu em utilizar 2,0 mL de amostra a ser analisada e adição de 80 µL de solução de ácido sulfúrico 2M. Essa solução foi filtrada em membrana de acetato de celulose com poro de 0,2 mm, anteriormente à injeção no cromatógrafo.

4.11. Análise do Consumo de Carboidratos Solúveis Resultantes da Hidrólise do Papel

O consumo dos carboidratos solúveis resultantes da hidrólise do papel nos reatores anaeróbios de batelada foi determinado indiretamente por meio do método fenol – ácido sulfúrico de Dubois et al. (1956), adaptado de Herbert et al. (1971). A curva de calibração para a detecção de carboidratos solúveis no espectrofotômetro foi realizada usando glicose como padrão. O procedimento foi o seguinte: adicionou-se 1,0 mL de amostra, previamente centrifugada, em tubo de ensaio; adicionou-se 1,0 mL de solução de fenol (5%) e procedeu-se agitação; adicionou-se rapidamente, contra a superfície do tubo de ensaio, 5,0 mL de ácido sulfúrico concentrado; homogeneizou-se. Os tubos contendo essa mistura foram deixados em repouso, durante 10 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, foram colocados em banho-maria durante 15 minutos. Todo esse procedimento foi realizado em capela. A absorbância foi lida a 490 nm.

Foi efetuada uma curva de calibração para a análise de consumo, usando a glicose como padrão. As concentrações testadas variaram de 15,0 a 180 mg/L de glicose, e para valores acima de 180 mg/L há extrapolação do limite de detecção do espectrofotômetro (HATCH); tornando-se necessária a diluição da amostra. O comprimento de onda usado foi de 490 nm (Anexo II).

4.12. DQO

A análise indireta de concentração de matéria orgânica Demanda Química de Oxigênio (DQO) inicial e final de cada ensaio foi realizada de acordo com APHA (2005).

4.13. pH

O pH inicial dos ensaios foi ajustado em 7,0, com adição de soluções de HCl 1M e NaOH 1M. Foram realizadas leituras de pH das amostras líquidas coletadas durante o período de operação dos reatores (APHA, 2005).

4.14. Sólidos Totais Voláteis

A análise de Sólidos Totais voláteis foi realizada de acordo com APHA (2005).

4.15. Análises Microbiológicas

As análises microbiológicas foram realizadas com amostras provenientes dos reatores operados em batelada alimentados com papel para as condições estudadas.

4.15.1. Análises Microscópicas

Foram realizadas análises microscópicas das amostras dos reatores em microscopia óptica. Para a diferenciação dos organismos foi efetuada a técnica de coloração de Gram, conforme procedimento descrito em (DSM, 1981).

Amostras dos reatores foram examinadas em microscópio Olympus BX60, acoplado à câmera com captura de imagem e software Image Pro Plus. Para isso, em lâminas de vidro previamente limpas com álcool, foi colocada fina camada de Agar (2%). Após a solidificação do ágar, uma gota de amostra foi adicionada e recoberta com a lamínula.

4.15.2. Análises de Biologia Molecular

As análises de Biologia Molecular realizadas foram as seguintes: PCR-DGGE com recorte de banda e sequenciamento das amostras obtidas ao final dos ensaios de produção de H₂, testando quatro concentrações diferentes de papel. A clonagem e sequenciamento foi realizado somente para a biomassa final do ensaio de produção de H₂ com 4,0 g papel/L e 30 mL celulase/L.

4.15.2.1. PCR/DGGE

A avaliação da comunidade microbiana do Domínio *Bacteria* foi realizada, utilizando amostras do inóculo e dos ensaios de produção de H₂ com e sem celulase, testando as três concentrações diferentes de papel, pela técnica do PCR/DGGE, que consistiu em: a) extração do DNA conforme Griffiths et al. (2000) modificado; b) amplificação por reação em cadeia de polimerase, usando os primers demonstrados na Tabela 4.6 e condições descritas na Tabela 4.7; c) separação do fragmento alvo pela desnaturação parcial da dupla hélice, pela técnica de DGGE.

A comparação dos padrões de bandas de DGGE foi realizada, usando-se o coeficiente de similaridade por meio do programa *Bionumerics*. As bandas recortadas foram seqüenciadas em seqüenciador automático ABI Prims 310 (Applied Biosystem). As seqüências obtidas foram verificadas em software DNASTar e comparadas no banco de dados NCBI-BLAST.

Tabela 4.6 - *Primers* para PCR/DGGE do Domínio *Bacteria*

Domínio	Primers	Sequência 5' → 3'	Referência
<i>Bacteria</i>	968 F GC	5' – AAC GCG AAG	NIELSEN et al. (1999)
		AAC CTTAC CGC CCG	
		GGG CGC GCC CCG	
		GGC GGG GCG GGG	
		GCA CGG GGGG – 3'	
	1392 R	5' – ACG GG GGT GTG TAC – 3'	

Tabela 4.7 - Condições utilizadas na PCR para o DGGE

Domínio	Pré-Desnaturação	Nº. de Ciclos	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Final de Extensão	Resfriamento
<i>Bacteria</i> (NIELSEN et al., 1999)	94°C	35	94°C	55°C	72°C	72°C	4°C
	5 min	-	45 seg	45 seg	60 seg	5 min	-

4.15.2.2. Clonagem e Sequenciamento do gene *RNAr 16S*

A análise da diversidade microbiana foi realizada para a amostra obtida ao final do ensaio de produção de H_2 que continha 4g/L de papel e 30 mL de celulase, uma vez que apresentou maior eficiência de produção de H_2 . O DNA foi extraído segundo protocolo de Griffiths (2000) modificado. Fragmentos do gene RNA ribossomal 16S foram obtidos pela metodologia de amplificação por PCR, usando como molde o DNA genômico extraído diretamente da biomassa purificada. Os *primers* usados para a reação de PCR foram 27F e 1100R (LANE, 1991), descritos na Tabela 4.9.

Tabela 4.8 - Soluções para amplificação usando os *primers* 27F e 1100R

Reagentes	Concentração	Quantidade para 1 amostra
Água ultrapura	-	3,0
Tampão PCR Invitrogen®	10 X	5,0
MgCl ₂	50 mM	1,5
Dntp	2 mM	5,0
Primer 27 F	100 pmol/uL	0,5
Primer 1100 R	100 pmol/uL	0,5
Taq DNA Polimerase Invitrogen ®	5U/uL	0,5
Amostra	100 ng	2,0

Tabela 4.9 - *Primers* para amplificação da região RNAr 16S

Domínio	<i>Primers</i>	Sequências (5'-3')	Referência
<i>Bacteria</i>	27F	5' – AGA GTT TGA	LANE (1991)
		TCC TGG CTC AG	
	1100R	– 3'	
		5' – AGG GTT GCG CTC GTT – 3'	

A clonagem em células competentes de *E. coli* foi realizada, utilizando os produtos de PCR e vetor plasmidial pGEM *Easy Vector System* I. Primeiramente, procedeu-se a adenilação dos fragmentos, utilizando-se 3µL de produto de PCR purificado; 1µL de tampão com MgCl₂; 1uL de dATP; 1 µL de Taq polimerase e 4µL de água ultra purificada e esterilizada. Foram incubados a 70°C por 30 minutos.

Para a ligação do DNA ao vetor pGEM foram utilizados 5 μ L – 2X Rapid Ligation Buffer, 1 μ L de vetor pGEM; 2 μ L do produto de PCR adenilado; 1 μ L T4 DNA ligase e 1 μ L de água ultra-purificada e esterilizada. Misturou-se a reação com pipeta e incubou-se por 1 hora a temperatura ambiente.

Para realizar a transformação, 2 μ L do produto de ligação foram misturados com as células competentes, que se encontravam em banho de gelo. As células foram aquecidas em banho-maria a 42°C durante 50 segundos, sem agitação. Posteriormente, o tubo foi agitado manualmente e mantidos em banho de gelo por 2 minutos, seguido da adição de 200 μ L de meio Luria-Bertani (meio LB) (Tabela 4.10) e incubação do mesmo por 45 minutos, sob agitação (150 rpm).

Após esse período, 150 μ L do produto de transformação foram semeados em placa de Petri, contendo meio de cultivo LB sólido previamente preparado. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Cada placa de Petri continha: 25 mL de meio de cultivo LB, ampicilina, IPTG e X-GAL, e foram preparadas como descrito na Tabela 4.11.

Tabela 4.10 - Composição do Meio de Cultivo Luria-Bertani

Nutrientes	Concentração (g/L)
Triptona	10
Extrato de Levedura	5
NaCl	5
Ágar	10

Tabela 4.11 - Componentes adicionados ao meio de cultivo Luria-Bertani

Componentes	Volume
Ampicilina	28 μ L (0,05 g/ mL)
IPTG	47 μ L (23 mg/ mL)
X-gal	64 μ L (40 mg/ mL)

Após 24 horas de incubação, as placas foram retiradas da estufa e colocadas na geladeira a 4°C por 1 hora para intensificação da cor das colônias azuis, que não foram utilizadas.

Com o auxílio de ponteira esterilizada, em fluxo laminar, apenas as colônias brancas foram pinçadas e transferidas para meio LB líquido (5 mL), contendo 3 µL de ampicilina (50 mg/L) e incubadas por 16 horas a 37°C em câmara de germinação com agitação de 150 rpm.

Decorrido esse período, os tubos que apresentaram turvação do meio foram selecionados para a etapa seguinte. Essa etapa consistiu na transferência de parte do meio turvo para outro tubo do tipo eppendorf®. Esse material foi centrifugado a 10.000 rpm à 4°C. A etapa de extração do DNA plasmidial não foi realizada. Ao invés disso, foi utilizado o par de *primers* descrito por Chun et al. (1995), detalhado na Tabela 4.12 para amplificação do DNA plasmidial.

O DNA de interesse foi recuperado por meio da amplificação por PCR, usando o set de *primers* M13 F e M13 R (CHUN, 1995) (Tabela 4.12), sob as condições do termociclador descritas na Tabela (4.13). Posteriormente, a amplificação dos plasmídeos foi verificada por eletroforese em gel de agarose. A purificação do produto da PCR foi feita com o Kit Illustra GFX PCR DNA e *Gel Band Purification* (GE Healthcare). Para a reação de sequenciamento foi usado o Big Dye Terminator (Applied Biosystem R) com nucleotídeos marcados. Foram utilizados 1 µL de Big Dye, 2µL de produto de PCR purificado, 1 µL de primer, 2 µL de tampão e 4 µL de água ultra-purificada e esterilizada, totalizando 10 µl. As condições do termociclador para essa etapa estão apresentadas na Tabela 4.14.

Tabela 4.12 - *Primers* para amplificação do DNA plasmidial

<i>Primers</i>	Sequência 5'-3'	Referência
M13 F	5' – CGC CAG GGT TTT CCC	CHUN (1995)
	AGT CAC GAC – 3'	
M13 R	5' – TTT CAC ACA GGA AAC	
	AGC TAT GAC – 3'	

Tabela 4.13 - Soluções para reação de sequenciamento com *primer* 27F

Componentes	Volume (µL)
Big Dye	1
Save \$	1
Primer 27F 10 pmol	3
Amostra (produto de PCR M13) purificado	2
Água ultra purificada	3

Tabela 4.14 - Programação do termociclador para reações de sequenciamento

Desnaturação	Anelamento	Extensão
94°C	50°C	60°C
15 seg	15 seg	4 min
	35 ciclos	

Para a precipitação do DNA foram adicionados 40 µL de isopropanol (65 %) em todos os tubos, os quais foram centrifugados a 14.000 rpm por 30 minutos a temperatura de 20°C. O isopropanol foi removido do tubo por inversão. Ao precipitado foram adicionados 200 µL de etanol (60 %). Novamente, centrifugou-se nas mesmas condições anteriores por 5 minutos. As amostras foram mantidas em temperatura ambiente, na ausência de luz até a evaporação total do etanol. Os *pellets* formados foram ressuspensos em 15 µL de formamida Hi-Di e submetidos a choque térmico (94°C por 4 minutos e 4°C por 4 minutos) em termociclador, a fim de desnaturar o DNA.

A leitura das sequências de nucleotídeos dos clones foi realizada em analisador automático de DNA modelo ABI PRISM 310 (Applied Biosystem).

4.15.2.3. Análise das Sequências do gene RNAr 16S

O consenso das sequências obtidas foi realizado utilizando-se o programa “SeqMan” do *software* DNASTAR (Lasergene sequence analysis). Essas foram comparadas ao Banco de Dados NCBI-database para aproximação da identidade filogenética e elaboração da árvore.

A construção das árvores filogenéticas foi realizada pelo método de Neighbor-Joining (SAITOU; NEY, 1987), utilizando o programa MEGA versão 4.1 (KUMAR et al., 2008). Também foi aplicado o método de Bootstrap com 1000 replicatas para estimar a confiabilidade na topologia da árvore filogenética.

4.16. Balanço de Massa em termos de Demanda Química de Oxigênio

O valor de DQO referente ao papel foi obtido para os três ensaios a partir da análise da solução-mãe 1g/L de papel em ácido sulfúrico (ANEXO III). O valor de DQO do extrato de levedura foi também analisado a partir da solução 1g/L de extrato de levedura em água. Em relação aos subprodutos orgânicos, a DQO foi estimada a partir da concentração desses subprodutos detectada na análise cromatográfica por HPLC. Para completar, a DQO da

celulase foi analisada a partir da solução-mãe de 10mL/L dessa enzima em água ultra-purificada (ANEXO III).

Os valores de DQO inicial teórica foram estimados para os três ensaios e comparados com o valor de DQO inicial real (detectado). Foi aplicado teste *t* de student com nível de significância de 5% para averiguação dos resultados de DQO inicial estimada e DQO inicial detectada. Não houve diferença significativa entre esses valores. Para o cálculo da DQO final de cada composto presente no meio, foram estimados os valores de DQO da concentração remanescente de glicose no meio e dos subprodutos orgânicos detectados. O extrato de levedura foi considerado como totalmente consumido no processo. A DQO da celulase foi estimada pela subtração da DQO final real detectada daquela estimada para o papel (glicose remanescente) e subprodutos orgânicos. Não foi possível estimar um valor teórico de DQO referente à concentração de celulase remanescente ao final do ensaio, pois não foi realizada análise específica para detecção dessa enzima no meio. No entanto, a dedução do valor de DQO final estimado para a celulase é suportado pela análise estatística realizada com os valores de DQO inicial estimado e detectado, indicando que não há diferenças significativas a nível de 5% ($p > 0,05$). Além disso, não foi realizada análise para detecção da concentração de outros carboidratos, que não a glicose, possivelmente resultantes da hidrólise do papel pela celulase.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização do Papel

Os valores de carboidratos solúveis totais e DQO para o filtrado da solução contendo água ultra purificada e papel triturado (0,5% massa/volume) estão apresentados na Tabela 5.1. Não foi detectada a presença de sulfato no filtrado para essa concentração de papel. As concentrações de carboidratos solúveis e DQO da solução papel em ácido sulfúrico concentrado para as três concentrações de papel utilizadas nos ensaios de produção de H₂ estão expostos na Tabela 5.2.

Tabela 5.1 - Caracterização do filtrado resultante da solução de papel triturado e água ultra-purificada

Lixiviado	Carboidratos Solúveis (mg/L)	DQO (mg/L)
0,5% (massa/volume)	104 mg/L	150,52 mg/L

Tabela 5.2 - Valores de carboidratos solúveis e DQO da solução de papel em ácido sulfúrico concentrado

Concentração de Papel	Carboidratos Solúveis (mg/L)	DQO (mg/L)
0,5 g/L	351	604
2,0 g/L	1.140	2.235
4,0 g/L	2.822	4.410

As concentrações de carboidratos solúveis detectadas nos ensaios de hidrólise enzimática (367,6 mg/L; 1.291 mg/L e 3.450 mg/L para 0,5 g/L; 2 g/L e 4 g/L de papel, respectivamente) foram semelhantes àsquelas obtidas após a hidrólise ácida do papel pela ação do ácido sulfúrico. Em relação à diferença entre os valores de DQO e carboidratos solúveis, provavelmente, outros compostos orgânicos resultantes da hidrólise ou presentes no papel contribuíram para o incremento desse valor de DQO, todavia, não foram analisados nessa pesquisa.

5.2. Caracterização do Consórcio Microbiano

Dentre os pré-tratamentos testados no inóculo, aquele em que a biomassa foi submetida ao tratamento ácido não foi observado presença de metano no biogás após período de incubação de 144 horas. Além disso, nessa condição foi obtida maior concentração de H_2 (19 mmol H_2 /L) em comparação com o tratamento alcalino (17 mmol H_2 /L). As culturas que foram submetidas ao tratamento térmico e aeração apresentaram metano no biogás, portanto, não foram usadas nesse trabalho. Dessa forma, o consórcio microbiano gerador de H_2 foi obtido do fluido de rúmen bovino, após aplicação de pré-tratamento ácido, para a inibição de bactérias consumidoras de H_2 , de acordo com Mohan et al., 2008.

No presente estudo, não houve detecção de metano no biogás de forma que o tratamento foi eficiente para a eliminação de arqueias metanogênicas e seleção de bactérias acidogênicas. O pré-tratamento ácido foi também realizado em outros estudos para obtenção

de biomassa geradora de H_2 (CHEN et al., 2002; LEE et al., 2009). Lee et al. (2009) aplicaram tratamento ácido no lodo anaeróbio utilizado como inóculo para produção de H_2 , testando os ácidos clorídrico, nítrico e sulfúrico. A biomassa foi submetida à incubação em pH 2 por 24 horas. Assim como no presente estudo, o tratamento com solução de ácido clorídrico 1M foi eficiente na inibição apenas das arqueias metanogênicas, selecionando as bactérias produtoras de H_2 .

A aplicação de pré-tratamentos em inóculos anaeróbios para inibição de bactérias consumidoras de H_2 e enriquecimento das produtoras é possível já que muitos bacilos formadores de endósporos, tais como, *Clostridium*, estão relacionados com a produção de H_2 (CHEN et al., 2002; MAINTINGUER et al., 2011). Os endósporos são estruturas de resistência às condições adversas de pH, temperatura e nutrientes (BROCK et al., 1994). Uma vez de volta às condições favoráveis de crescimento, cada endósporo gera uma célula vegetativa (MADIGAN et al., 2004). Muitos estudos já relataram que bactérias Gram positivas formadoras de endósporos sobreviveram aos pré-tratamentos aplicados e foram selecionadas de ambientes naturais (MOHAN et al., 2008; WANG, WAN, 2008).

Em trabalhos de produção de H_2 é geralmente necessário o pré-tratamento da biomassa anaeróbia para eliminar as arqueias metanogênicas, que estão presentes na maioria dos inóculos provenientes de ambientes, tais como reatores anaeróbios e rúmen, considerando essa origem de inóculo. As arqueias metanogênicas são sensíveis a condições adversas, como em pH ácido, crescendo favoravelmente em pH na faixa de 6,0 a 8,0 (SPEECE et al., 1996). Dessa forma, a diminuição do valor de pH da cultura é uma alternativa para a inibição desses microrganismos.

Nas amostras da biomassa proveniente dos reatores com papel, tanto na presença de celulase, quanto na ausência foi observada a predominância de bacilos (Figura 5.1). Na cultura pré-tratada foi observada a presença de endósporos (Figura 5.1.A; 5.1.B). Nas condições estudadas foi verificado predomínio de bacilos Gram positivos e presença de bacilos Gram negativos. Desse modo, tratamento aplicado foi satisfatório para a seleção das bactérias relacionadas com a produção de H_2 , como aquelas semelhantes a *Clostridium*, assim como descrito por Maintinguer et al. (2008; 2011).

Figura 5.1 - Microscopia óptica comum da biomassa de reatores com papel: (A) bacilos e endósporos terminais em reatores com enzima; (B) bacilos Gram positivos e Gram negativos em reatores com enzima; (C) bacilos e endósporos terminais no reator controle; (D) Bacilos Gram positivos e Gram negativos no reator controle

5.2.1. Caracterização Filogenética

5.2.1.1. PCR/ DGGE

A análise de PCR/DGGE foi realizada de forma a verificar as alterações ocorridas na estrutura da comunidade microbiana entre amostras do fluido de rúmen *in natura*, e da biomassa obtida nos ensaios de produção de H_2 (com celulase e sem celulase). O dendrograma, apresentado na Fig. 5.2, foi confeccionado pelo método de agrupamento UPGMA e com coeficiente de similaridade de Jaccard, a partir do padrão de bandas do DGGE com *set* de *primers* para o Domínio Bacteria.

Figura 5.2 - Dendrograma baseado no coeficiente de similaridade de Jaccard a partir do padrão de bandas do DGGE. I: inóculo do rúmen; CT 1: controle com 0,5 g/L de papel; CT 2: controle 2,0 g/L de papel; CT 3: controle com 4,0 g/L de papel; 1: 0,5 g/L de papel e 4 mL de celulase/L ; 2: 2,0 g/L de papel e 15 mL de celulase/L ; 3: 4,0 g/L de papel e 30 mL de celulase/L

Alteração de 78% foi observada entre as populações presentes no fluido de rúmen *in natura*, fonte de inóculo utilizada nesse estudo, e a biomassa obtida ao final dos ensaios com papel. Essa elevada porcentagem de dissimilaridade pode estar relacionada com o pré-tratamento ácido aplicado à biomassa do fluido de rúmen, a qual foi posteriormente utilizada nos ensaios de produção de H_2 . Esse tratamento, provavelmente, selecionou as populações de bactérias capazes de sobreviver em condições adversas, tais como as espécies formadoras de endósporos. Muitas espécies esporogênicas são descritas como habitantes do rúmen bovino (CHANG et al., 2010; HO et al., 2011).

De acordo com o coeficiente de similaridade de Jaccard, a estrutura da comunidade bacteriana dos ensaios 2 (2,0 g/L papel e 15 mL celulase/L) e 3 (4,0 g papel/L e 30 mL celulase/L) foi 73% similar entre si, porém apresentou similaridade menor, de 53%, com relação à comunidade do ensaio 1 (0,5 g papel/L e 4 mL celulase/L). Nos três ensaios, a biomassa foi submetida às mesmas condições de pré-tratamento, substrato e presença de celulase. No entanto, a maior concentração de papel e enzima nos ensaios 2 e 3, possivelmente, favoreceu outras populações de bactérias, devido à maior disponibilização de carboidratos solúveis para a fermentação. Por meio dessa análise, foi observada notável predominância comum de algumas bandas nos ensaios com celulase. Essas, provavelmente, referem-se à populações de bactérias fermentativas produtoras de H_2 , não necessariamente celulolíticas, que se beneficiaram com a presença da enzima adicionada para catalisar a hidrólise do papel em açúcares prontamente fermentáveis, tais como, glicose e celobiose, por exemplo.

A porcentagem de similaridade entre os ensaios CT 1 (0,5 g papel/L) e CT 2 (2,0 g papel/L) e todos os outros ensaios foi de 29%. Essa alta divergência na estrutura da comunidade microbiana pode estar relacionada ao favorecimento de populações fermentativas produtoras de H_2 nos ensaios com celulase, enquanto nos ensaios controle não foi observada produção de H_2 , provavelmente pela escassez de substrato disponível. Todavia, algumas populações mantiveram-se nas condições controle devido, provavelmente, à disponibilidade de extrato de levedura, prontamente assimilado para crescimento.

Entre os ensaios CT 1 e CT 2, a similaridade foi de 48%. Essa maior porcentagem de similaridade observada entre esses dois ensaios pode estar relacionada com a ausência de carboidrato prontamente fermentável. Dessa forma, o crescimento das populações produtoras de H_2 provavelmente não foi favorecido por falta de substrato solúvel para a fermentação, já que as bactérias presentes na cultura não apresentaram atividade celulolítica no período de operação dos reatores. Por outro lado, ainda que as condições de cultivo e operação desses ensaios foram as mesmas, é possível notar uma diversidade razoável (52%) entre a comunidade microbiana presente nos reatores dos ensaios CT1 e CT2. Essa diversidade pode ser decorrente dos diferentes períodos de incubação dos reatores, sendo 69 horas para CT 1 e 100 horas para CT 2. É provável que o maior tempo de operação dos reatores nos ensaios CT 2 e CT3, de 100 h e 168 h respectivamente, em comparação com o ensaio CT 1 (69 h) possibilitou seleção de populações de bactérias.

Ainda de acordo com o coeficiente de similaridade de Jaccard, verificou-se que o perfil de bandas do ensaio CT 3 (4 g papel/L) foi 44% similar àquele dos ensaios com enzima, embora não tenha sido detectada produção de H_2 no reator. (sem celulase). A maior similaridade detectada entre o padrão de bandas do ensaio CT 3 com os ensaios em que foi adicionada celulase pode ser resultante do maior tempo de operação desse reator. Polímeros complexos, tais como a celulose presente no papel, são de difícil degradação e provavelmente exigem maior período de incubação das bactérias até que sejam sintetizadas enzimas polissacarolíticas, nesse caso, a celulase. O tempo de operação de 168 h no ensaio CT 3 pode ter sido suficiente para a síntese de celulases e crescimento da biomassa fermentativa, porém insuficiente para a detecção de H_2 no biogás. É possível que o tempo de incubação dos reatores nos ensaios CT 1 e CT 2 não tenha sido suficiente para haver degradação da celulose presente no papel pelas bactérias presente no inóculo pré-tratado. Lay (2001), por exemplo, relataram tempo de fase *lag* superior a 144 horas em ensaios de produção de H_2 para 12,5; 25; 37,5 e 50 g/L de celulose fazendo uso de cultura mista celulolítica. A adição de extrato de levedura, uréia e outros elementos traço no meio de cultivo utilizado para todos os ensaios

favoreceu a manutenção de algumas populações nos reatores controle, mesmo na ausência de substrato orgânico solúvel originário da hidrólise do papel

Apesar de não ter sido observada produção de H_2 nos ensaios controle, durante o período analisado, as populações microbianas podem ser compostas de bactérias capazes de produzir H_2 , porém não o fizeram por não serem capazes de fermentar o substrato celulósico (papel). Em suma, as populações nos ensaios com enzima diferiram em 71% daquelas dos ensaios controle, pelo coeficiente de similaridade de Jaccard. Portanto, provavelmente, houve uma variação na comunidade microbiana entre o inóculo original e aquele proveniente dos ensaios, pela aplicação do pré-tratamento ácido, e também entre os ensaios com e sem celulase, que pode ser explicada pela diferença de disponibilidade de substratos solúveis para a fermentação e produção de H_2 .

Algumas bandas do DGGE foram recortadas, amplificadas e sequenciadas para aproximação da identidade filogenética (Figura 5.3).

Figura 5.3 - Perfil das bandas de DGGE de amostras dos reatores anaeróbios alimentados com papel, na presença e ausência da celulase.com *primer* específico para o Domínio *Bacteria*; (i) Inóculo; (CT 3) Controle 4 g papel/L; (3) 4 g papel/L e 30 mL celulase/L; (CT 2) Controle 2 g papel/ L; (2) 2 g papel/ L e 15 mL celulase/L; (CT 1) Controle 0,5 g papel/L; (1) 0,5 g papel/L e 4 mL celulase/L. As bandas indicadas e numeradas foram recortadas, sequenciadas e identificadas de acordo com a aproximação filogenética com sequências depositadas no GenBank

As sequências obtidas pela análise de sequenciamento do DNA das bandas re-amplificadas foram comparadas com sequências depositadas no GenBank e identificadas pela aproximação da identidade. As seis bandas recortadas foram identificadas como *Clostridium* sp., com similaridade acima de 95% (Tabela 5.3).

Tabela 5.3 - Sequências obtidas no GenBank relacionadas às bandas re-amplificadas do gel de DGGE

Banda	Acesso	Microrganismo	Similaridade (%)	Referências
1	HM217767	<i>Clostridium</i> sp.	96%	Dwidar et al. *
	DQ839378	<i>Clostridium</i> sp.	96%	Pan et al. *
2	DQ196629	<i>Clostridium</i> sp.	95%	Bowman et al., 2009
3	JF500020	<i>Clostridium</i> sp.	97%	Zhao et al. *
	AY862517	<i>Clostridium</i> sp.	97%	Fang et al., 2006*
4	GU727851	<i>Clostridium</i> sp.	95%	Dhakephalkar et al.*
	JF312646	<i>Clostridium</i> sp.	95%	Romano et al.*
5	GU727851	<i>Clostridium</i> sp.	98%	Dhakephalkar et al.*
	JF312646	<i>Clostridium</i> sp.	98%	Romano et al.*
6	EU376532	<i>Clostridium</i> sp.	98%	Jung, Chang *

* não publicado

As bandas identificadas como *Clostridium* sp. dos ensaios 1 e 3 tratam-se provavelmente das mesmas bandas encontradas em todos os outros ensaios, inclusive no inóculo (7). É possível inferir que essa banda refere-se a uma bactéria que superou o

tratamento ácido aplicado no fluido de rúmen, já que estava presente no inóculo original e se manteve na biomassa de todos os ensaios. Provavelmente, se trata de bactéria fermentativa versátil, do gênero *Clostridium*. A sequência referente à banda 1 foi 96% similar à sequência de uma cepa isolada de esterco de ovelha que foi usada para produção de ácido butírico em reator em batelada alimentado com sacarose (Dwidar et al., 2010, não publicado). A banda (4) foi similar à *Clostridium* sp. (95%) obtida de lodo de reator anaeróbico usado no tratamento de resíduo de destilaria, isolada e identificada por apresentar alto rendimento de produção de H₂ (DHAKEPHALKAR et al., 2010; não publicado).

A banda (2) do ensaio CT 1 foi também similar a *Clostridium* sp. A sequência referente à banda 2 foi 95% similar à sequência obtida por Bowman et al. (2009) em estudo de produção de H₂ por *Clostridium* sp. Bowman et al. (2009) testaram a capacidade de produção de H₂ por nove cepas isoladas e provenientes de água subterrânea contaminada com solventes clorados e de pH moderadamente ácido na presença de dicloroetano, tricloroetano e tetracloroetano. As cepas testadas foram capazes de produzir H₂ na presença dos compostos clorados para até 29,7 mM, 9,8 mM e 1,1 mM de dicloroetano, tricloroetano e tetracloroetano, respectivamente.

A banda (3), observada no ensaio 1, foi semelhante a *Clostridium* sp. (97%) observada também nas amostras de biomassa dos ensaios 2 e 3. Provavelmente, corresponde à bactéria relacionada com a produção de H₂ capaz de fermentar os açúcares resultantes da hidrólise do papel pela celulase. Zhao et al. (2011, não publicado) constataram a sequência referente à banda (3) em estudo de avaliação de *primers* degenerados para a detecção da diversidade do gene Fe-Fe hidrogenase, que é uma das enzimas responsáveis pela produção de H₂ em *Clostridium*. Da mesma forma, as bandas (5) e (6) puderam ser observadas em amostras dos ensaios com enzima e controle, sugerindo que essas cepas foram favorecidas nas condições operacionais aplicadas. A banda (5) foi similar à sequência identificada como *Clostridium* sp. (98%) constatada por Dhakephalkar et al. (2010, não publicado) e por Romano et al. (2011, não publicado). Esses últimos autores realizaram clonagem de amostra do biorreator e detectaram sequência identificada como *Clostridium* sp. ao estudar a dinâmica de bactérias produtoras de H₂ no processo fermentativo em bateladas sequenciais, usando sedimento de lago como inóculo (Romano et al., 2011, não publicado). A banda (6) foi similar à sequência identificada como *Clostridium* sp., que foi isolada de solo de vinhedo por Jung, Cheng (2008, não publicado).

Portanto, verificou-se que as bandas recortadas foram similares a *Clostridium*. Esse resultado é paralelo ao obtido na etapa de clonagem e sequenciamento, já que todos os clones

da amostra de biomassa do ensaio 3 foram similares a *Clostridium* sp. Este gênero está inserido no Domínio Bacteria, Filo Firmicutes, Classe Clostridia, Ordem Clostridiales, Família Clostridiaceae, Sub-família Clostridiaceae 1. Esse resultado é compatível com aqueles relatados por autores que também realizaram pré-tratamento de inóculo anaeróbio metanogênico para estudos de produção de H₂ (HAWKES et al., 2002; MAINTINGUER et al., 2008; HO et al., 2011; MAINTINGUER et al., 2011).

5.2.1.2. Clonagem e Sequenciamento do gene RNAr 16S

Por meio da clonagem e sequenciamento do gene RNAr 16S do consórcio microbiano presente na amostra de biomassa do ensaio 3 (4g papel/L e 30 mL celulase/L), foram obtidos oitenta e oito clones. Apenas o clone 66 não foi incorporado na análise filogenética por não possuir quantidade suficiente de nucleotídeos (valor inferior a 180 nucleotídeos) para ser comparado com a base de dados (NCBI). Os clones identificados estão descritos na Tabela 5.4. As demais sequências analisadas foram em média de 600-700 pares de base.

Tabela 5.4 - Sequências obtidas no GenBank relacionadas aos clones da amostra do ensaio 3

Nome	Clones	Acesso	Microrganismo	Similaridade (%)	Referências
Contig 1	1-7,	FM994940	<i>Clostridium</i>	99%	LIANG et al., 2010
	9-41,		<i>acetobutylicum</i>		
	43-72,	EU828404	Bactéria não cultivada	99%	ROEST et al *
	74-77,				
	79-88	GU727851	<i>Clostridium</i> sp.	98%	DHAKEPHALKAR et al*
Clone 8	8	EU828377	Bactéria não cultivada	98%	ROEST et al *
Clone 42	42	AB238859	<i>Clostridium</i> sp.	95%	SHIBATA, HAYASHI*
Clone 73	73	AY862517	<i>Clostridium</i> sp.	96%	FANG et al (2006)
Clone 78	78	AB511858	<i>Clostridium</i> sp.	95%	OHNISHI, BANDO*

* Não publicado

As 88 seqüências obtidas foram analisadas utilizando-se o software SeqMan. Tal análise resultou na formação de 5 clusters, sendo que 1 deles agrupou 83 seqüências (contig 1) e os outros 4 continham seqüências únicas.

Todos os clones analisados foram relacionados à microrganismos pertencentes aos gênero *Clostridium*. Tal gênero é composto por bacilos anaeróbios obrigatórios, Gram positivos na fase exponencial de crescimento, e a maioria das espécies são formadoras de endósporos ovais ou esféricos. Em geral, o crescimento é mais rápido na faixa de pH 6,5-7,0 e na faixa de temperatura 30-37 °C. São geralmente quimiorganotróficos, capazes de metabolizar carboidratos, alcoóis, aminoácidos, esteróides e outros compostos orgânicos, produzindo uma mistura de ácidos orgânicos e alcoóis, H₂ e CO₂ (LAY, 2001; 2003). As espécies do gênero *Clostridium* são conhecidas como produtoras de ácidos e geralmente fermentam a glicose em ácidos butírico e acético, além de CO₂ e H₂. De acordo com outros estudos (KIM et al., 2008; MAINTINGUER et al., 2011, ZHAO et al., 2011), as espécies de *Clostridium* são microrganismos dominantes em processos fermentativos de produção de H₂.

Muitas *Clostridium*, tais como, *C. butyricum* e *C. acetobutylicum*, requerem carboidratos fermentáveis, biotina e ácido amino-benzóico para o crescimento. Açúcar e vitaminas descritas como ideais para o crescimento de *Clostridium* sp. estavam presentes no meio de cultura utilizado nesse estudo. Ademais, o substrato e as condições de pH inicial e temperatura de incubação aplicados podem ter favorecido o predomínio desse gênero.

A sequência consenso obtida no contig 1, que reuniu 83 clones, foi 99% similar à *Clostridium acetobutylicum* identificada por Liang et al. (2010). Esses autores isolaram uma cepa com sequência similar àquela do Contig 1 obtida nesse estudo, em trabalho que investigou o desenvolvimento e as características de grânulo produtor de H₂ formado em reator anaeróbio acidogênico de batelada sequencial (AnSBR), alimentado com glicose. Segundo os autores, quando o lodo foi submetido à pré-tratamento para enriquecimento da biomassa acidogênica, sendo ele choque térmico seguido de tratamento ácido (pH 2 por 24 horas), o grânulo foi formado nos primeiros dez dias de operação do reator em pH 5,5. Em ensaios em batelada subsequentes, o isolado relacionado à *C. acetobutylicum* obteve rendimento de 1,15 mol H₂/ mol glicose. De acordo com KEYS et al. (2001), algumas linhagens de *Clostridium acetobutylicum* produzem carboximetil celulase e celobiase induzíveis, enzimas capazes de degradar a celulose e celobiose respectivamente. Em geral, produzem elevada quantidade de H₂, além de CO₂, ácido acético, ácido butírico, ácido láctico, etanol, n-butanol e acetona. Esses últimos na fase estacionária. De acordo com a elevada similaridade da sequência do Contig 1, que reúne 83 clones, com a espécie *Clostridium acetobutylicum* (99%), é provável que essa bactéria esteve presente no consórcio microbiano e pode ter contribuído para a geração de H₂, dos ácidos e solventes nos reatores anaeróbios para as condições estudadas.

O clone 8 foi identificado (foi similar) com 98% de similaridade a bactéria não cultivada, cuja sequência foi encontrada por Roest et al. (2008, não publicado). Esses autores estudaram os efeitos da troca de substrato, com e sem adição de CO₂, em uma comunidade microbiana em processo biológico de produção de H₂ e CH₄ em dois estágios. A bactéria foi isolada do reator de produção de H₂.

O clone 42 apresentou 95% de similaridade à sequência identificada como *Clostridium* sp. por Shibata, Hayashi (2005, não publicado). Os autores obtiveram essa sequência em estudo de análise de sequências nucleotídicas de *Clostridium* sp.

A sequência referente ao clone 73 apresentou 96% de similaridade à *Clostridium* sp. Fang et al. (2006) realizaram experimentos em reatores em batelada para produção de H₂, com 5,5 g/L de arroz como substrato. Os autores observaram rendimento de 346 mL de H₂/g

de carboidrato, além de ácido acético e ácido butírico como principais subprodutos. Baseado em análises do gene RNAr 16S, 28 clones foram obtidos do lodo acidofílico e todos foram associados ao gênero *Clostridium*. Assim como nesse estudo, no qual todos os clones foram também associados a esse gênero, os autores aplicaram pré-tratamento no lodo de digestor anaeróbio utilizado como fonte de inóculo (100 °C por 30 minutos).

O clone 78 foi 95% similar a *Clostridium*, descrita por Ohnishi, Bando (2009, não publicado). Essa sequência refere-se a uma bactéria Gram positiva isolada de reator fermentativo produtor de H₂.

Zhao et al. (2011) isolaram uma cepa fermentativa (RZF-1108) produtora de H₂, e identificaram-na como pertencente à *Clostridium* por meio de análises do gene RNAr 16S e de características físico-bioquímicas. A partir disso, os autores estudaram os efeitos das condições de cultivo na produção de H₂ pela cepa RZF- 1108 em ensaios em batelada. A evolução de H₂, taxa de produção e rendimento máximos foram obtidos em condição de pH inicial 7,0, volume de inóculo 8% e temperatura de incubação 35 °C. Foi observado que a adição de extrato de levedura como fonte de nitrogênio favoreceu o crescimento da cepa RZF-1108 e a produção de H₂. Algumas das condições citadas foram muito próximas ou as mesmas utilizadas no presente trabalho, em que as sequências das bandas e dos clones foram relacionadas ao gênero *Clostridium*. Os resultados desse estudo somado ao de Zhao et al. (2011) são paralelos ao relato de (KEYS et al., 2001) de que algumas espécies de *Clostridium* crescem na presença de açúcares fermentáveis e requerem mistura complexa de fatores de crescimento como aqueles presentes no extrato de levedura.

Lee et al. (2009) realizaram tratamento ácido com lodo anaeróbio advindo de planta de tratamento de esgoto doméstico, diminuindo o pH da cultura a 2 por 24 horas, testando três ácidos fortes: ácido clorídrico, ácido nítrico e ácido sulfúrico. Cada biomassa pré-tratada com os diferentes ácidos foi incubada em meio nutricional com glicose, em pH 5,5 e temperatura de incubação 35 °C. O tratamento com ácido clorídrico foi considerado eficiente para inibição da metanogênese, assim como observado nesse estudo. A biomassa obtida nessa condição foi a que apresentou maior rendimento energético se comparado com os outros ácidos testados. Com a aplicação da técnica FISH para averiguação da população bacteriana presente no lodo pré-tratado produtor de H₂, usando sondas específicas para *Clostridium* sp., os autores verificaram a predominância de espécies do cluster I de *Clostridium*. Esse resultado pode ser comparado com esse estudo, em que a biomassa produtora de H₂ também foi pré-tratada em pH 3 ajustado com ácido clorídrico 1M por 24 horas, no qual as sequências de todos os clones foram associadas à *Clostridium*.

Bactéria semelhante à *Clostridium* tem sido descrita como uma das mais eficazes produtoras de H₂ dentre aquelas pertencentes ao Filo Firmicutes. Desse modo, muitas espécies têm sido isoladas e estudadas (MORIMOTO et al., 2005; WANG et al., 2008; WANG, WAN, 2008; JO et al., 2010). Algumas espécies já citadas como produtoras de H₂ são as seguintes: *Clostridium thermocellum* (LEVIN et al., 2006); *Clostridium puniceum* (HO et al., 2011); *Clostridium acetobutylicum* (LIANG et al., 2010); *Clostridium butyricum* (CHEN et al., 2005); *Clostridium beijerinckii* (KIM et al., 2008), entre outras.

A árvore filogenética de consenso construída a partir de sequências obtidas da clonagem e sequenciamento da biomassa do consórcio microbiano utilizado no ensaio 3 e sequências do bancos de dados GenBank (Figura 5.4). Os valores dos coeficientes de similaridade verificados entre os clones e Banco de Dados NCBI, variaram de 95 a 99% e indicaram espécies relacionadas filogeneticamente a partir da avaliação parcial de sequências do gene RNAr 16S. Foram acrescentadas as sequências conhecidas de *Clostridium beijerinckii* (GQ375085; AB626806) e *Clostridium puniceum* (NR026105; X71857), por serem espécies presentes no rúmen bovino, como relatado por (HO et al., 2011); e como *outgroup* a sequência de *Pseudomonas* sp. (JN12168).

Figura 5.4 - Aproximação da identidade filogenética do consenso baseada nas seqüências dos clones da biomassa presente na amostra do ensaio 3. Os valores presentes nos nós da árvore indicam a porcentagem que o ramo se repetiu (1000 reamostragens de bootstraps). A barra de escala 0,05 indica a substituição de nucleotídeos por sítio. As seqüências de referência foram obtidas a partir do GenBank (NCBI)

As condições operacionais impostas no presente estudo favoreceram a seleção de microrganismos do gênero *Clostridium*, advindo do fluido de rúmen, reconhecido na literatura como gerador de H_2 . Chang et al. (2010) e Ho et al. (2011) também identificaram cepas de *Clostridium* a partir da clonagem e sequenciamento de bandas do DGGE em ensaios de produção de H_2 , cujo inóculo utilizado foi fluido de rúmen.

Chang et al. (2010) realizaram estudos para obter consórcio funcional para sacarificação e fermentação simultâneas de substratos celulósicos a partir do fluido de rúmen. Para tanto, foram feitas diluições seriadas em batelada para purificação do inóculo, com gramínea como substrato, a 38 °C. A cultura celulolítica e fermentativa foi obtida, e a composição dessa foi monitorada pelas análises de PCR/DGGE, clonagem do DNA das bandas e sequenciamento. Como resultado, os autores identificaram as seqüências como *Clostridium xylanolyticum*, *Clostridium papyrosolvens*, *Clostridium beijeirincii*, *Ruminococcus* sp., entre outras. Houve redução de açúcares redutores no meio, advindos da hidrólise da gramínea, e acúmulo de H_2 no *headspace*. Segundo os autores, o gênero

Clostridium foi dominante no sistema e contribuiu para a produção de biohidrogênio. O estudo de Chang et al. (2010) relaciona-se com o atual estudo em que as sequências das bandas e dos clones da biomassa purificada do fluido de rúmen foram associadas ao mesmo gênero.

Ho et al. (2011) utilizaram um consórcio microbiano obtido do rúmen para a produção de biohidrogênio e bioetanol a partir de substrato celulósico. Tratamento térmico foi aplicado no consórcio microbiano e, por meio de sequenciamento do gene RNAr 16S das bactérias presentes na cultura, foram identificadas espécies de *Clostridium*, por exemplo, *Clostridium beijerinckii* e *Clostridium puniceum*. Segundo os autores, a cultura era composta principalmente por *Clostridium* sp. Esse resultado provavelmente se repetiu no presente estudo, no qual as cepas produtoras de H₂ que resistiram ao tratamento ácido realizado foram todas associadas ao mesmo gênero.

Ho et al. (2011) realizaram ensaios para testar a capacidade celulolítica de duas cepas isoladas provenientes do rúmen, identificadas como *Clostridium* sp., usando xilano, pectina e celulose como substratos. Uma das cepas expressou atividade enzimática de xilanase e pectinase e foi negativa para endoglucanase. Esse resultado pode ser comparado com este estudo, já que as cepas identificadas como *Clostridium* sp. também não expressaram atividade celulolítica, o que pôde ser observado no ensaio controle, no qual não houve degradação do papel e produção de H₂. Entretanto, quando os autores realizaram ensaios de produção de H₂ com essa mesma cepa, usando glicose como fonte de carbono, foi observada produção de H₂, além de elevada produção de ácido butírico, outros ácidos e solventes. Tais resultados podem ser relacionados ao estudo atual, já que análises de clonagem e sequenciamento permitiram verificar predomínio de *Clostridium* sp. na biomassa purificada proveniente do rúmen bovino, o rendimento de H₂ foi elevado e houve produção principalmente de ácido butírico, além de outros ácidos e solventes.

5.2.2. Considerações sobre a Caracterização Filogenética

As análises de Biologia Molecular permitiram a identificação das bactérias presentes no consórcio microbiano obtido a partir do fluido ruminal após tratamento ácido. Essas bactérias foram responsáveis pela produção de H₂, CO₂, ácido butírico, entre outros subprodutos orgânicos. Todas as sequências das bandas recortadas e dos clones foram relacionadas ao gênero *Clostridium* sp. com similaridade maior que 95%. A presença de

clostrídios é condizente com os resultados obtidos nas análises físico-químicas e cromatográficas, uma vez que a produção de H_2 e CO_2 acompanhada da geração de ácido butírico e ácido acético é descrita como uma rota metabólica típica das espécies desse grupo.

5.3. Produção de Hidrogênio

Em todos os ensaios de produção de H_2 foram adicionados papel e volume proporcional de celulase; enzima que catalisa a hidrólise da celulose em glicose. Os ensaios controle não tiveram adição de celulase. Amostras de biogás e líquidas foram coletadas ao longo do tempo para análises de produção de H_2 , ácidos orgânicos e álcoois, consumo de substrato e pH. Ao final de cada ensaio foram realizadas análises de sólidos totais voláteis, e amostras da biomassa foram coletadas para análises de Biologia Molecular, como já apresentado anteriormente.

5.3.1. Produção de Hidrogênio

No ensaio 1 foram adicionados 0,5 g/L de papel sulfite e 4 mL/L de celulase. A duração desse ensaio foi de 69 horas, com pH inicial 7,0 e final de 4,6. A produção de H_2 se iniciou após 6 horas de incubação com 0,05 mmol e foi máxima após 21,5 horas, atingindo 21,4 mmol de H_2 . A partir de 21,5 horas de incubação, a concentração de H_2 se manteve estável até o final do ensaio (Figura 5.5 A).

No ensaio 2 foram adicionados 2,0 g/L de papel sulfite e 15 mL/L de celulase. O ensaio teve duração de 100 horas, com pH inicial 7,0 e final 3,7. A produção de H_2 se iniciou após 7 horas de incubação com 0,5 mmol e foi máxima após 72 horas com 56,4 mmol. A partir de 35,5 horas de incubação a concentração de H_2 manteve-se em torno de 55 mmol até o final do ensaio (Figura 5.5 B).

No ensaio 3 foram adicionados 4,0 g/L de papel sulfite e 30 mL/L de celulase. O ensaio teve duração de 168 horas, com pH inicial 7,0 e final 3,5. A produção de H_2 se iniciou após 6 horas de incubação com 3,6 mmol e foi máxima após 91 horas com 105 mmol. Após 90 horas de incubação a concentração de H_2 no *headspace* permaneceu estável até o final do ensaio (Figura 5.5 C).

Para os três ensaios realizados com adição de celulase, as porcentagens de H_2 e CO_2 no biogás, ao final do processo, foram semelhantes. Esse resultado é indício de que a produção

de H₂ se deu pela via do ácido butírico, na qual um mol de hexose gera a mesma proporção de H₂ e CO₂, como observado na reação 5.1.

Nos ensaios controle realizados para as três concentrações de papel, sem adição de celulase, a produção de H₂ foi menor que o limite de detecção do método cromatográfico. Portanto, é possível inferir que a adição da celulase foi necessária para a conversão do papel em carboidratos facilmente degradáveis, que foram os substratos utilizados para a produção de H₂ nos ensaios com enzima.

Figura 5.5 - Produção acumulada temporal de H₂: (A) 0,5 g/L + 4 mL/L celulase; (B) 2,0g/L + 15 mL/L celulase; (C) 4,0 g/L + 30 mL/L celulase. Os valores representam a média das triplicatas e desvio padrão

A fermentação se iniciou rapidamente, como pode ser visto pelo curto período de fase *lag* nos três ensaios com enzima (Tabela 5.3), e provavelmente, isso foi relacionado com a

adição de extrato de levedura no meio de cultura, a ação instantânea da celulase na liberação de carboidratos solúveis do papel, além de que os microrganismos passaram por aclimação nas mesmas condições do ensaio nas 72 horas antecedentes para reativação da biomassa. A relativamente rápida estabilização da produção de H_2 nos três ensaios provavelmente não foi devido à falta de substrato solúvel ou disponível no meio, já que foi observada concentração residual de carboidratos solúveis ao final do ensaio. Portanto, é possível que a estabilização tenha sido decorrente da diminuição do pH do meio de cultura resultante do processo fermentativo ou por inibição da biomassa pelo aumento da pressão parcial de H_2 (Figura 5.10).

No ensaio 1, o valor de pH já havia diminuído para 5,0 com 11 horas de operação, e com 17 horas, esse valor já era menor que 5 (Figura 5.6 A). No ensaio 2, o pH já se encontrava abaixo de 5,0 com 29 horas de operação (Figura 5.7 A). O pH já estava menor que 4,0 com 80 horas de operação do reator no ensaio 3 (Figura 5.8 A). Nesses tempos de operação citados para os três ensaios, a produção de H_2 estava na fase exponencial, em que a fermentação ocorria plenamente, o que explica a diminuição do pH decorrente da produção de ácidos orgânicos no meio. É possível verificar que com a diminuição do pH da cultura para valores próximo ou abaixo de 5,0, a produção de H_2 passou a apresentar tendência de estabilização, ou seja, com 21,5 h, 35,5 h e 90 h de operação para os ensaios 1, 2 e 3, respectivamente.

De acordo com BAHL et al., (1986) e ROYCHOWDHURY et al. (1988), a evolução de H_2 por *Clostridium* sp. ocorre em pH próximo ao neutro, e é inibida em pH abaixo de 5,0. Lay et al. (2003) descreveram que o pH é um fator de extrema importância para o sucesso operacional do bioprocesso de produção de H_2 em culturas de *Clostridium* sp, já que está diretamente relacionado com a atividade da hidrogenase, enzima composta por ferro, que é inibida em pH baixo (DABROCK et al., 1992).

A fermentação é um processo que leva à produção de H_2 a partir de compostos orgânicos por microrganismos anaeróbios, por mais de uma via metabólica. (TAGUCHI et al., 1994). As vantagens da fermentação sobre os outros processos biológicos são os seguintes: mais econômico, simples, produz H_2 em altas taxas e é passível da utilização de substrato orgânico de baixo valor, tal como, resíduos domésticos, agrícolas e industriais (LEVIN et al., 2004). A conversão anaeróbia de resíduos orgânicos a H_2 se tornou opção atrativa não só porque estabiliza esses resíduos, mas, também gera energia renovável.

Os rendimentos reais de H_2 devem ser substancialmente menores que aqueles valores estequiométricos por pelo menos quatro razões. Primeiro, o substrato pode ser degradado por

outras vias que não levam à geração de H_2 . Segundo, uma fração de substrato é consumida para a produção de biomassa. Terceiro, o rendimento estequiométrico é alcançado apenas sob condição próxima ao equilíbrio, o que implica baixa taxa de produção e baixa pressão parcial de H_2 (WOODWARD et al., 2000; HALLENBECK, BENEMANN, 2002). Por fim, parte do hidrogênio produzido pode ser consumido para a produção de outros subprodutos, como por exemplo, ácido propiônico (VAVILIN et al., 1995).

O rendimento de H_2 obtido nesse estudo foi calculado a partir da relação entre o potencial máximo de produção de H_2 (P), obtido a partir da equação de Gompertz modificada (Tabela 5.4), e a massa de papel adicionada. Desse modo, foram obtidos os seguintes resultados: 42 mmol H_2 / g de papel adicionado no ensaio 1; 26,6 mmol H_2 / g de papel adicionado no ensaio 2; e, 24 mmol H_2 / g substrato adicionado no ensaio 3. Portanto, no ensaio 1 foi obtido maior rendimento de H_2 em comparação com os outros dois ensaios.

O maior rendimento de H_2 no ensaio 1 comparado com aqueles obtidos para os ensaios 2 e 3, pode estar relacionado com a concentração de substrato e enzima adicionada. Pode-se observar que para o ensaio 1, a concentração de papel e celulase foi favorável para crescimento da biomassa e produção de H_2 . Todavia, para os outros dois ensaios, principalmente para o ensaio 3, cujo rendimento foi menor, a quantidade de papel e celulase pode ter sido inibitória. Além de ter sido maior a carga orgânica de papel nos ensaios 2 e 3, o volume de celulase adicionada também foi crescente para cada ensaio, o que também representa aumento da carga orgânica, já que a celulase trata-se de uma proteína. A adição de celulase aumentou drasticamente a DQO no ponto inicial (4.647,7; 13.430,9 e 25.004 mg DQO/L para os ensaios 1, 2 e 3, respectivamente), comparada com a DQO referente ao papel (604; 2.235 e 4.410 mg DQO/L para as concentrações 0,5; 2,0 e 4,0 g papel/L, respectivamente) (Tabela 5.1).

Van Ginkel, Logan (2005) também observaram maiores rendimentos de H_2 com a diminuição da concentração de DQO (glicose) e da carga orgânica aplicada em reator contínuo (2 L volume reacional). Foram testadas as concentrações de 10; 7,5; 5,0 e 2,5 g DQO/ L e tempos de detenção hidráulica (TDH) de 10; 5,0; 2,5; 1 h. Já a carga orgânica variou de 0,5 a 18,9 g DQO/h. O melhor rendimento de produção de H_2 foi alcançado para TDH de 10 horas. Além disso, foi inversamente proporcional à concentração de glicose (2,5; 5,0; 7,5 e 10,0 g DQO/ L); ou seja, rendimentos de 2,8 mol H_2 / mol glicose; 2,5 mol H_2 / mol glicose; 2,4 mol H_2 / mol glicose e 2,2 mol H_2 / mol glicose, respectivamente. Quando a carga orgânica foi reduzida de 18,9 para 0,5 g glicose/ h, o rendimento aumentou de 1,7 mol H_2 / mol glicose para 2,8 mol H_2 / mol glicose. Os autores consideraram que a razão para o

aumento no rendimento de H_2 para menor concentração de glicose pode ser devido à inibição ocasionada pela supersaturação de H_2 na fase líquida, decorrente do aumento da vazão de H_2 com o aumento da concentração de substrato. Os resultados obtidos por Van Ginkel, Logan (2005) e aqueles obtidos no presente estudo levam a sugerir que é mais vantajoso manter reatores de produção de H_2 com baixas concentrações de substrato.

Alguns rendimentos obtidos em estudos que utilizaram substratos complexos para a produção de H_2 estão expostos na Tabela 5.5.

Tabela 5.5 - Comparação dos rendimentos de H_2

Substrato	(substrato ou DQO) g/L	pH/ T (°C)	Produção Máxima H_2	Rendimento H_2 (g substrato/ DQO ou %)	Inoculo	Referências
Papel sulfite	0,5 2,0 4,0	7,0 37 °C	408 mL 823 mL 949 mL	816 mL 411,5 mL 237,25 mL	<i>Clostridium</i> sp.	Presente Estudo
Resíduo alimentício	50	7,0 35 °C	231 mL	-	<i>Clostridium beijerinck</i>	KIM et al. (2008)
Papel filtro	5	55 °C	-	87 %	Cultura mista	ROYCHOWDURY et al. (1988)
Papel moído	20	7,0 37 °C	34 mmol	-	Cultura mista	VALDEZ-VAZQUEZ et al. (2005)
Lenço de papel	5	7,0	~ 1,4 L	282,43 mL	<i>Ruminococcus</i>	NTAIKOU et al. (2009)
Papel sulfite		37 °C		242,76 mL	<i>Albus</i>	
Amido	4,6	6,0 55 °C	84 mL	932 mL	<i>Thermoanaerobacterium</i> sp.	ZHANG et al. (2003)
Arroz cozido	5,5	4,5 37 °C	286 mL	346 mL	<i>Clostridium</i> sp.	FANG et al. (2006)
Celulose	25	7,0 37 °C	-	72 mL	Cultura mista	LAY (2001)
Sacarose	9	5,5	244 mL	180 mL	Lodo anaeróbio	CHEN et al. (2006)
Leite seco	64	36 °C	292 mL	37 mL		
Resíduo Alimentício	32,3		178 mL	30 mL		

*O valor do rendimento de H_2 está apresentado em mililitro para fins de comparação com outros resultados e foi calculado a partir da relação entre o Potencial máximo de produção de H_2 (em mL) obtido na equação de Gompertz modificada e a massa de papel adicionada.

Kim et al. (2008) testaram diferentes valores de pH inicial de 5,0 a 8,0, com intervalo de 1,0, em reatores anaeróbios em batelada com resíduo alimentício, como principal fonte de carbono. Os reatores foram inoculados com cultura pura de *Clostridium beijerinckii*. Os autores verificaram que aumento do pH até 7,0 favoreceu a produção de H₂, todavia, em pH 8,0, essa foi inibida. Os valores de H₂ acumulado foram aproximadamente 60 mL, 160 mL, 180 mL e 240 mL para pH 5,0, 6,0, 8,0 e 7,0, respectivamente. Além disso, os autores verificaram que as concentrações de ácidos butírico e acético foram máximas para pH 7,0, ou seja, 3.546 mg/L e 1.031 mg/L, respectivamente. Sendo assim, Kim et al. (2008) concluíram que valores de pH inicial baixos podem reduzir significativamente a produção de H₂, já que rápida acidificação do meio durante o processo, ocasionada pela concomitante geração de ácidos orgânicos, inibe a atividade da hidrogenase. No estudo atual o pH inicial do meio foi corrigido para 7,0 e foram obtidos rendimentos satisfatórios de H₂, especialmente nos ensaios 1 e 2, ou seja 816 mL e 411,5 mL, respectivamente. Ainda que o pH inicial não tenha sido baixo, a produção de H₂ acarretou a diminuição desse valor, pela geração, principalmente, de ácido butírico.

Roychowdury et al. (1988) realizaram ensaios em batelada para produção de H₂ a partir da degradação de papel filtro. O papel (5 g/L) foi anteriormente submetido à incubação para hidrólise enzimática com celulasas (120 mL) obtidas de *Trichoderma reesei* (ATCC 26921). Foram testados três inóculos diferentes: consórcio misto obtido de esgoto, consórcio obtido de sedimento de aterro sanitário (inóculos indefinidos), ambos a 55 °C; e co-cultura de *Citrobacter freundii*, *Citrobacter* sp. e *Escherichia coli* (inóculo definido) a 37 °C. O rendimento de H₂ foi maior com os inóculos indefinidos em comparação com o inóculo definido: 80% para o inóculo derivado do esgoto após 2 dias de incubação; 87% para o inóculo derivado de aterro sanitário após 3 dias de incubação e apenas 37% para o inóculo definido após 3 dias de incubação. A maior diversidade microbiana encontrada nos inóculos indefinidos somada à hidrólise do papel por celulasas pode ter sido responsável pela maior eficiência de produção de H₂ nesses reatores. No presente trabalho, em que foi utilizado inóculo misto advindo do fluido de rúmen bovino, os rendimentos de H₂ foram também satisfatórios, provavelmente pelas mesmas razões.

O estudo de Valdez-Vazques et al. (2005) também buscou produção de H₂ pela degradação de papel, como modelo para utilização futura de resíduos de papel. O ensaio em batelada em reator de 250 mL, com 80 g da mistura papel e meio de cultura (25% de massa seca), foi realizado com cultura mista, a 37 °C. Após o primeiro *plateaux* de estabilização da

produção de H_2 , os reatores foram despressurizados mais duas vezes e fluxionados com N_2 para a produção adicional de H_2 . Os dois *plateaux* seguintes e a taxa de evolução de H_2 decresceram em cada ciclo subsequente de incubação, porém a quantidade total de H_2 produzida foi aproximadamente o dobro daquela produzida no primeiro ciclo, 34 e 17 mmol H_2 / reator, respectivamente. A retirada de H_2 do *headspace* deve ter amenizado o efeito inibitório da elevada pressão parcial de H_2 na atividade de algumas bactérias fermentativas, permitindo aumento na geração desse gás.

No estudo atual, não houve despressurização do *headspace* ao longo da operação dos reatores, e a pressão parcial de H_2 pode ter levado à inibição da atividade da biomassa produtora de H_2 . O potencial de produção de H_2 observado pelos autores (VALDEZ-VAZQUEZ et al., 2005) foi muito menor se comparado com aqueles observados no presente estudo, mesmo com concentração de substrato mais elevada. A presença de celulase no atual estudo pode ter favorecido a maior produção de H_2 , já que essa enzima catalisou a hidrólise do papel em açúcares fermentáveis, por conseguinte, favorecendo o processo fermentativo.

Ntaikou et al. (2009) obtiveram resultados satisfatórios de produção de H_2 a partir da utilização de lenço de papel (A) e papel sulfite impresso (B), ambos totalizando 5 g/L de glicose em cada reator, com a utilização de cultura pura de *Ruminococcus albus*. Os substratos foram 100% consumidos e os valores de produtividade de H_2 foram 282,76 mL/ g papel e 242,83 mL/ g papel, respectivamente para os substratos A e B. Os rendimentos de H_2 para esses dois tipos de papel foram próximos àquele obtido com glicose pura, com 2,18 mol H_2 / mol carboidrato para A, 2,27 mols H_2 / mol carboidrato para B e 2,20 mol/ mol glicose para a glicose pura. A produtividade de H_2 no presente estudo foi de 816 mL, 411,5 mL e 237,5 mL/ g papel nos ensaios 1, 2 e 3, respectivamente, e portanto, foi melhor comparando-se com os resultados expostos acima, mesmo com a utilização de uma cultura mista não celulolítica. Isso foi devido, provavelmente, à adição de celulase nos ensaios que disponibilizou rapidamente carboidratos solúveis para a produção de H_2 .

Chen et al. (2006) realizaram ensaios de produção de H_2 com consórcio anaeróbio misto, testando três substratos: sacarose (A), resíduos alimentícios (B) e leite seco (sem gordura) (C). O maior potencial de produção de H_2 , 244 mL, 292 mL e 178 mL, foi obtido para as concentrações de 9 g DQO/L, 64 g DQO/L e 32,3 g DQO/L para A, B e C, respectivamente. Esses valores foram menores do que o potencial de produção de H_2 observado nos ensaios 1 e 2 do presente estudo, mesmo se tratando de papel, que não é um substrato ideal para a produção de H_2 . Novamente, a adição de celulase permitiu a produção

de H_2 a partir desse substrato, por liberar carboidratos solúveis no meio, já que nos reatores controle não houve detecção de H_2 nos períodos de operação analisados.

Fang et al. (2006) usaram arroz cozido como substrato para produção de H_2 e obtiveram rendimentos de 346 mL H_2 / g carboidratos e 160 mL H_2 / g carboidratos quando o pH inicial foi 4,0 e 7,0, respectivamente. No presente estudo, em que o pH inicial foi 7,0, os rendimentos observados nos ensaios 2 e 3 foram menores do que o descrito por esses autores em pH 4,5. Embora os resultados de Fang et al. (2006) sejam contrários à afirmação de Roychowdury et al. (1988), de que a fermentação por *Clostridium* sp. é inibida na faixa de pH 4-5, a variação de pH inicial ótimo pode estar relacionada com a diversidade de substratos e inóculos utilizados em diferentes estudos.

Zhang et al. (2003) usaram água residuária com 4,6 g/L de amido para produção de H_2 em temperatura 55 °C. O potencial de produção e rendimento de H_2 foram máximos quando o pH inicial foi 6,0, com 84 mL de H_2 e 92 mL H_2 /g amido, respectivamente. Os rendimentos observados no presente trabalho, e aqueles obtidos por Fang et al. (2006) e Zhang et al. (2003) foram maiores que 49 mL/ g-celulose a 37 °C (LAY, NOIKE, 1999) e 45 mL/g-celulose a 60 °C (UENO et al., 1995). Esses trabalhos apresentaram rendimentos menores que aqueles observados nesse estudo, com exceção de Fang et al. (2006). Isso foi devido provavelmente à adição de celulase, que catalisou a hidrólise da celulose presente no papel em açúcares prontamente fermentáveis, facilitando a produção de H_2 no sistema. Ademais, tratando-se de um composto orgânico, não se pode desconsiderar a possibilidade de utilização, por parte dos microrganismos, da celulase como substrato para produção de H_2 .

Pode-se concluir que o rendimento de H_2 no atual estudo foi elevado em comparação com os resultados obtidos por outros autores, com diferentes substratos. O papel é um material composto principalmente de celulose, um polímero de glicose, portanto pode-se esperar um rendimento satisfatório de H_2 , quando a celulase é adicionada para promover a hidrólise da celulose presente no papel. Nos ensaios controle, por sua vez, em que não foi adicionada a enzima, a produção de H_2 não foi detectada para nenhuma das três concentrações de papel testada. A celulase foi indispensável para possibilitar a produção de H_2 no sistema.

5.3.1.1. Cinética da Produção de Hidrogênio

Os dados de produção acumulada de H_2 obtidos nos três ensaios com concentrações diferentes de papel e enzima foram ajustados por meio da equação de Gompertz, modificada

por Zwietering et al. (1990). Os dados dos ensaios controle não foram ajustados por terem sido abaixo do limite de detecção do método cromatográfico. Zwietering et al. (1999) reescreveram o modelo matemático de Gompertz para que os parâmetros pudessem ter significado biológico, além de poderem ser estimados diretamente na equação, o que não é possível com a equação original. Os parâmetros velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}), duração da fase lag (λ) e aumento logarítmico da população (A) foram então introduzidos no modelo. Os valores de Potencial de Produção de H_2 (P), taxa máxima de produção de H_2 (R_m) e Tempo de fase lag (λ) estão listados na Tabela 5.6. Em todos os ensaios, o valor de R^2 foi superior a 0,97.

Tabela 5.6 - Potencial de Produção de H_2 (P), Taxa Máxima de Produção de H_2 (R_m), Fase lag (λ) e R^2 obtidos da equação de Gompertz modificada

Ensaio	P (mmol)	R_m (mmol/h)	λ (h)	R^2
1	21,00	2,19	7,14	0,9994
2	53,23	4,26	7,28	0,9975
3	96,55	4,21	2,75	0,9788

Os valores de potencial máximo de produção de H_2 foram de 21,00 mmol, 53,23 mmol e 96,55 mmol para os ensaios 1, 2 e 3, respectivamente (Tabela 5.6). Tais valores foram consistentes com os dados obtidos no experimento; ou seja, 21,28 mmol; 56,49 mmol e 105,6 mmol, respectivamente para os ensaios 1, 2 e 3. A taxa máxima de produção de H_2 (2,19 mmol.h⁻¹) foi menor para o ensaio 1, em relação aos outros dois ensaios realizados, cujas taxas máxima de produção de H_2 foram muito próximas; ou seja, 4,26 mmol/h e 4,21 mmol/h para os ensaios 2 e 3, respectivamente. Provavelmente, a maior quantidade de substrato e enzima, nos ensaios 2 e 3 promoveu a liberação mais rápida e de maior concentração de açúcares fermentáveis no meio, acelerando a produção de H_2 .

Para os ensaios 1 e 2 verificou-se fase lag semelhante, ou seja, de 7,14 e 7,28 h; enquanto, que para o ensaio 3, o tempo de fase lag foi ainda menor (2,75 h). Para a realização de cada ensaio, foi feita anteriormente a reativação da biomassa purificada, mantida a 4°C, com intuito de aclimação ao substrato, na presença de enzima, na temperatura e pH de incubação implementados nos ensaios. Essa aclimação da biomassa durante 72 horas antes do início de cada ensaio pode explicar os baixos períodos de fase lag observados. Além disso, a presença da celulase pode ter favorecido o rápido crescimento da biomassa. O menor tempo

de fase *lag* observado para o ensaio 3 pode ser explicado pelo maior volume de enzima adicionado, levando à mais rápida disponibilidade de açúcares solúveis. É sabido que a celulose é um polímero de difícil degradação e, na ausência da celulase certamente o período de fase *lag* seria maior, como observado em outros trabalhos (LAY, 2001; UENO et al., 2001). Desse modo, pode-se verificar que não houve inibição da fermentação decorrente do aumento da concentração de substrato adicionada, pois houve produção de H_2 nos três ensaios, apesar dessa ter sido maior no ensaio 1.

Fang et al. (2006) também ajustaram as curvas de produção acumulada de H_2 ao modelo de Gompertz modificado. Os ensaios foram realizados com concentrações crescentes de arroz cozido, usado como substrato orgânico: 2,7; 5,5; 8,3; 11,0; 13,8; 22,1 g carboidratos/L. Assim como no presente estudo, o tempo de fase *lag* diminuiu com o aumento da concentração de substrato, sendo de 38 h e 36 h para 2,7 e 5,5 g carboidratos/L, respectivamente, e de 16 h e 12 h para 13,8 e 22,1 g carboidratos/L, respectivamente.

5.3.2. Compostos Orgânicos em Meio Líquido

A produção de ácidos orgânicos voláteis foi concomitante com a produção de H_2 durante a conversão da celulose advinda do papel pelo consórcio microbiano. Subsequentemente, assim que houve estabilização da produção de H_2 e ácidos orgânicos, começou a produção de alcoóis. Isso indicou que o consórcio purificado do rúmen na condição de baixo pH alterou a rota metabólica para a formação de alcoóis. Esses resultados foram semelhantes àqueles relatados para fermentação de carboidratos, tais como glicose, sacarose, e celulose por *Clostridium* sp. (KIM et al., 1984; LAY et al., 2000; 2003; MAINTINGUER et al., 2011).

A seguir serão apresentados os dados de produção de ácidos orgânicos e álcoois nos três ensaios. A variação temporal dos produtos intermediários gerados nos reatores anaeróbios está detalhada no ANEXO V.

No ensaio 1, verificou-se diminuição gradual do pH de 7,0 para 4,6 decorrente da produção simultânea de H_2 e ácidos orgânicos (Figura 5.6A). No ensaio 1, a produção de ácido acético foi reduzida, mas a concentração manteve-se estável durante o processo, com 20,2 mg/L após 69 horas de operação. A produção de ácido butírico foi crescente no decorrer dos ensaios, alcançando 500 mg/L. Outros ácidos orgânicos, tais como, ácido fórmico, ácido propiônico, ácido isobutírico e ácido capróico também foram detectados, para valores

máximos de 11 mg/L, 156,3 mg/L, 138,1 mg/L e 35,3 mg/L, respectivamente. No período em que a produção de H_2 já se encontrava estabilizada, foi observado baixa produção de etanol, a partir de 51,5 horas de ensaio, com aproximadamente 26 mg/L. Ao final do ensaio (69 horas), a porcentagem de ácido butírico detectada foi de 77,5% e de ácido acético 3% (Figura 5.6 B).

Figura 5.6 - (A) Variação temporal de pH; (B) Produção acumulada de compostos orgânicos em meio líquido no ensaio 1

Para o ensaio 2 ocorreu diminuição do pH de 7,0 para 3,75. Assim como, detectado no ensaio 1, ácido butírico foi o principal subproduto produzido no processo fermentativo, com 1.161,5 mg/L após 100 horas de operação (Figura 5.7). A produção de ácido acético foi mínima, com valor máximo de 52,9 mg/L, e foi diminuindo no decorrer do ensaio. A concentração de ácido propiônico permaneceu estável por todo o tempo, e já se iniciou com 170 mg/L, portanto, provavelmente não houve a produção desse ácido no reator.

Possivelmente, esse ácido tenha advindo da reativação da biomassa. Ácido fórmico, ácido iso-butírico, e ácido capróico também foram detectados com concentrações máximas de 102,2; 600,7 e 194,7, respectivamente. A produção de etanol se destacou em 28,5 horas de ensaio, já quando a produção de H_2 estava estável. A concentração de etanol foi máxima, ou seja, de 500 mg/L em 100 horas de operação (Figura 5.7 B). Nesse período, o valor de pH foi inferior a 4,0. No final do ensaio (100 horas) a porcentagem de ácido butírico, ácido acético e etanol foram de 55,2%, 0,3% e 24,6%, respectivamente.

Figura 5.7 - (A) Variação temporal de pH; (B) Produção acumulada de compostos orgânicos em meio líquido no ensaio 2

No ensaio 3 verificou-se diminuição do pH de 7,0 para 3,55 (Figura 5.8A). A produção de ácido butírico se destacou durante o ensaio, cuja concentração máxima foi de 2.644 mg/L. Houve produção de ácido acético durante as primeiras horas de operação (13 h), com concentração máxima de 175,2 mg/L, no entanto, essa foi reduzindo ao longo do tempo, chegando a 38 mg/L para 168 horas de operação.

A concentração de ácido propiônico se manteve razoavelmente estável do início ao fim da operação, com 184,9 mg/L e 145,7 mg/L, respectivamente. Portanto, provavelmente não houve consumo de H_2 para produção desse ácido no reator. Os ácidos fórmico, iso-butírico e capróico foram também detectados, com concentrações máximas de 238,5 mg/L, 393,4 mg/L e 271,5 mg/L, respectivamente. A partir de 26,4 horas de operação, no qual o pH já se encontrava entre 4 e 5, pôde-se verificar produção de n-butanol, atingindo 1.532,6 mg/L para 168 horas de operação. A partir de 55,4 horas de operação em diante foi detectada produção de etanol, ou seja, 317 mg/L no final da operação (Figura 5.8 B). No final do ensaio, as concentrações de ácido butírico, ácido acético, etanol e n-butanol foram 51,6%, 0,74%, 6,2% e 30%, respectivamente.

Figura 5.8 - (A) Variação temporal de pH; (B) Produção acumulada de compostos orgânicos em meio líquido no ensaio 3

Os ensaios controle tiveram o mesmo tempo de operação dos ensaios com celulase, de 69, 100 e 168 horas, respectivamente para CT 1, CT 2 e CT 3. Nos reatores controle, para as três concentrações de papel testadas, a produção de H_2 foi abaixo do nível de detecção do método cromatográfico e a reduzida produção de subprodutos orgânicos foi devido, provavelmente, ao consumo da matéria orgânica presente no extrato de levedura. O pH final dos ensaios corroboram a inexistência de atividade fermentativa expressiva nesses reatores cujos valores foram os seguintes: 6,8; 6,6; e 6,5 para os ensaios CT 1; CT 2 e CT 3, respectivamente.

Figura 5.9 – Compostos orgânicos em meio líquido nos ensaios controle

Muitas vias de produção de H_2 tem sido propostas (LI et al., 2007). A geração de H_2 por bactérias fermentativas é acompanhada da formação de ácidos orgânicos como subprodutos metabólicos. Os produtos mais comuns na fermentação de carboidratos são ácido butírico e ácido acético. Entretanto, alguns autores relataram a produção de H_2 com geração de etanol (GAUDY, GAUDY, 1980; HWANG et al., 2004). Como já exposto anteriormente, a fermentação via ácido acético é preferencial, pois gera 4 mols de H_2 , enquanto a fermentação via ácido butírico gera 2 mols de H_2 .

Para os três ensaios verificou-se que a produção de H_2 se deu preferencialmente pela via de formação do ácido butírico, já que a concentração desse ácido foi a mais expressiva. São inúmeros os estudos em que essa informação é semelhante para diversos substratos. A geração de ácido acético não contribuiu significativamente, uma vez que não foram observados valores relevantes em todos os reatores. O mesmo foi observado para ácido

fórmico. O acúmulo de ácidos orgânicos no meio acarretou a diminuição do pH ao longo do processo fermentativo. É possível relacionar o início da produção de álcoois nos reatores com a acidificação do pH que ocorre aproximadamente próximo ao tempo em que a produção de H₂ começou a estabilizar, com 21,5 h; 35,5 h e 90 h, respectivamente para os ensaios 1, 2 e 3. Esse resultado era esperado já que a evolução de H₂ por *Clostridium* sp. ocorre em pH próximo ao neutro, e é inibida em pH abaixo de 5,0 (BAHL et al., 1986; ROYCHOWDHURY et al., 1988)

A produção de H₂ somada à formação do ácido acético e ácido butírico é conhecida como rota metabólica típica de espécies de *Clostridium* durante o processo fermentativo (CHEN et al., 2005). Kim et al (2008) realizaram estudos de produção de H₂ via degradação de resíduos alimentícios com cultura pura de *Clostridium beijerinckii*, testando valores de pH inicial de 5, 6, 7 e 8. Para todos os ensaios, os autores observaram maiores concentrações de ácido butírico do que de ácido acético. Ao testar temperaturas de incubação diferentes, variando de 30 a 45 °C, com intervalo de 5 °C, também foi obtido ácido butírico como principal subproduto orgânico produzido.

Lin et al. (2007) conduziram testes em batelada para investigar a performance do metabolismo de fermentação da glicose e produção de H₂ por quatro espécies de *Clostridium*: *C. acetobutylicum* M121, *C. butyricum* ATCC19398, *C. tyrobutyricum* FYa102 e *C. beijerinckii* L9. Como observado no atual estudo, as espécies testadas fermentaram a glicose, o pH diminuiu de 7,0 para 4-5 e ocorreu produção de ácido butírico (0,37-0,67 mmol/ mmol de glicose) em maior quantidade que ácido acético (0,34-0,42 mmol/ mmol de glicose). Dentre as quatro espécies, *C. acetobutylicum* foi a que produziu quantidade considerável de etanol (0,19 mmol/ mmol de glicose), quase ausente nos outros testes. N-butanol foi detectado apenas no teste com *C. beijerinckii*. Portanto, semelhante a este trabalho, houve detecção de ácido butírico como principal subproduto, além de etanol e n-butanol, em que o consórcio microbiano era misto e continha basicamente *Clostridium* sp. Lin et al. (2007) verificaram que há diferença, entre as espécies de *Clostridium* estudadas, na cinética de consumo da glicose, na diversidade dos subprodutos produzidos, e nos rendimentos de cada subproduto, calculados para H₂, acetato, butirato e etanol. Esse resultado confirma uma distribuição diversa de produtos finais da fermentação por espécies de *Clostridium*, como já relatado por (ANDRESEN et al., 1989; KEYS et al., 2001). Dessa forma, a diversidade de subprodutos detectados nos ensaios realizados no presente estudo pode estar relacionada com a utilização de um consórcio microbiano misto.

Em outro estudo de produção de H_2 pelo consumo de glicose, o inóculo foi obtido de reator anaeróbio de tratamento de esgoto sanitário e submetido a tratamento térmico, 85° C por 1 hora. Os ensaios em batelada foram montados com 10 g/L de glicose, atmosfera de N_2 , 10% v/v de inóculo, pH inicial 6,0 e temperatura de incubação 37 °C. A glicose foi totalmente consumida nas primeiras 60 horas de incubação e a produção de H_2 atingiu aproximadamente 230 mL durante as primeiras 20 horas, mantendo-se estável até o final (~ 60 horas). O rendimento de H_2 foi de 1,75 mol/ mol de glicose consumida. Assim como no atual estudo, a produção de H_2 foi acompanhada da produção de ácidos voláteis e álcoois, sendo o principal subproduto gerado o ácido butírico (2.223 mg/L), seguido de ácido acético (1.017 mg/L) e etanol (85 mg/L) (ZHENG,YU, 2005).

Como observado nesse estudo, Zhao et al. (2011) também observaram maior produção de ácido butírico (> 2.500 mg/L), além de ácido acético (> 2.000 mg/L), etanol (> 300 mg/L) e butanol (> 250 mg/L) em ensaios de produção de H_2 em batelada com cepa isolada identificada como *C. beijerinckii* RZF-1108. Esses resultados foram obtidos para as condição de 9 g/L de glicose, temperatura de incubação 35° C, pH inicial 7,0 e volume de inóculo 8%. A produção acumulada de H_2 foi 2.209 mL H_2 / L de cultura e o rendimento foi de 1,95 mol H_2 / mol de glicose consumida.

Chen et al. (2002) cultivaram inóculo misto em pH 7,0, após tratamento ácido igual ao aplicado neste estudo, com 20 g/L de glicose a 35 °C. Após 72 horas de ensaio, a evolução de H_2 máxima obtida foi de 80 mL, sendo que o ácido butírico representou cerca de 70 – 85% (5.250 mg DQO/L) do total de subprodutos produzidos, seguido de ácido acético (530 mg DQO /L) e ácido propiônico (510 mg DQO/L). Esses autores constataram que a produção de ácido butírico foi muito elevada no ensaio com inóculo pré-tratado em comparação com ensaio realizado com o mesmo inóculo sem pré-tratamento. Nesse último, os principais subprodutos foram ácido butírico e ácido acético, com aproximadamente 35% de cada. Os autores concluíram que após o pré-tratamento, as concentrações de ácido butírico aumentaram drasticamente, provavelmente, devido à alteração entre as populações dominantes no consórcio. Já foi reportado que *Clostridium butyricum*, por exemplo, gera ácido butírico e ácido acético em proporção de 2:1 (White, 1995). No atual estudo, no qual o inóculo também foi submetido à pré-tratamento ácido, foi também observada maior porcentagem de ácido butírico em todos os ensaios.

Segundo Khanal et al. (2004) a evolução de H_2 , alcançando a supersaturação, leva ao acúmulo de ácidos de cadeias maiores na cultura, tais como ácidos butírico e propiônico. Se o

pH não for mantido em faixa favorável, pode ocorrer inibição da produção de H_2 ou alteração da população microbiana dominante, por conseguinte, a produção de H_2 poderá cessar.

As bactérias anaeróbias do gênero *Clostridium*, por exemplo, geralmente não metabolizam ácido butírico e propiônico, entre outros, e o acúmulo desses subprodutos acarreta diminuição brusca do pH (OH et al., 2002, 2003). Khanal et al. (2004) também relataram que a diminuição rápida de pH pode provocar alteração metabólica dos microrganismos envolvidos na produção de H_2 , resultando em mudança na via de produção de subprodutos, e conseqüente diminuição da produção do gás. Para valor de pH inferior a 5,5, bactérias semelhantes a *Clostridium*, por exemplo, são capazes de alterar a rota acidogênica para solvetogênica, especialmente na fase estacionária do crescimento (JONES et al., 1982; LAY et al., 1999). A produção de álcoois e acetona acarreta o consumo de elétrons livres da molécula de NADH e, portanto, pode ser desfavorável para a produção de H_2 (HO et al., 2011). Dessa forma, o controle do pH durante o processo fermentativo pode ser alternativa para otimizar a produção de H_2 e minimizar o desvio da rota para a solvetogênese.

Inúmeros estudos com clostrídios solvetogênicos têm mostrado correlação entre o decréscimo da produção de H_2 e a indução da solvetogênese. Gorwa et al. (1996) observou que o nível de RNAm da Fe-hidrogenase *hydA* estava elevado nas células de uma cultura acidogênica, enquanto, estava muito baixa em células de uma cultura solvetogênica nas mesmas condições de meio de cultura, com concentração de fosfato limitante. Em geral, a solvetogênese se inicia em condição de baixo pH, e já foi relatado que a atividade da hidrogenase, enzima que contém ferro, é afetada pelo baixo pH (DABROCK et al., 1992). Outros autores também relataram que quando as células desviam da rota acidogênica para a rota solvetogênica nas diferentes fases de crescimento da cultura, alteração correspondente ocorre no conteúdo celular das enzimas envolvidas em ambos processos (JONES et al., 1982; AFSCHAR et al., 1986).

Além do pH, a pressão parcial de H_2 é um parâmetro crucial no processo. Van Andel et al. (1985) relataram que a diminuição da pressão parcial de H_2 resultou em aumento da relação acetato/butirato acompanhada do aumento da produção de H_2 . A depressurização do *headspace* por duas vezes nos ensaios de produção de H_2 realizados por Valdez-Vazquez et al. (2005) também foi efetiva para dobrar a quantidade de H_2 obtida no primeiro *plateaux*. No atual estudo, não houve controle do pH para manutenção em faixa favorável, tampouco, depressurização do *headspace*, o que pode ter resultado em elevada concentração de ácido butírico, além de rápida estabilização da produção de H_2 . Ao final da operação dos reatores,

os valores de pressão parcial de H_2 calculados foram 0,114; 0,272 e 0,579 atm, respectivamente para os ensaios 1, 2 e 3 (Figura 5.10) (ANEXO VI).

Figura 5.10 - Pressão parcial de H_2 nos ensaios 1 (0,5 g papel/L e 4 mL celulase/ L); 2 (2,0 g papel/L e 15 mL celulase/L) e 3 (4,0 g papel/L e 30 mL celulase/L).

No estudo realizado por NTAIKOU et al. (2009) em que foram testados 5 tipos de papel como substrato para produção de H_2 com *Ruminococcus albus*, os únicos subprodutos detectados, além de H_2 e CO_2 , foram ácido acético, etanol e ácido fórmico em menor concentração. Essa diferença em relação aos subprodutos encontrados no trabalho atual pode ser explicada pela utilização de uma cultura não relacionada ao gênero *Clostridium*. Dessa forma, a via metabólica preferencial de fermentação de carboidratos a H_2 dessa espécie parece se diversificar daquelas rotas comuns a espécies de *Clostridium* sp. Apesar disso, *Ruminococcus albus* se mostrou eficiente na degradação do polímero de celulose, já que a maior parte foi consumida, e na produção de H_2 .

5.3.3. Consumo de Carboidratos Solúveis Resultantes da Hidrólise do Papel

A geração de açúcares solúveis por meio da hidrólise do papel pela celulase se iniciou no instante em que o substrato e a celulase foram colocados em contato, entretanto, a concentração máxima detectada foi observada após um período maior de ação da enzima. Isso explica a maior concentração de açúcares solúveis detectada após um período de incubação se comparada com a concentração observada no início do ensaio. Provavelmente, essa

concentração máxima detectada não corresponde à concentração máxima de açúcares liberados pela ação enzimática, já que simultaneamente ocorria o consumo de carboidratos no reator.

No ensaio 1 (0,5 g papel/L e 4 mL celulase/L), no início da operação, a concentração de açúcares solúveis era de 277 mg/L, e após 0,5 hora, a concentração foi máxima; ou seja, 317 mg/L. Ao final do ensaio, após 69 horas, a concentração remanescente de açúcares solúveis era de 138,3 mg/L. Portanto, ocorreu consumo de 56% de glicose (Figura 5.10 A).

No ensaio 2 (2,0 g papel/L e 15 mL celulase/L), no início da operação, a concentração de açúcares solúveis era de 611 mg/L. Após 4 horas de ensaio, a concentração máxima detectada foi de 1.009 mg/L. Já ao final do ensaio, após 100 horas de operação, ainda havia 438 mg/L. Portanto, o consumo de açúcares solúveis foi de 56,6 % (Figura 5.10B).

No ensaio 3 (4,0 g papel/L e com 30 mL celulase/L), no início da operação, a concentração de açúcares solúveis era de 504 mg/L. Após 4,5 horas, a concentração máxima detectada foi 2.440 mg/L. No final do ensaio havia 844,7 mg/L de açúcares solúveis remanescentes. Portanto, o consumo de glicose foi de 65,4 % (Figura 5.10 (C)).

Antes da adição de papel e celulase no meio, a concentração de açúcares solúveis detectada era advinda do extrato de levedura (1 g/L), com concentração entre 150 – 200 mg/L (dado não adicionado nos gráficos).

Figura 5.11 - Concentração de carboidratos solúveis (mg/L) ao longo do tempo (h): (A) 1; (B) 2 e (C) 3. Os valores representam a média das triplicatas e desvio padrão

Dentre os três ensaios realizados com enzima, o ensaio 3 foi o que apresentou maior consumo de carboidratos solúveis (65,4%), enquanto que os ensaios 1 e 2 apresentaram porcentagens de consumo parecidas (56% e 56,6%). A concentração elevada de etanol no ensaio de 2 justifica o consumo de carboidratos solúveis similar ao detectado no ensaio 1, porém com menor rendimento de H₂. Da mesma forma, a elevada concentração de *n*-butanol detectada, além de etanol, no ensaio 3, provavelmente, pode indicar que parte do consumo desses carboidratos foi atribuído à solvetogênese e não à produção de H₂ e ácidos orgânicos. Mohan et al. (2008) relataram baixo rendimento de H₂ e elevado consumo de substrato (79%), atribuindo-o à solvetogênese.

É muito provável que os valores 317 mg/L, 1.009 mg/L e 2.400 mg/L não representem as concentrações máximas disponíveis de glicose no reatores com 0,5 g/L, 2,0 g/L e 4,0 g/L de papel com adição de celulase, respectivamente, já que parte do carboidrato foi consumido para crescimento da biomassa nesse intervalo.

Ensaio de hidrólise enzimática foram realizados separadamente para verificar a quantidade máxima de glicose obtida da hidrólise do papel pela celulase, sem o consumo concomitante do substrato pelos microrganismos. As concentrações máximas de glicose obtidas foram 367,6 mg/L (± 5), 1.291 mg/L (± 27) e 3.450 mg/L ($\pm 227,76$) para as concentrações 0,5; 2,0 e 4,0 g papel/L. Essas concentrações foram relativamente próximas daquelas máximas observadas nos ensaios (1 e 2) de produção de H₂, exceto para o ensaio 3. O restante de carboidratos originados da hidrólise do papel provavelmente estava na forma de carboidratos insolúveis não analisados.

A análise de carboidratos realizada neste trabalho foi aplicada para detecção de açúcares redutores solúveis. Como foi constatada a presença de *Clostridium* sp, que podem ser capazes da degradação de celobiose, um dissacarídeo intermediário da hidrólise de papel em glicose pela ação das celulasas utilizadas, é possível que parcela do substrato foi consumida na forma desse açúcar. Essa constatação dificultou o cálculo de rendimento de H₂ na forma de mol de H₂/ mol de glicose consumida, uma vez que esse valor poderia ter sido superestimado. É possível afirmar que o extrato de levedura não atuou como substrato para produção de H₂ nos ensaios realizados, uma vez que, nos ensaios controle, nos quais não houve adição de enzima e degradação de papel por parte dos microrganismos, a produção de H₂ foi abaixo do limite de detecção do método cromatográfico.

Deve-se mencionar que os resultados de evolução máxima de H₂ obtidos nos três ensaios levam à conclusão de que o rendimento de H₂ não pode ser resultante apenas do consumo de glicose detectado como apresentado nas figuras acima. Parte da produção de H₂

pode estar relacionada com o consumo de carboidrato na forma de celobiose ou celulose, ou mesmo, com o consumo da própria celulase adicionada, já que a adição da enzima elevou significativamente a DQO de entrada no sistema. Por meio da análise dos valores finais de DQO obtidos verificou-se possível consumo da enzima adicionada apenas para catalisar a hidrólise do papel.

Ao contrário do observado nos ensaios com celulase, o papel não foi degradado nos ensaios controle. Ao final dos ensaios controle, era possível observar os fragmentos de papel aparentemente intocados nos reatores das três concentrações de papel testadas. No início da operação, foi detectado 150-200 mg/L de glicose, e após 5 horas do início da operação, em média para os três reatores controle, até o final, a concentração de glicose foi abaixo do limite de detecção do método espectrofotométrico para os três ensaios. Esse resultado leva à conclusão de que não houve degradação de papel em glicose e que essa concentração detectada, provavelmente, correspondia ao carboidrato presente no extrato de levedura e foi rapidamente consumida pelos microrganismos como fonte de carbono para o crescimento. Entretanto, esse carboidrato presente não foi suficiente para o crescimento de microrganismos até que a produção de H_2 fosse detectada. Portanto, a adição de celulase foi essencial para que a produção de H_2 ocorresse nos reatores anaeróbios alimentados com papel.

Guo et al. (2010) também relataram que o pré-tratamento enzimático do substrato celulósico com celulase de *Trichoderma reesei* foi essencial para a conversão efetiva do substrato a açúcares solúveis. Além disso, observaram efeito notório na produção de H_2 . Com a maior concentração de celulase testada pelos autores, a porcentagem de açúcares solúveis observada foi de 29,1%. Os rendimentos de H_2 foram 98, 107 e 122 mL H_2 / g STV para 10, 15 e 20 g/L de substrato hidrolisado.

Kádar et al. (2004) também realizaram pré-tratamentos ácido e enzimático em lodo de papel (45% carboidratos), gerando 6,6 g/L de glicose e 1,8 g/L de xilose. Os autores realizaram ensaios em batelada para comparar a produção de H_2 a partir do hidrolisado de papel com a produção de H_2 a partir de açúcares puros, como glicose (10 g/L), xilose (10 g/L) e mistura de glicose e xilose em concentrações iguais àquela do hidrolisado. Foi utilizado cultura-pura de *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* em temperatura termofílica de 70 °C. A produção de H_2 com a utilização de açúcares puros foi de 130 mmol H_2 para glicose, 140 mmol H_2 para xilose e 110 mmol H_2 para a mistura de glicose e xilose com 100% de consumo de substrato. Já para o hidrolisado de papel, a produção de H_2 foi de aproximadamente 85 mmol, com consumo total da glicose e xilose presente no hidrolisado. As taxas máximas de produção de H_2 foram maiores para os ensaios com açúcares puros, 9-11 mmol/L.h⁻¹, em

relação ao ensaio com hidrolisado de papel, 5,5 mmol/L.h⁻¹. Entretanto, os rendimentos de H₂ para o hidrolisado atingiram 94% e para os açúcares puros foi em torno de 65%. Em todos os reatores houve despressurização do *headspace* para evitar inibição da cultura por parte da elevada pressão parcial desse gás

Os autores (Op. Cit.) concluíram que a produção de H₂ é possível a partir de recursos renováveis como o papel, mas somente após a aplicação de pré-tratamentos. No presente estudo a produção de H₂ também só foi possível quando a celulase foi aplicada para hidrolisar o papel em açúcares fermentáveis. Todavia, diferentemente dos resultados encontrados pelos autores acima, os açúcares não foram totalmente consumidos, e uma possível explicação para isso foi a inibição da biomassa fermentativa pelo aumento da pressão parcial de H₂ nos reatores.

Lo et al. (2009) cultivaram *Cellulomonas uda* para obtenção de enzimas capazes de degradar celulose a 35 °C. Após o crescimento celular e síntese das celulases, a temperatura de incubação foi elevada à 45 °C de forma que houvesse inibição da população microbiana, mas não da atividade enzimática. Nessas condições, carboxi-metil celulose foi adicionado como substrato celulósico para hidrólise em açúcares redutores. Os açúcares redutores resultantes da hidrólise foram então utilizados em ensaios de produção de H₂. A concentração inicial de açúcares redutores nos reatores foi de 1,26 g/L, sendo 0,040 g/L de glicose. Em relação à produção de H₂, os autores detectaram 28,6 mL/ L de H₂ acumulado, rendimento de 4, 79 mmol de H₂/ g açúcares redutores e taxa de produção de 23,4 mL/d/L.

O consumo de substrato observado nos três ensaios realizados com enzima foi baixo se comparados com outros autores. MAINTINGUER et al. (2011) detectaram consumo de xilose acima de 97% em condições mesofílicas nas concentrações 630 – 3.588 mg/L. Lay (2001) também observaram quase 100% de consumo de celulose nas concentrações 12,5 – 50 mg/L.

5.4 Sólidos Totais Voláteis

É possível afirmar que houve aumento nos valores de Sólidos Totais ao final de todos os ensaios, em especial dos Sólidos Totais Voláteis (Tabela 5.7). Os sólidos voláteis correspondem basicamente à biomassa microbiana presente nos reatores, mas esse valor pode ser superestimado pela presença da celulase e de resíduos da hidrólise do papel nos reatores com celulase. Nos reatores com celulase, o aumento dos valores de sólidos voláteis foi mais

expressivo, já que houve a hidrólise de papel em açúcares solúveis, possibilitando a utilização desse substrato pelos microrganismos. Foi possível relacionar o aumento gradativo nos valores de Sólidos Totais Voláteis com o aumento da concentração de papel nos reatores, pois maior quantidade de substratos fermentáveis foi disponibilizada para os microrganismos e, portanto, o crescimento da biomassa também foi maior (Tabela 5.7).

Nos reatores controle o crescimento da biomassa foi menor, de acordo com a análise de sólidos voláteis. Isso foi devido, provavelmente, à incapacidade das bactérias do consórcio microbiano de degradarem o papel nas condições operacionais impostas, e dessa forma, não houve substrato solúvel disponível para fermentação, a não ser aquele presente no extrato de levedura. Os valores de Sólidos Totais foram condizentes com os resultados observados de produção de H_2 e subprodutos orgânicos, e consumo de substrato. Nos reatores controle, em que a produção de biomassa foi baixa, a produção de H_2 foi abaixo do nível de detecção do método cromatográfico, não foi detectado glicose solúvel pela análise de carboidratos e a produção de subprodutos também foi inexpressiva. Em contrapartida, nos reatores com celulase foi constatada produção de H_2 e subprodutos orgânicos, além de ter sido detectada a hidrólise do papel e consumo do substrato solúvel gerado.

Tabela 5.7 - Valores de Sólidos Totais (ST) e Sólidos Totais Voláteis (STV) para os ensaios 1; 2 ; 3; CT 1; CT 2; CT 3

Sólidos	Inicial		Final	
	ST	STV	ST	STV
Ensaio	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)
1	1,364	0,971	1,852	1,584
2	3,437	2,746	7,343	6,093
3	2,01	1,48	15,111	12,404
CT 1	1,046	0,815	0,718	0,49
CT 2	0,764	0,644	1,919	1,701
CT 3	0,672	0,489	2,056	1,156

5.5. Balanço de massa em termos de Demanda Química de Oxigênio

Os valores de DQO inicial e final reais detectados estão presentes na Tabela 5.8, na qual encontra-se ainda o valor de DQO inicial estimado, que levou em consideração cada composto presente no meio. A DQO inicial teórica estimada foi próxima a DQO inicial

detectada. Os valores de DQO inicial e final estimados para cada composto conhecido presente no meio estão apresentados na Tabela 5.9. É possível afirmar que parte da celulase foi consumida durante o processo fermentativo, uma vez que a DQO final real foi menor que a DQO detectada, somente, para a solução de celulase (Tabelas 5.8; 5.9).

De acordo com os valores de DQO inicial e final detectados para os três ensaios com celulase, o balanço de massa referente à DQO foi de 75,4%, 62,56% e 76,0% para os ensaios 1, 2 e 3, respectivamente. Não foi possível completar o balanço de massa, provavelmente, porque foi analisado apenas carboidratos redutores solúveis; não foi realizada análise específica para detecção de proteínas para obtenção da concentração inicial e final de celulase. Outros subprodutos da fermentação podem não ter sido quantificados pelos métodos espectrofotométricos e cromatográficos utilizados, além disso, a biomassa bacteriana não foi considerada nesse cálculo, uma vez que as amostras foram centrifugadas.

Tabela 5.8 - DQO inicial e final nos ensaios

Ensaio	DQO inicial (mg/L)		DQO final (mg/L)
	Estimada	Detectada	Detectada
1	4.647,7	3.810,08	2.874,25
2	13.430,9	11.446,74	7.170
3	25.004	24.304,85	18.472

Tabela 5.9 - Valores de DQO inicial e final detalhados

Ensaio	DQO inicial (mg/L)				DQO final (mg/L)			
	Papel	Extrato de Levedura	Celulase	Compostos Orgânicos	Papel*	Extrato de Levedura	Celulase***	Compostos Orgânicos
1	604	1000	2.501	542,4	147,5	-	1.507,3	1.221,7
2	2.235	1000	9.337	859	447,36	-	2.720,62	4.010
3	4.410	1000	18.658	936	902,4	-	6.914	10.674

*Calculada a partir da concentração remanescente de carboidratos solúveis;

***DQO final celulase = DQO final total detectada – (DQO final papel* + DQO final compostos orgânicos em meio líquido)

5.6. Análise Comparativa dos Ensaaios com Celulase

Os reatores anaeróbios com papel e celulase tiveram comportamentos diferentes em relação à produção de H_2 (Figura 5.5). A produção de H_2 foi crescente com o aumento da concentração de papel adicionada, atingindo quantidade máxima de 21,28 mmol, 56,5 mmol e 105,6 mmol para os ensaios 1, 2 e 3, respectivamente (Tabela 5.5). Dessa forma, a maior disponibilidade de substrato disponível proporcionou aumento da evolução de H_2 nos ensaios com enzima. Entretanto, o rendimento de H_2 no ensaio 3 (24 mmol/g papel) foi muito próximo ao observado no ensaio 2 (26,6 mmol/g papel), que foram menores em relação ao rendimento observado no ensaio 1 (42 mmol/g papel). Esse fato pode estar relacionado com a maior taxa de produção de H_2 detectada para os ensaios 2 (4,26 mmol/h) e 3 (4,21 mmol/h), se comparada à taxa de produção no ensaio 1 (2,19 mmol/h) (Tabela 5.5), o que acarreta a rápida diminuição do pH da cultura, além da possível inibição dos microrganismos pelo aumento da pressão parcial de H_2 dentro dos reatores.

O período de fase *lag* nos três ensaios com enzima foram muito reduzidos, aproximadamente 7 horas para os ensaios 1 e 2; e 2,75 horas para o ensaio 3, portanto, não houve inibição da produção de H_2 pelo aumento da concentração do substrato e celulase adicionados (Tabela 5.5). O acréscimo de extrato de levedura no meio de cultivo pode ser um dos fatores que minimizaram esse período de adaptação dos microrganismos, por ser excelente fonte de nitrogênio e proporcionar maior quantidade de carbono disponível para o crescimento da biomassa, já que contém elevado teor protéico, que varia de 36-56 %. Além disso, a biomassa selecionada, armazenada em geladeira, foi reativada em reatores com 0,5 g/L de papel e 4mL/L de celulase 72 horas antes dos três ensaios, para aclimação nas condições operacionais utilizadas nos ensaios de produção de H_2 . A etapa de reativação provavelmente foi um dos motivos que reduziu o tempo de fase *lag* nos reatores de produção de H_2 . Dentre os três ensaios realizados, o tempo de fase *lag* foi menor no ensaio 3, provavelmente, devido à maior concentração de enzima adicionada, possibilitando a rápida hidrólise do papel em açúcares prontamente fermentáveis.

Figura 5.12 - Produção acumulada de H_2 nos ensaios com celulase: (-◆-) ensaio 1; (-■-) ensaio 2 e (-▲-) ensaio 3

O resumo dos resultados dos reatores anaeróbios com papel e celulase, para as condições estudadas estão apresentados na Tabela 5.10. Verificou-se alteração na geração de subprodutos orgânicos entre as condições estudadas. Ácido butírico foi o principal ácido orgânico gerado nos três ensaios. A concentração desse ácido foi crescente, com o aumento da concentração de substrato adicionada, acompanhando a crescente produção de H_2 . Para o ácido acético também foram detectadas concentrações crescentes do ensaio 1 para o ensaio 3, entretanto, essas foram bem menores do que aquelas observadas para o ácido butírico. Nesse sentido, é provável que a geração de H_2 ocorreu predominantemente pela via do ácido butírico. A geração dos ácidos iso-butírico, propiônico, fórmico e capróico também foram observadas para todos os ensaios.

Nos três ensaios foi detectada a produção de álcoois. As maiores concentrações de álcoois foram observadas nos ensaios 2 e 3. O etanol foi detectado em maior concentração para o ensaio 2, mas esteve presente no ensaio 3, o qual também apresentou concentração elevada de *n*-butanol. É possível que as elevadas concentrações de álcoois nos ensaios 2 e 3 estiveram relacionadas com o tempo de operação dos reatores, que foi maior que do ensaio 1. Além disso, a maior concentração de substrato pode ter favorecido o desvio de rotas

metabólicas de acidogênese para solvetogênese devido à diminuição do pH no processo fermentativo.

O biogás produzido era composto apenas por H_2 e CO_2 , na mesma proporção, e não foi detectado metano. A diminuição do pH do fluido de rúmen a 3,0 por 24 horas foi eficiente para eliminar as arqueias consumidoras de H_2 .

Embora os rendimentos de H_2 tenham sido satisfatórios, especialmente para o ensaio 1, o consumo de açúcares redutores solúveis foi baixo para os três ensaios, atingindo no máximo 65% no ensaio 3. Provavelmente, pode ter ocorrido consumo de outros açúcares redutores, resultantes da hidrólise do papel pela celulase, por exemplo, de celobiose, que é um carboidrato insolúvel em meios aquosos. O consumo de celobiose, por exemplo, dobra o rendimento de H_2 . Nesses ensaios foram realizadas análises de consumo de carboidratos redutores solúveis apenas. A segunda hipótese seria o consumo de celulase, proteína, cuja adição nos reatores elevou drasticamente a DQO inicial.

É possível afirmar que a biomassa proveniente do fluido de rúmen, após tratamento ácido, foi capaz de produzir H_2 a partir de açúcares fermentáveis liberados na hidrólise do papel. A adição de celulase foi essencial para que o processo ocorresse, já que nos ensaios controle, sem enzima, não foi detectada produção de H_2 . A produção de H_2 e as rotas metabólicas ocorridas no processo foram condizentes com os resultados obtidos nas análises do gene RNAr 16S da cultura bacteriana, cujas sequências foram relacionadas a *Clostridium*.

Tabela 5.10 - Resumo geral dos parâmetros obtidos dos reatores anaeróbios para as diferentes condições com papel e celulase

Parâmetro	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3
	0,5 g/L Papel	2,0 g/L Papel	4,0 g/L Papel
	4mL/L Celulase	15 mL/L Celulase	30 mL/L Celulase
Consumo de Carboidratos Solúveis (%)	56	56,6	65,4
STV Final (g/L)	1,584	6,093	12,404
pH final	4,6	3,75	3,55
Duração do Experimento (h)	69	100	168
Compostos Orgânicos (concentrações máximas mg/L)*			
Ác. Butírico	499,9	1.161,5	2.644,2
Ác. Acético	20,2	52,9	175,2
Ác. Isobutírico	138,1	600,7	393,4
Ác. Propiônico	156,3	193,5	164,7
Ác. Fórmico	11,0	102,2	238,5
Ác. Capróico	35,3	194,7	271,5
Etanol	26,0	517,4	362,8
<i>n</i> -butanol	<= 1.d.	<= 1.d.	1.532,7
Geração máxima H ₂ (mmol)	21,28	56,5	105,6
Período de Ocorrência (h)	30	72	91
Potencial Máximo de Produção de H ₂ (P)	21,0	53,23	96,55
Rendimento (mmol/ g papel)	42	26,6	24
Taxa Máxima de Produção de H ₂ (R _m)	2,19	4,26	4,21
Tempo de Fase Lag (λ)	7,14	7,28	2,75

*O tempo no qual a concentração máxima de cada subproduto orgânico foi detectada variou para cada composto orgânico;

l.d. = limite de detecção: (ácido butírico = 6,913 mg/L; ácido acético = 3,358 mg/L; ácido iso-butírico = 4,105 mg/L; ácido propiônico = 12,770 mg/L; ácido fórmico = 2,383 mg/L; ácido capróico = 0,158 mg/L; etanol = 19,278 mg/L; *n*-butanol = 23,021 mg/L).

6. CONCLUSÕES

A biomassa selecionada foi capaz de fermentar os substratos orgânicos e produzir H_2 , na presença da celulase. A adição dessa enzima foi indispensável para a produção de H_2 a partir da utilização do papel como substrato, pois catalisou a hidrólise do papel em açúcares prontamente fermentáveis, possibilitando a produção de H_2 .

O pré-tratamento ácido aplicado ao inóculo foi eficiente para inibir as arqueias metanogênicas e selecionar as bactérias produtoras de H_2 .

O consórcio bacteriano selecionado era fermentativo, porém não celulolítico. A produção de H_2 foi detectada somente nos ensaios em que a celulase foi adicionada.

A produção de H_2 se deu predominantemente pela via do ácido butírico, que foi o principal subproduto orgânico gerado em todos os ensaios com celulase.

O predomínio de bacilos Gram positivos formadores de endósporos foi evidenciado em todos os reatores. Essa evidência corroborou a obtenção de espécies geradoras de H_2 no consórcio microbiano.

Bactérias semelhantes à *Clostridium*, comum em consórcios microbianos fermentativos produtores de H_2 , foram identificadas em todos os reatores e provavelmente foram responsáveis pela produção de H_2 .

A presença de *Clostridium* foi atribuída à capacidade dessas bactérias de formar endósporos em condições ambientais adversas, tais como, diminuição do pH a 3,0 durante o pré-tratamento ácido do fluido de rúmen.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, M.W. The structure and mechanism of iron-hydrogenases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1020, n. 2, p. 115-145, 1990.

AFSCHAR, A.S.; SCHALLER, K.; SCHURGERL, K. Continuous production of acetone and butanol with shear-activated *Clostridium acetobutylicum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p. 315–22, 1986.

ANDREESEN, J.R.; BAHL, H.; GOTTSCHALK, G. Introduction to the physiology and biochemistry of the genus *Clostridium*. In: Minton NP, Clarke DJ, editors. Biotechnology handbooks: Clostridia. New York: Plenum Press; 1989.

APHA, AWWA and WEF. Standard methods for the examination of water and wastewater. 20th edition, American Public Health Association, Washington, D. C, 2005.

BAYER, E.A.; KENIG, R.; LAMED, R. Adherence of *Clostridium thermocellum* to cellulose. **Journal of Bacteriology**, v. 156, p. 818–827, 1983.

BIEBEL, H.; SPROER, C. Taxonomy of the glycerol fermenting clostridia and description of *Clostridium diolis* sp. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 25, p. 491-497, 2002.

CHAIRATTANAMANOKORN, P.; PENTHAMKEERATI, P.; REUNGSANG, A.; LO, Y-C.; LU, W-B.; CHANG, J-S. Production of biohydrogen from hydrolysed bagasse with thermally preheated sludge. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, p. 7612-7617, 2009.

CHANG, J.J.; CHEN, W.E.; SHIH, S.Y.; YU, S.J.; LAY, J.J.; WEN, F.S.; HUANG, C.C. Molecular detection of the clostridia in an anaerobic biohydrogen fermentation system by hydrogenase mRNA-targeted reverse transcription-PCR. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.70, p. 598-604, 2006.

CHANG, J.J.; LIN, J.J.; HO, C.Y.; CHIN, W.C.; HUANG, C.C. Establishment of rumen-mimic bacterial consortia: a functional union for biohydrogen production from cellulosic bioresource. **International Journal of Hydrogen Production**, v. 35, p. 1579-1585, 2010.

CHEONG, D-Y.; HANSEN, C.L. Bacterial stress enrichment enhances anaerobic hydrogen production in cattle manure sludge. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 72, n. 4, p. 635-643, 2006.

CHEN, C.C.; LIN, C.Y.; LIN, M.C. Acid-base enrichment enhances anaerobic hydrogen production process. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, p. 224-228, 2002.

CHEN, W.; TSENG, Z.; LEE, K.; CHANG, J. Fermentative hydrogen production with *Clostridium butyricum* cgs5 isolated from anaerobic sewage sludge. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 30, p.1063-1070, 2005.

CHEN, W.; CHEN, S.; KUMAR KHANAL, S.; SUNG, S. Kinetic study of biological hydrogen production by anaerobic fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 31, p. 2170-2178, 2006.

CHIN, H. L.; CHEN, Z. S.; CHOU, C. P. Fedbatch operation using *Clostridium acetobutylicum* suspension culture as biocatalyst for enhancing hydrogen production. **Biotechnology Progress**, v. 19, p. 383-388, 2003.

CHUN, J. Computer assisted classification and identification of actinomycetes. *Ph.D. Thesis, University of Newcastle upon Tyne, Newcastle upon Tyne, UK, 1995.*

COX, P.M.; BETTS, R.A.; JONES, C.D.; SPALL, S.A.; TOTTERDELL, I.J. Acceleration of global warming due to carbon-cycle feedbacks in a coupled climate model. **Nature**, v. 408, p. 184-187, 2000.

DABROCK, B.; BAHL, H.; GOTTSCHALK, G. Parameters affecting solvent production by *Clostridium pasteurianum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, p. 1233-1239, 1992.

DAS, D.; DUTTA, T.; NATH, K.; KOTAY, S.M.; DAS, A.K.; VEZIROGLU, T.N. Role of Fe-hydrogenase in biological hydrogen production. **Current Science**, v. 90, p. 1627-1637, 2006.

De VRIJE, T.; BAKKER, R.R.; BUDDE, M.A.; LAI, M.H.; MARS, A.E.; CLAASSEN, P.A. Efficient hydrogen production from the lignocellulosic energy crop *Miscanthus* by the extreme thermophilic bacteria *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* and *Thermatoga neapolitana*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 2, n. 12, p.1-15, 2009.

DEHORITY, B.A. Hemicellulose degradation by rumen bacteria. **Federation Proceedings**, v. 32, n. 7, p. 1819-1825, 1973.

DEL NERY, V. Utilização de lodo anaeróbio imobilizado em gel no estudo da partida de reatores de fluxo ascendente com manta de lodo. São Carlos. Dissertação (mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 1987.

DSM –Scientific Services of Culture Collections. Curso Ministrado na Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”, Campinas, 1991.

DUBOIS, M., GILLES, K. A., HAMILTON, J. K., REBERS, P. A., SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1965.

EZEJI, T.C.; QURESHI, N.; BLASCHEK, H.P. Production of acetone, butanol and ethanol by *Clostridium beijerinckii* BA101 and *in situ* recovery by gas stripping. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 19, p. 595-603, 2003.

FANG, H. H. P.; ZHANG, T.; LIU, H. Microbial diversity of a mesophilic H₂-producing sludge. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, p. 112-118, 2002.

FANG, H.H.P.; LI, C.; ZHANG, T. Acidophilic biohydrogen production from rice slurry. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.31, p. 683-692, 2006.

GAUDY, A.; GAUDY, E. *Microbiology for Environmental Scientists and Engineers*. McGraw-Hill, Nova York, 519–566, 1980.

GIAJ-LEVRA, L.A. Estudo de metodologia de contagem para bactérias anaeróbias celulolíticas. São Carlos. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 1991.

GIALLO, J.; GAUDIN, C.; BELAICH, J-P. Metabolism and solubilization of cellulose by *Clostridium cellulolyticum* H10. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 49, n. 5, p. 1216-1221, 1985.

GOTTSCHALK, G. Bacterial fermentations. In: *Bacterial Metabolism*, Springer, Nova York, p. 237–239, 1986.

GRIFFITHS, R. I., WHITELEY, A. S., O'DONNELL, A. G. rapid method for coextraction of DNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA and rRNA- based microbial community composition. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 12, p. 5488-5491, 2000.

GUO, Y. P., FAN, S. Q., FAN, Y. T., PAN, C. M., HOU, H. W. The preparation and application of crude cellulose for cellulose – hydrogen production by anaerobic fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, p. 459-468, 2010.

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

HALLENBECK, P.C. Fundamentals of the fermentative production of hydrogen. Anaerobic Bioconversion for Sustainability. 10th World Congress. Montreal, Canada, v. 1, p. 241-248, 2004.

HATCH, J.L.; FINNERAM, K.T. Influence of reduced electron shuttling compounds on biological H₂ production in the fermentative pure culture *Clostridium beijerinckii*. **Current Microbiology**, v. 56, p. 268-273, 2008.

HAWKES, F.R.; DINSDALE, R.; HAWKES, D.L.; HUSSY, I. Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimization. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 27, p. 1339-1347, 2002.

HAWKES, F.R.; HUSSY, I.; KYAZZE, G.; DINSDALE, R.; HAWKES, D.L. Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: principles and progress. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 32, p. 171-184, 2007.

HERBERT, D.; PHILIPPS, O.S.; STRANG, R.E. Carbohydrate analysis. **Methods on Enzymology SB**, p. 265-277, 1971.

HO, C-Y.; CHANG, J-J., LIN, J-J.; CHIN, T-Y.; MATHEW, G.M.; HUANG, C-C. Establishment of functional rumen bacterial consortia (FRBC) for simultaneous biohydrogen and bioethanol production from lignocellulose. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.36, p. 12168-12176, 2011.

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, n. 3, p. 297–309, 2004.

IVANOVA, G., RAKHELY, G., KOVACS, K.L. Thermophilic biohydrogen production from energy plants by *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* and comparison with related studies. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, p. 3659–3670, 2009.

IYER, P.; BRUNS, M.A.; ZHANG, H.; van GINKEL, S.; LOGAN, B.E. H₂-producing bacterial communities from a heat-treated soil inoculum. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 66, p. 166-173, 2004.

JO, J.H.; LEE, D.S.; PARK, D.; PARK, J.M. Statistical optimization of key process variables for enhanced hydrogen production by newly isolated *Clostridium tyrobutyricum* JM1. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, p. 5176-5183, 2008.

JO, J.H.; JEON, C.O.; LEE, S.Y.; LEE, D.S.; PARK, J.M. Molecular characterization and homologous overexpression of [FeFe]-hydrogenase in *Clostridium tyrobutyricum* JM1. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, p. 1065-1073, 2010.

JONES, D.T.; van der WESTHUIZEN, A.; LONG, S. ALLCOCK, E.R.; REID, S.J.; WOODS, D.R. Solvent production and morphological changes in *Clostridium acetobutylicum*. **Applied and Environmental Microbiologist**, v. 43, n. 6, p. 1434-1439, 1982.

KÁDAR Z., VRIJE T., BUDDE M.A.W., SZENGYEL Z., RÉCZEY K., CLAASSEN P.A.M. Hydrogen production from paper sludge hydrolysate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 105-108, p. 557-566, 2003.

KÁDAR Z., VRIJE T., VAN NOORDEN G.E., BUDDE M.A.W., SZENGYEL Z., RÉCZEY K., CLAASSEN P.A.M. Yields from Glucose, xylose, and paper sludge hydrolysate during hydrogen production by extreme thermophile *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 113-116, p. 0497-0508, 2004.

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

KEYS, S.; SHAHEEN, R.; JONES, D. T. Emended descriptions of *Clostridium acetobutylicum* and *Clostridium beijerinckii*, and descriptions of *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* sp. Nov. and *Clostridium saccharobutylicum* sp. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 2095-2103, 2001

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, 2003.

KIM, B.H.; BELLOWS, P.; DATTA, R.; ZEIKUS, J.G. Control of carbon and electron flow in *Clostridium acetobutylicum* fermentation: utilization of carbon monoxide to inhibit hydrogen production and to enhance butanol yields. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 48, p. 764–770, 1984.

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.

KIM, J.K.; NHAT, L.; CHUN, Y.N.; KIM, S.W. Hydrogen production conditions from food waste by dark fermentation with *Clostridium beijerinckii* KCTC 1785. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v.13, p. 499-504, 2008.

KIRKPATRICK, C.; MAURER, M.L.; OYELAKIN, N.E.; YONCHEVA, Y.N.; MAUER, R.; SLONCZEWSKI, J.L. Acetate and formate stress: opposite responses in the proteome of *Escherichia coli*. **J. Bacteriol**, v. 183, p. 6466–6477, 2001.

KNAPPE, J.; BLASCHKOWSKI, H.P.; GROBNER, P.; SCHMITT, T. Pyruvate formate lyase of *Escherichia coli*: the acetyl enzyme intermediate. **European Journal Biochemistry**, v. 50, p. 253–263, 1974.

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.

KUMAR, N., DAS, D. Continuous hydrogen production by immobilized *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08 using lignocellulosic materials as solid matrix. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 29, p.280–287, 2001.

KUMAR, S.; DUDLEY, J.; NEI, M.; TAMURA, K. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. **Briefings in Bioinformatics**, n. 9, p. 299-306, 2008.

LAMED, R.; BAYER, E.A. The cellulosome of *Clostridium thermocellum*. **Advanced and Applied Microbiology**, v. 33, p. 1–46, 1988.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In: *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, Edited by E. Stackebrandt, p. 1150175, 1991.

LARK, N., XIA, Y., QIN, C. G., GONG, C.S., TSAO, G.T. Production of ethanol from recycled paper sludge using cellulase and yeast, *Kluveromyces marxianus*. **Biomass Bioenergy**, v. 12, p. 135–143, 1997.

LAY, J-J; LI, Y-Y.; NOIKE, T. Influences of pH and moisture content on the methane production in high-solids sludge digestion. **Water Research**, v. 31, p. 1518-1524, 1997.

LAY, J-J.; LEE, Y-J.; NOIKE, T. Feasibility of biological hydrogen production from organic fraction of municipal solid waste. **Water Research**, v. 33, p. 2579-2586, 1999.

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

LAY, J.-J., FAN, K.-S., CHANG, I.J., KU, C.-H. Influence of chemical nature of organic wastes on their conversion to hydrogen by heat-shock digested sludge. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 28, p.1361–1367, 2003.

LEE, S.M.; CHO, M.O.; PARK, C.H.; CHUNG, Y.C.; KIM, J.H.; SANG, B.I.; UM, Y. Continuous butanol production using suspended and immobilized *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 with supplementary butyrate. **Energy Fuels**, v. 22, p. 3459-3464, 2008.

LEE, M.J.; SONG, J.H.; HWANG, S.J. Effects of acid pre-treatment on bio-hydrogen production and microbial communities during dark fermentation. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 1491-1493, 2009.

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

LEVIN, D.B., ISLAM, R., CICEK, N., SPARLING, R. Hydrogen production by *Clostridium thermocellum* 27405 from cellulosic biomass substrates. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 31, p. 1496–1503, 2006.

LIANG, D-W.; SHAYEGAN, S.S.; NG., W.J.; HE, J. Development and characteristics of rapidly formed hydrogen-producing granules in an acidic anaerobic sequencing batch reactor (AnSBR). **Biochemical Engineering Journal**, v.49, p. 119-125, 2010.

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.

LIN, C-Y., CHANG, R-C. Fermentative hydrogen production at ambient temperature. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 29, p. 715-720, 2004.

LIN, P.-Y., WHANG, L.-M., WU, Y.-R., REN, W.-J., HSIAO, C.-J., LI, S.-L., CHANG, J.-S. Biological hydrogen production of the genus *Clostridium*: metabolic study and mathematical model simulation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 32, p.1728–1735, 2007.

LO, Y.C.; CHEN, S.D.; CHEN, C.Y.; HUANG, T.I.; LIN, C.Y.; CHANG, J.S. Combining enzymatic hydrolysis and dark-photo fermentation processes for hydrogen production from starch feedstock: a feasibility study. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, p. 5224-5233, 2008.

LO, Y-C.; SU, Y-C.; CHEN, C-Y.; CHEN, W-M.; LEE, K-S.; CHANG, J-C. Biohydrogen production from cellulosic hydrolysate produced via temperature-shift-enhanced bacterial cellulose hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 5802-5807, 2009.

LYND, L.R.; WEIMER, P.J.; van ZYL, W.H.; PRETORIUS, I.S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66(3), p. 506-577, 2002.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; JOHN, M.; PARKER, J. Microbiologia de Brock. Editora Pearson Education do Brasil. 10ª edição. 608 p., 2004.

MAEDA, T.; SANCHEZ-TORRES, V.; WOOD, T. K. Enhanced hydrogen production from glucose by metabolically engineered *Escherichia coli*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 77, p. 879-890, 2007.

MAINTINGUER, S.I.; FERNANDES, B.S.; DUARTE, I.C.S.; SAVEDRA, N.K.; ADORNO, M.A.T.; VARESCHE, M.B. Fermentative hydrogen production by microbial consortium. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, p. 4309-4317, 2008.

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

MATHEW, G.M.; SUKUMARAN, R.; SINGHANIA, R.R.; PANDEY, A. Progress in research on fungal cellulases for lignocelluloses degradation. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 67, p. 898-907, 2008.

MOHAN, S. V., BABU, V. L., SARMA, P. N. Effect of various pretreatment methods on anaerobic mixed microflora to enhance biohydrogen production utilizing dairy wastepaper as substrate. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 59-67, 2008.

MORIMOTO, K.; KIMURA, T.; SAKKA, K.; OHMIYA, K. Overexpression of a hydrogenase gene in *Clostridium paraputrificum* to enhance hydrogen gas production, **FEMS Microbiology Letters**, n. 246, p. 229–234, 2005.

NANDI, R.; SENGUPTA, S. Microbial production of hydrogen: an overview. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 24, p. 61–84, 1998.

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

NIELSEN A.T.; LIU, W-T.; FILIPE, C.; GRADY, L.; MOLIN, S., STAHL, D.A. Identification of a novel group of bacteria in sludge from deteriorated biological phosphorus removal reactor. **Applied Environmental Microbiology**, v. 65, p. 1251-1258, 1999.

NTAIKOU, I., GAVALA, H.N., KORNAROS, M., LYBERATOS, G. Hydrogen production from sugars and sweet sorghum biomass using *Ruminococcus albus*. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, p. 1153–1163, 2008.

NTAIKOU G., KOUTROS E., KORNAROS M. Valorisation of wastepaper using the fibrolytic/hydrogen producing bacterium *Ruminococcus albus*. **Bioresource Technology**, v. 100, 5928-5933, 2009.

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

OH, Y.K.; SEOL, E.H.; LEE, E.Y.; PARK, S. Fermentative hydrogen production by a new chemoheterotrophic bacterium *Rhodopseudomonas palustris* P4. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 27, p. 1373–1379, 2002.

OH, S.E.; van GINKEL, S.W.; LOGAN, B.E. The relative effectiveness of pH control and heat treatment for enhancing biohydrogen gas production. **Environmental Science and Technology**, v. 37, p. 5186–5190, 2003.

PANAGIOTOPOULOS, I.A., BAKKER, R.R., BUDDE, M.A.W., DE VRIJE, T., CLAASSEN, P.A.M., KOUKIOS, E.G. Fermentative hydrogen production from pretreated biomass: a comparative study. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 6331–6338, 2009.

PAN, C.M.; FAN, Y.T.; ZHAO, P.; HOU, H.W. Biological hydrogen production with *Clostridium beijerinckii* Fanp3 isolated from anaerobic sludge. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 3, p. 5383-5390, 2008.

PAN, C.M.; ZHANG, M.L.; FAN, Y.T.; XING, Y.; HOU, H.W. Production of cellulosic ethanol and hydrogen from solid-state enzymatic treated cornstalk: a two-stage process. **J Agricul Food Chem**, v. 57, p. 2732-2738, 2009.

PATTRA, S., SANGYOKA, S., BOONMEE, M., REUNGSANG, A. Biohydrogen production from the fermentation of sugarcane bagasse hydrolysate by *Clostridium butyricum*. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, p. 5256-5265, 2008.

PAVLOSTATHIS, S.G.; MILLER, T.L.; WOLIN, M.J. Fermentation of insoluble cellulose by continuous cultures of *Ruminococcus albus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 11, p. 2655-2659, 1988.

PETTIPHER, G. L.; LATHAM, M.J. Production of enzymes degrading plant cell walls and fermentation of cellobiose by *Ruminococcus flavefaciens* in batch and continuous culture. **Journal of General Microbiology**, v. 110, p. 29-38, 1979.

PODESTÁ, J.J.; GUTIERREZ-NAVARRO, A.M.; ESTRELLA, C.N.; ESTESO, M.A. Electrochemical measurement of trace concentrations of biological hydrogen produced by Enterobacteriaceae. **Research in Microbiology**, v. 183, p. 87-93, 1997.

RAINEY, F.A.; Stackebrandt, e. 16S rDNA analysis reveals phylogenetic diversity among the polysaccharolytic clostridia. **FEMS Microbiology Letters**, v. 113, p. 125-128, 1993.

REDDY, N.; YANG, Y. Biofibers from agricultural byproducts for industrial applications. **Trends on Biotechnology**, v. 23, p.22-27, 2005.

REN, Z., WARD, T.E., LOGAN, B.E., REGAN, J.M. Characterization of the cellulolytic and hydrogen-producing activities of six mesophilic *Clostridium* species. **Journal of Applied Microbiology**, p. 2258-2266, 2007.

REN, N-Q.; XU, J-F.; GAO, L-F.; XIN, L.; QIU, J.; SU, D-X. Fermentative bio-hydrogen production from cellulose by cow dung compost enriched cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, p. 2742-2746, 2010.

REZAEI, F.; RICHARD, T.I.; LOGAN, B.E. Enzymatic hydrolysis of cellulose coupled with electricity generation in a microbial fuel cell. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 101(6), p. 1163-1169, 2008.

ROYCHOWDHURY, S.; COX, D.; LEVANDOWSKY. Production of hydrogen by microbial fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 13, p. 407-410, 1988.

SHARMA, V.K.; HOBSON, P.N. Isolation and cellulolytic activities of Bacteria from a cattle waste anaerobic digester and the properties of some *Clostridium* species. **Agricultural wastes**, v. 14, p. 173-196, 1985.

SAITOU, N., NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic tree. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, p. 406-425, 1987.

SAXENA, A., GARG, S.K., VERMA, J. Simultaneous saccharification and fermentation of waste newspaper to ethanol. **Bioresource Technology**, v. 42, p. 13-15, 1992.

SCHLAPBACH, L., ZÜTTEL, A. Hydrogen-storage materials for mobile applications. **Nature**, v. 414, p.353-358, 2005.

SCHMIDT, S., PADUKONE, N. Production of lactic acid from wastepaper as a cellulosic feedstock. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology** v. 18, p. 10-14, 1997.

SCHWARZ, W.H. The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, p. 634-649, 2001.

SOLOMON, B.O.; ZENG, A.R.; BIEBL, H.; SCHLIEKER, H.; POSTEN, C.; DECKWER, W.D: Comparison of the energetic efficiencies of hydrogen and oxychemicals formation in *Klebsiella Pneumoniae* and *Clostridium butyricum* during anaerobic growth on glycerol. **Journal of Biotechnology**, v. 39, p. 107-117, 1995.

SPEECE, R.E. Anaerobic biotechnology for industrial wastewaters. Nashville, Tennessee, Archae Press, 1996.

TANISHO, S., ISHIWATA, W. Continuous hydrogen production from molasses by the bacterium *Enterobacter aerogenes*. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 19, p. 807-812, 1994.

THAUER, R.K.; JUNGERMANN, K.; DECKER, K.: Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. **Bacteriology Reviews**, v. 41, p. 100-180, 1977.

TEERI, T.T. Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. **Tibtech May**, v. 15, p. 160-167, 1997.

TROSCHINETZ, A.M., MIHELICIC, J.R. Sustainable recycling of municipal solid waste in developing countries. **Waste Management**, v. 29, p. 915-923, 2009.

UENO, Y.; KAWAI, T.; SATO, S.; OTSUKA, S.; MORIMOTO, M. Biological production of hydrogen from cellulose by natural anaerobic microflora. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 79, n. 4, p. 395-397, 1995.

UENO, Y.; HARUTA, S.; ISHII, M.; IGARASHI, Y. Microbial community in anaerobic hydrogen-producing microflora enriched from sludge compost. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 57, p. 555-562, 2001.

UNEP, 2001. Solid Waste Management, Nepal: State of the Environment 2001, United Nations Environment Programme, p. 97-118, 2001, Chapter 3.3.

VALDEZ-VAZQUEZ, I.; SPARLING, R.; RISBEY, D.; RINDERKNECHT-SEIJAS, N.; POGGI-VARALDO, H.M. Hydrogen generation via anaerobic fermentation of paper mill wastes. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 96, p.1907-1913, 2005.

Van ANDEL, J.G.; ZOUTBERG, G.R.; CRABBENDAM, P.M.; BREURE, A.M. Glucose fermentation by *Clostridium butyricum* grown under a self generated gas atmosphere in chemostat Culture solvent formation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p. 21-26, 1985.

Van GINKEL, S.W.; LOGAN, B. Increased biological hydrogen production with reduced organic loading. **Water Research**, v. 39, p. 3819-3826, 2005.

van WYK, J.P.H., MOHULATSI, M. Biodegradation of wastepaper by cellulase from *Trichoderma viride*. **Bioresource Technology**, v. 86, p. 21-23, 2003.

VAVILIN, V.A.; RYTOW, S.V.; LOKSHINA, L.Y. Modelling hydrogen partial pressure change as a result of competition between the butyric and propionic groups of acidogenic bacteria. **Bioresource Technology**, v. 54, p. 171-177, 1995.

WANG, J., WAN, W. Factors influencing fermentative hydrogen production: a review. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, no. 2, p. 799-811, 2009.

WEIMER, P. J., LOPEZ-GUISA, J. M., FRENCH, A. D. Effect of Cellulose Fine Structure on kinetics of its digestion by mixed ruminal microorganisms in vitro. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, no. 8, p. 2421-2429, 1990.

WIDDEL, F.; PFENNING, N. Genus *Desulfobacter*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, v. 2, 1599 p., 1984.

WHITE D. The physiology and biochemistry of prokaryotes. Oxford University Press, New York, 1995.

WOODWARD, J.; ORR, M.; CORDRAY, K.; GREENBAUM, E. Enzymatic production of biohydrogen. **Nature**, v. 405, p. 1014–1015, 2000.

XING, D.; REN, N.; RITTMANN, B.E. Genetic diversity of hydrogen-production bacteria in acidophilic ethanol-H₂-coproducing system, analysed using the [Fe]-Hydrogenase Gene. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n.4, p. 1232-1239, 2008.

YOSHIDA, A., NISHIMURA, T., KAWAGUCHI, H., INUI, M., YAKAWA, H. Enhanced hydrogen production from glucose using *Idh*- and *frd*-inactivated *Escherichia coli* DJT135. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, p. 67 -72, 2006.

ZEIKUS, J.G. Chemical and fuel production by anaerobic bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 34, p. 423–464, 1980.

ZHANG, T.; LIU, H.; FANG, H.H.P. Biohydrogen production from starch in wastewater under thermophilic condition. **Journal of Environmental Management**, v. 69, p. 149-156, 2003.

ZHAO, X.; XING, D.; FU, N.; LIU, B.; REN, N. Hydrogen production by the newly isolated *Clostridium beijerinckii* RZF-1108. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 8432-8436, 2011.

ZHENG, X.J.; YU, H.Q. Inhibitory effects of butyrate on biological hydrogen production with mixed anaerobic cultures. **Journal of Environmental Management**, v. 74, p. 65-70, 2005.

ZWIETERING, M.H.; JONGENBURGER, I.; ROMBOUTS, F.M.; van't RIET, K. Modeling of the bacterial growth curve. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 6, p. 1875-1881, 1990.

ANEXO I - Curva de Hidrogênio – Cromatógrafo gasoso GC 2010

Temperatura ambiente = 298 K

Pressão ambiente = 690 mmHg

Constante dos gases = 62,3 (mmHg*L)/ (mol*K)

Figura I.1 - Obtenção da equação que relaciona mol de H₂ e área cromatográfica

ANEXO II - Curva de calibração para determinação de glicose

Figura II.1 - Obtenção da equação que relaciona absorbância e concentração de glicose

**ANEXO III – Curvas: DQO x Concentração de papel; Glicose x Concentração de papel;
DQO x Concentração de celulase**

Figura III.1 - Concentração de DQO x Concentração de papel

Figura III.2 - Concentração de glicose x Concentração de papel

Figura III.3 - Concentração de DQO x Concentração de celulase

ANEXO IV - Ajuste da Produção acumulada de H₂ na equação de Gompertz modificada

Figura IV.1 - Ajuste da evolução de H₂ (mmol) no modelo modificado de Gompertz para o ensaio 1

Figura IV.2 - Ajuste da evolução de H₂ (mmol) no modelo modificado de Gompertz para o ensaio 2

Figura IV.3 - Ajuste da evolução de H₂ (mmol) no modelo modificado de Gompertz para o ensaio 3

ANEXO V – Variação temporal da concentração de subprodutos orgânicos nos ensaios 1, 2 e 3

Tabela V.1 - Concentração dos subprodutos orgânicos gerados no processo fermentativo para o ensaio 1

Tempo (h)	Ác. Acético		Ác. Fórmico		Ác. Propiônico		Ác. Iso-butírico		Ác. Butírico		Ác. Capróico		Etanol	
	mg/L	mmol/L	mg/L	mmol/L	mg/L	mmol/L	mg/L	mmol/L	mg/L	mmol/L	mg/L	mmol/L	mg/L	mmol/L
0,0	9,0	0,2	0,0	0,0	156,3	2,1	126,4	1,5	25,7	0,3	7,5	0,1	0,0	0,0
1,0	10,9	0,2	4,9	0,1	155,6	2,1	120,7	1,4	18,2	0,2	12,5	0,1	0,0	0,0
3,0	10,6	0,2	0,0	0,0	77,0	1,0	40,3	0,5	1,3	0,0	15,9	0,1	0,0	0,0
6,5	14,0	0,2	10,0	0,2	50,2	0,7	80,1	0,9	23,1	0,3	9,9	0,1	0,0	0,0
11,5	2,8	0,0	10,5	0,2	45,8	0,6	138,1	1,6	96,2	1,1	7,7	0,1	0,0	0,0
17,0	4,8	0,1	11,0	0,2	51,1	0,7	7,1	0,1	176,6	2,1	10,5	0,1	0,0	0,0
29,5	10,0	0,2	0,0	0,0	43,0	0,6	0,0	0,00	324,3	4,0	17,3	0,1	0,0	0,0
51,5	15,7	0,3	0,0	0,0	54,2	0,7	1,5	0,02	310,9	3,8	17,2	0,1	26,0	0,6
69,0	20,2	0,3	0,0	0,0	66,7	0,9	13,2	0,02	499,9	6,2	35,3	0,3	9,2	0,2

Tabela V.2 - Concentração dos subprodutos orgânicos gerados no processo fermentativo para o ensaio 2

Tempo (h)	Ác. Acético		Ác. Fórmico		Ác. Propiônico		Ác. Iso-butírico		Ác. Butírico		Ác. Capróico		Etanol	
	mg/L	mmol/L	mg/L	mmol/L	mg/L	mmol/L	mg/L	mmol/L	mg/L	mmol/L	mg/L	mmol/L	mg/L	mmol/L
0,0	13,5	0,2	0,0	0,0	170,4	2,3	181,9	2,5	94,1	1,1	9,3	0,1	0,0	0,0
4,5	34,6	0,6	0,0	0,0	192,4	2,6	381,2	5,2	101,4	1,2	8,6	0,1	25,5	0,6
5,5	52,9	0,9	0,0	0,0	193,5	2,6	545,9	7,4	163,2	1,9	8,5	0,1	12,6	0,3
8,0	44,4	0,8	98,3	2,1	171,4	2,3	600,7	8,1	261,6	3,0	9,5	0,1	34,0	0,7
12,0	24,8	0,4	61,3	1,3	143,9	1,9	558,4	7,5	568,1	6,5	12,7	0,1	30,8	0,7
16,5	21,1	0,4	102,2	2,2	165,0	2,2	263,5	3,6	720,7	8,3	38,8	0,3	0,0	0,0
28,5	26,1	0,4	31,6	0,7	130,1	1,8	166,1	2,2	921,1	10,6	36,2	0,3	117,0	2,5
100,0	10,4	0,2	8,8	0,2	154,5	2,1	54,1	0,7	1161,5	13,4	194,7	1,7	517,4	11,2

Tabela V.3 - Concentração dos subprodutos orgânicos gerados no processo fermentativo para o ensaio 3

Tempo (h)	Ác. Acético		Ác. Propiônico		Ác. Fórmico		Ác. Iso-butírico		Ác. Butírico		Ác. Capróico		Etanol		N-butanol	
	mg/L	mmol/L	mg/L	mmol/L	mg/L	mmol/L	mg/L	mmol/L	mg/L	mmol/L	mg/L	mmol/L	mg/L	mmol/L	mg/L	mmol/L
0	5,2	0,1	184,9	2,5	0,0	0,0	142,1	1,6	191,2	2,2	17,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0
1	44,5	0,8	186,8	2,5	0,0	0,0	163,2	1,9	174,8	2,0	18,0	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0
4,5	55,5	0,9	172,2	2,3	0,0	0,0	121,1	1,4	145,6	1,7	15,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0
6,5	149,6	2,5	238,5	3,2	0,0	0,0	238,8	2,7	319,3	3,7	21,4	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0
7,5	115,9	2,0	158,1	2,1	58,2	1,3	307,7	3,5	382,6	4,4	14,4	0,1	27,3	0,6	0,0	0,0
9,5	88,4	1,5	81,5	1,1	37,5	0,8	205,8	2,4	356,8	4,1	13,4	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0
13	175,2	3,0	151,2	2,0	47,5	1,0	393,4	4,5	733,2	8,4	12,0	0,1	0,0	0,0	79,9	1,1
18,4	52,6	0,9	140,4	1,9	22,8	0,5	349,4	4,0	953,4	11,0	16,6	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0
26,4	49,5	0,8	110,0	1,5	56,1	1,2	99,8	1,1	1077,9	12,4	37,7	0,3	58,8	1,3	403,9	0,0
35,4	48,5	0,8	47,0	0,6	20,2	0,4	383,4	4,4	1426,4	16,4	26,5	0,2	66,4	1,4	294,2	0,0
55,4	19,7	0,3	66,7	0,9	102,9	2,2	174,3	2,0	1613,5	18,5	17,0	0,1	362,8	7,9	393,4	5,3
80,4	63,7	1,1	71,1	1,0	164,7	3,6	162,7	1,9	2702,9	31,1	15,7	0,1	163,4	3,6	363,9	4,9
168	37,8	0,6	145,7	2,0	2,5	0,1	168,3	1,9	2644,2	30,4	271,5	2,3	317,8	6,9	1532,7	20,7

ANEXO VI - Pressão Parcial de H₂ nos reatores dos ensaios 1, 2 e 3

Tabela VI.1 - Pressão parcial de H₂ no ensaio 1

Tempo de Operação (h)	Pressão Parcial de H ₂
0	0,000
1	0,000
2	0,000
3	0,000
4	0,000
5	0,000
6	0,000
7	0,009
8	0,013
9	0,023
10	0,033
11	0,048
12	0,063
13	0,068
14	0,080
15	0,086
16	0,091
17	0,096
21,5	0,113
24	0,113
30	0,118
47	0,117
52	0,115
69	0,114

Tabela VI.II - Pressão parcial de H₂ no ensaio 2

Tempo de Operação (h)	Pressão Parcial de H₂
0	0,000
2	0,000
3	0,000
4,5	0,000
5,5	0,000
7	0,010
8	0,026
9	0,049
10	0,072
12	0,100
14	0,168
16,5	0,208
19	0,231
21	0,254
25	0,278
28,5	0,285
31,5	0,319
35,5	0,309
47,5	0,296
54,5	0,274
72	0,312
77	0,290
100	0,272

Tabela VI.III - Pressão pressão de H₂ no ensaio 3

Tempo de Operação (h)	Pressão Parcial de H₂
0	0,000
2	0,000
3	0,000
4	0,000
5	0,000
6	0,020
7	0,082
8	0,155
9	0,191
10	0,225
11	0,248
12,75	0,284
14,25	0,307
16	0,290
18	0,300
26	0,356
31	0,449
35	0,548
44	0,407
49	0,513
69	0,571
75	0,604
91	0,616
98	0,577
120	0,569
146	0,578
168	0,579