

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE HIDRÁULICA E SANEAMENTO

CAROLINA ZAMPOL LAZARO

Obtenção e caracterização filogenética de consórcio de bactérias fototróficas púrpuras não-sulfurosas consumidoras de ácidos orgânicos visando a produção de hidrogênio em reator anaeróbio de batelada

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos, da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Hidráulica e Saneamento.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Maria Bernadete Amâncio Varesche

São Carlos/SP

Março/2009


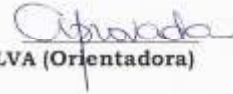
FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Licenciada **CAROLINA ZAMPOL LAZARO**

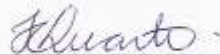
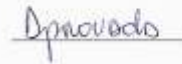
Dissertação defendida e julgada em 17/04/2009 perante a Comissão Julgadora:



Prof.^a. Dr.^a. **MARIA BERNADETE AMÂNCIO VARESCHE SILVA (Orientadora)**
(Escola de Engenharia de São Carlos/USP)



Prof.^a. Titular **MARIA DO CARMO CALJURI**
(Escola de Engenharia de São Carlos/USP)



Prof.^a. Dr.^a. **IOLANDA CRISTINA SILVEIRA DUARTE**
(Universidade Federal de São Carlos/UFSCar)



Prof. Associado **MARCELO ZAIAT**
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em
Engenharia (Hidráulica e Saneamento)



Prof. Associado **GERALDO ROBERTO MARTINS DA COSTA**
Presidente da Comissão da Pós-Graduação da EESC

Ao meu avô Victório,
aos meus pais Walter e Heloisa e
aos meus padrinhos Sérgio e Regina
por todo apoio e carinho.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer:

À minha orientadora, Prof^ª. Dra. Maria Bernadete Varesche, pela oportunidade, pelo apoio e orientação durante a realização deste trabalho

Ao Prof. Dr. Marcelo Zaiat pelas sugestões no primeiro exame de qualificação.

Às professoras Dra Maria do Carmo Calijuri e Dra Iolanda Cristina Silveira Duarte pelas sugestões e contribuições para este trabalho.

À Dra Isabel Kimiko Sakamoto por suas colaborações e sugestões no exame de qualificação e também durante a execução do trabalho.

À amiga Dra. Julia Sumiko Hirasawa pela constante ajuda e companhia durante os últimos doze meses.

À doutoranda Sandra Imaculada Maitinguer pela companhia e pelos conselhos.

À doutoranda Daniele Vital Vich pela orientação nas análises de Biologia Molecular.

Às técnicas do laboratório Maria Ângela e Eloisa pela colaboração na execução das análises.

À minha amiga/irmã Ana Paula Erbeta Sueitt por todos esses anos de Graduação e Mestrado.

Ao meu companheiro Breno pela paciência e compreensão durante os últimos 24 meses.

Aos meus colegas de laboratório Betão, Arnaldo, Lorena, Dagoberto, Tiago Martins, Regiane e tantos outros que foram tão importantes durante este último ano pelos momentos de descontração e discussão.

À minha família, por todo apoio, carinho e amor, especialmente aos meus pais e padrinhos.

Ao CNPq, pela bolsa concedida.

"Construímos muitos muros e poucas pontes."

Isaac Newton

Resumo

LAZARO, C. Z. **Obtenção e caracterização filogenética de consórcio de bactérias fototróficas púrpuras não-sulfurosas consumidoras de ácidos orgânicos visando a produção de hidrogênio em reator anaeróbio de batelada**, Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

O objetivo deste trabalho foi enriquecer consórcio microbiano a partir de mistura de lodo granular de digestor anaeróbio de fluxo ascendente sob condições fototróficas anoxigênicas. Por meio de técnica de Biologia molecular foi possível identificar 17 Unidades Taxonômicas Operacionais (UTO) no consórcio microbiano, dentre as quais seqüências similares a *Rhodobacter*, gênero amplamente citado nos estudos de produção de gás hidrogênio por bactérias fototróficas. Exames microscópicos do consórcio fototrófico indicaram predomínio de bacilos Gram-negativos. Ensaio sob condições fototróficas foram realizados com dois meios de cultivo (RCVB e FANG) e os seguintes substratos orgânicos: ácido acético, butírico, cítrico, láctico e málico, empregados como fonte de carbono, tanto para o crescimento celular, como para a produção do gás hidrogênio. A relação C/N inicial foi 30/4 e posteriormente 15/2, com o objetivo de favorecer o crescimento celular e a produção do H₂. A concentração dos substratos foi determinada de forma com que essa relação se mantivesse a mesma. O crescimento celular e consumo dos ácidos orgânicos foram similares para os dois meios de cultivo empregados. Entretanto, a produção do gás hidrogênio foi maior nos ensaios com o meio FANG. Dentre os substratos utilizados o consumo dos ácidos cítrico e málico foram os maiores (~100 %), para concentrações iniciais de 3,3 g/L e 2,6 g/L, respectivamente. O menor consumo 25 % foi observado em meio RCVB e ácido acético (2,5 g/L). O crescimento da biomassa variou de 0,06 g/L a 1,1 g/L, enquanto que a velocidade máxima específica de crescimento variou de 0,4 a 0,2 g SSV/L.d entre os substratos utilizados. A menor e maior concentração de hidrogênio foram de 8,5 e 22 mmol H₂/L, para os reatores alimentados com ácido láctico e málico em meio FANG, respectivamente. Pôde-se concluir que o consórcio fototrófico enriquecido foi capaz de utilizar os ácidos orgânicos para produção do gás hidrogênio.

Palavras-chave: bactérias fototróficas púrpuras não-sulfurosas, gás hidrogênio, ácidos orgânicos, filogenia, sequenciamento do gene RNAr 16S

Abstract

LAZARO, C. Z. **Obtainment and phylogenetic characterization of consortium of phototrophic purple non-sulfur bacteria for hydrogen production from organic acids in the anaerobic batch reactor**, Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

The aim of this work was enrich a mixture of granular sludge of an up flow anaerobic sludge blanket (UASB) under anoxygenic phototrophic conditions. The techniques of molecular biology identified 17 Operational Taxonomic Units (UTO) in the microbial consortium among the sequences analysed, which were similar to *Rhodobacter*, genus widely cited in studies of hydrogen gas production by phototrophic bacteria. Microscopic examinations of the phototrophic consortium showed predominance of Gram-negative bacilli. Tests were conducted under phototrophic conditions with two culture media (RCVB and FANG) and the following organic substrates: acetic, butyric, citric, lactic and malic acids that were used as carbon source for both cell growth and for the hydrogen gas production. The carbon nitrogen ratio (C/N) in the preliminaries tests was 30/4 and then it was changed to 15/2 in order to improve the cell growth and hydrogen production. The concentration of substrates was determined for remain the same carbon/nitrogen ratio among the substrates. The cell growth and consumption of organic acids were similar for the two culture media used. However, the production of hydrogen gas was higher in trials with the medium FANG. Among the substrates used, the consumption of malic and citric acids were the highest (~ 100%) for initial concentrations of 3.3 g/L and 2.6 g/L, respectively. The shortest consumption (25 %) was observed for the cells that grew on acetic acid, 2.5 g/L in RCVB culture medium. The growth of the biomass varied from 0.06 g/L to 1.1 g/L, whereas the maximum specific growth rate ranged from 0.4 to 0.2 g VSS/L.d between the substrates used. The lowest and highest concentrations of hydrogen were 8.5 and 22 mmol H₂/L for the reactor fed with lactic acid and malic acid in FANG's medium, respectively. It was concluded that the phototrophic consortium was able to use those organic acids for the production of hydrogen gas.

Keywords: phototrophic purple non-sulfur bacteria, hydrogen gas, organic acids, phylogeny, 16S rRNA gene sequencing

Lista de Figuras

Figura 3.1: Metabolismo fotoheterotrófico (adaptado de KOKU <i>et al.</i> , 2002)	30
Figura 4.1: Fluxograma experimental.....	42
Figura 5.1: Cromatograma típico de ácidos orgânicos de cadeia curta determinado por CLAE, com detector de UV e arranjo de diodos. Condições: coluna Aminex® HPX-87H, fase móvel: 0,005 M H ₂ SO ₄ ; fluxo: 0,8 mL/min, temperatura do forno: 64 °C e $\lambda=208$ nm.....	63
Figura 5.2: a) Consórcio fototrófico de bactéria púrpura não-sulfurosa após três semanas de incubação; b) Biomassa fototrófica púrpura não-sulfurosa	68
Figura 5.3: Microscopia óptica de contraste fase das amostras dos reatores em batelada na fase enriquecimento (Aumento -2000X): a) morfologias celulares, tais como, bacilos, cocos e espiroquetas, e b) aglomerado celular.....	68
Figura 5.4: Microscopia óptica de contraste fase das amostras dos reatores em batelada na fase purificação (Aumento -2000X)	69
Figura 5.5: Microscopia óptica de luz comum de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (Aumento -2000X).....	70
Figura 5.6: Microscopia óptica de contraste de fase de amostras do consórcio microbiano fototrófico.....	71
Figura 5.7: Curva de rarefação	72
Figura 5.8: Distribuição dos 43 clones nas 17 unidades taxonômicas operacionais (UTOs). 73	
Figura 5.9: Árvore filogenética dos clones seqüenciados para o Domínio <i>Bacteria</i> . O número de acesso dos dados está apresentado entre parênteses após o nome da espécie. A barra de escala demonstra a distância filogenética e <i>E. coli</i> foi o <i>outgroup</i> escolhido.....	77
Figura 5.10: Porcentagens dos clones pertencentes aos grupos identificados no consórcio fototrófico.....	80
Figura 5.11: Relação entre absorvância e SSV	81
Figura 5.12: Variação temporal do crescimento do consórcio fototrófico, consumo ácido cítrico e produção de ácido acético em meio RCVB	85
Figura 5.13: Variação temporal do crescimento do consórcio fototrófico, consumo de ácido málico e produção dos ácidos acético e succínico em meio RCVB	87
Figura 5.14: Variação temporal do crescimento do consórcio fototrófico, consumo do ácido butírico e produção de ácido acético em meio RCVB	88

Figura 5.15: Variação temporal do crescimento do consórcio fototrófico, consumo de ácido láctico e produção de ácido acético em meio RCVB	89
Figura 5.16: Variação temporal do crescimento do consórcio fototrófico e consumo de ácido acético em meio RCVB.....	90
Figura 5.17: Variação temporal do crescimento do consórcio fototrófico, consumo de ácido cítrico e produção de ácido acético em meio FANG	93
Figura 5.18: Variação temporal do crescimento do consórcio fototrófico, consumo de ácido málico e produção dos ácidos acético e succínico em meio FANG	94
Figura 5.19: Variação temporal do crescimento do consórcio fototrófico, consumo de ácido butírico e produção de ácido acético em meio FANG.....	95
Figura 5.20: Variação temporal do crescimento do consórcio fototrófico, consumo de ácido láctico e produção de ácido acético em meio FANG	96
Figura 5.21: Variação temporal do crescimento do consórcio fototrófico e consumo de ácido acético em meio FANG.....	97
Figura 5.22: Produção do gás hidrogênio para os diferentes substratos em meio FANG....	100

Lista de Tabelas

Tabela 4.1: Resumo dos ensaios realizados em diferentes etapas deste estudo	45
Tabela 4.2: Composição do meio RCVB modificado	47
Tabela 4.3: Composição do meio de cultivo FANG.....	47
Tabela 4.4: Composição da solução traço de metais do meio RCVB	48
Tabela 4.5: Composição da solução traço de metais do meio FANG	48
Tabela 4.6: Soluções-estoque	50
Tabela 4.7: <i>Primers</i> utilizados na amplificação do gene do DNAr 16S.....	52
Tabela 4.8: Composição do meio de cultivo Luria-Bertani	53
Tabela 4.9: Componentes adicionados ao meio de cultivo Luria-Bertani	53
Tabela 4.10: Composição da solução de GTE	54
Tabela 4.11: Composição da solução de NaOH/SDS.....	55
Tabela 4.12: Composição da solução de acetato de potássio pH 4,8	55
Tabela 4.13: <i>Primers</i> utilizados na amplificação do DNA plasmidial	55
Tabela 4.14: Programação do termociclador para amplificação dos fragmentos do DNA plasmidial	55
Tabela 4.15: Programação do termociclador para reações de sequenciamento	55
Tabela 4.16: Pureza e concentração das soluções-estoques de ácidos orgânicos	59
Tabela 4.17: Valores calculados das concentrações para as curvas de calibração.....	61
Tabela 5.1: Equações das curvas de regressão em água ultrapurificada e substrato sintético	64
Tabela 5.2: Precisão do método para cada analito diluído (n=3) em água ultrapurificada e substrato sintético	65
Tabela 5.3: Repetibilidade do método para 700 mg/L (n=10) em substrato sintético.....	66
Tabela 5.4: Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ).....	66
Tabela 5.5: Afiliação das sequências obtidas dos clones do consórcio fototrófico.....	78
Tabela 5.6: Valores de SSV iniciais e máximos obtidos nos ensaios com diferentes substratos para o meio RCVB.....	82

Tabela 5.7: Velocidade máxima específica de crescimento da biomassa para diferentes substratos orgânicos em meio de cultivo RCVB	83
Tabela 5.8: Variação das concentrações dos substratos nos ensaios com meio RCVB	83
Tabela 5.9: Valores de SSV iniciais e máximos obtidos nos ensaios com diferentes substratos para o meio FANG	91
Tabela 5.10: Velocidades máximas específicas de crescimento da biomassa para diferentes substratos orgânicos em meio de cultivo FANG	91
Tabela 5.11: Variação das concentrações dos substratos nos ensaios com meio FANG	92
Tabela 5.12: Equações teóricas da conversão dos ácidos orgânicos em hidrogênio e gás carbônico propostas a partir de equação hipotética	99

Lista de abreviaturas

ADP – adenosina difosfato

ATP – adenosina trifosfato

CAT – ciclo dos ácidos tricarboxílicos

CO₂ – dióxido de carbono

CO_x – óxidos de carbono

DNA – ácido desoxirribonucléico

DQO – demanda química de oxigênio

H₂ – gás hidrogênio

H₂S – sulfeto de hidrogênio

LB – Luria-Bertani

N₂ – gás nitrogênio

NAD – nicotinamida adenina dinucleotídeo

NH₃ – amônia

NH₄⁺ - íon amônio

NO_x – óxidos de nitrogênio

PCR – reação da polimerase em cadeia

pH – potencial hidrogeniônico

PHB – poli-β-hidroxibutirato

P_i – Fosfato inorgânico

RNA – ácido ribonucléico

RNA_r – RNA ribossomal

RPM – rotação por minuto

SO_x – óxidos de enxofre

SSV – sólidos suspensos voláteis

Sumário

Resumo	11
Abstract	12
1 Introdução	20
2 Objetivo Geral.....	23
2.1 Objetivos específicos	23
3 Revisão Bibliográfica.....	24
3.1 Hidrogênio como combustível.....	24
3.2 Produção biológica de hidrogênio	25
3.2.1 Enzimas envolvidas na produção biológica de hidrogênio	26
3.2.2 Metabolismo fotoheterotrófico de bactérias púrpuras não-sulfurosas	28
3.3 Substratos para a produção de hidrogênio	31
3.4 Sistemas híbridos	39
4 Material e Métodos.....	42
4.1 Inóculo	46
4.2 Meios de cultivo	46
4.2.1 Meio RCVB	46
4.2.2 Meio FANG	47
4.2.3 Solução traço de metais	48
4.2.4 Solução de biotina.....	49
4.2.5 Solução de vitamina B ₁₂	49
4.2.6 Solução-estoque dos substratos	49
4.3 Curva-padrão de crescimento celular	50
4.4 Determinação da velocidade específica de crescimento	51

4.5	Análise da diversidade microbiana.....	51
4.5.1	Exames microscópicos	51
4.5.2	Análise de biologia molecular	52
4.5.3	Análise das seqüências de DNAr 16S	56
4.6	Análises Cromatográficas.....	57
4.6.1	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	57
4.6.2	Instrumentação	57
4.6.3	Preparo dos padrões.....	58
4.6.4	Elaboração das curvas de calibração	58
4.6.5	Validação do método.....	61
4.6.6	Determinação da concentração dos substratos orgânicos utilizados	61
4.6.7	Determinação do gás hidrogênio	62
5	Resultados e Discussão	62
5.1	Desenvolvimento e validação de método para determinação de ácidos orgânicos por cromatografia líquida de alta eficiência	62
5.1.1	Linearidade.....	63
5.1.2	Precisão instrumental.....	64
5.1.3	Limite de detecção e limite de quantificação	66
5.2	Obtenção do consórcio fototrófico anoxigênico.....	67
5.3	Caracterização filogenética do consórcio fototrófico.....	71
5.4	Avaliação do crescimento celular e consumo do substrato	80
5.5	Produção do gás hidrogênio	98
6	Conclusões	107
7	Referências Bibliográficas.....	109

1 Introdução

O gás hidrogênio (H_2) tem o maior conteúdo energético por unidade de peso (143 KJ/g) entre os combustíveis gasosos conhecidos, sendo o único livre de carbono, gerando como produto final da combustão somente a água. A maior parte do hidrogênio utilizado é produzida por meio de processos físico-químicos ou eletroquímicos, tais como reforma a vapor do gás natural e eletrólise da água, respectivamente. Estes processos são energeticamente dispendiosos e, por isso, não são sustentáveis. Além desse fato, o interesse na produção biológica do hidrogênio ganhou destaque no início da década de noventa, quando se tornou evidente que a poluição atmosférica por combustível fóssil não era somente insalubre pontualmente, mas também poderia causar significativas alterações climáticas em nível mundial (KOTAY & DAS, 2008).

Bactérias fototróficas púrpuras não-sulfurosas são indicadas na literatura como microrganismos promissores para a produção do H_2 por possuírem elevados rendimentos teóricos de conversão, não produzirem oxigênio, que é inibidor do processo, ter capacidade de utilizar amplo espectro luminoso e consumirem vários substratos orgânicos provenientes de águas residuárias, tais como, ácido acético, lático e butírico, aliando assim a produção de combustível e biotecnologia de tratamento.

Os representantes fotoheterotróficos mais conhecidos são *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodopseudomonas sphaeroides*, *Rhodospirillum rubrum*. Tais bactérias podem produzir gás hidrogênio à custa de energia solar e ácidos orgânicos, os quais são os doadores de elétrons e fonte de carbono para o processo fototrófico anoxigênico. Esse processo é realizado com gasto de ATP e ocorre na ausência de nitrogênio molecular (DAS & VEZIROĞLU, 2001; AKKERMAN *et al.*, 2002; MANISH & BANERJEE, 2008).

O processo de produção fototrófico é mediado pela enzima nitrogenase, que tem como substrato preferencial o nitrogênio molecular. Na ausência desse elemento, em condições de

anaerobiose e na presença de luz ocorre a produção do gás H_2 . Para que a produção do gás seja otimizada, há necessidade de se conhecer as preferências nutricionais da cultura fototrófica que realiza o processo, bem como estabelecer a relação entre as fontes de carbono e nitrogênio na composição do meio de cultivo, para que não ocorra a fixação de nitrogênio (N_2) ao invés da produção do gás hidrogênio (EROĞLU *et al.*, 1999; KOKU *et al.*, 2002).

A produção de gás hidrogênio foi constatada por Andrade (2007) após a obtenção de cultura purificada de *Rhodopseudomonas palustris* utilizando inóculo previamente purificado por Saavedra *et al.* (2005), proveniente de lagoa de estabilização anaeróbia utilizada no tratamento de esgoto sanitário. Os experimentos foram realizados em reatores de batelada com acetato e glutamato de sódio, sob anaerobiose na presença de luz. Os resultados obtidos indicaram favoravelmente a produção de gás hidrogênio, todavia, em menores proporções em relação às observadas na literatura.

Uma vez que o uso de culturas puras não é viável para o tratamento de efluentes, o presente trabalho buscou obter consórcio bacteriano a partir de lodo granular de reator UASB, pois o mesmo é rico com relação à diversidade microbiológica e possibilitaria a obtenção de inóculo com grande variedade de espécies, as quais poderiam trabalhar em conjunto no consumo dos ácidos e na produção do gás hidrogênio.

Dentre os ácidos utilizados no presente trabalho: o málico, acético, butírico e láctico são os mais estudados. O ácido málico é o substrato utilizado por todas as bactérias fototróficas e geralmente é empregado na fase de purificação dos consórcios. Os demais são produtos comumente encontrados em efluente de processos anaeróbios, assim é de grande valia avaliar o consumo dos mesmos e a produção de gás H_2 , pois dependendo do desempenho do consórcio o mesmo poderá ser utilizado como pós-tratamento de efluentes, como, por exemplo, aquele proveniente da produção fermentativa de gás hidrogênio, que é

geralmente composto por ácidos acético e butírico, principalmente, contando também com a presença dos ácidos cítrico, láctico e propiônico em menores concentrações.

Diante do exposto, o presente trabalho visou o enriquecimento de consórcio de bactérias fototróficas púrpuras não-sulfurosas a partir de lodo granulado, utilizando como fonte de carbono o ácido málico e como fonte de nitrogênio o glutamato de sódio em reatores anaeróbios de batelada na presença de luz. Posteriormente, avaliou-se o potencial de consumo dos ácidos acético, butírico, cítrico, láctico e málico para a produção de gás hidrogênio por tal consórcio.

2 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi obter consórcio de bactéria fototrófica púrpura não-sulfurosa produtora de gás hidrogênio utilizando ácidos orgânicos de cadeia curta como fonte de carbono.

2.1 Objetivos específicos

- Desenvolver e validar método cromatográfico para determinação e quantificação de ácidos orgânicos de cadeia curta;
- Obtenção de consórcio de bactérias fototróficas púrpuras não-sulfurosas a partir de lodo granulado de reator UASB;
- Caracterizar e identificar o consórcio microbiano de bactérias fototróficas púrpuras não-sulfurosas por meio de técnicas tradicionais de microbiologia e de biologia molecular;
- Avaliar o crescimento da biomassa para as diferentes fontes de carbono sob condições fototróficas anoxigênicas;
- Avaliar o consumo dos ácidos orgânicos e a produção de gás hidrogênio para cada substrato utilizado.

3 Revisão Bibliográfica

3.1 Hidrogênio como combustível

O crescimento econômico nas últimas décadas foi fortemente dependente de combustíveis fósseis como fonte de energia. Esses recursos representam uma reserva limitada na Terra e, além disso, a combustão produz poluentes, dentre eles óxidos de carbono (CO_x), nitrogênio (NO_x) e enxofre (SO_x), hidrocarbonetos (C_xH_x) e outros compostos orgânicos, que são liberados na atmosfera e causam problemas relacionados à mudança climática global. Por essas razões, tem sido dada muita atenção ao desenvolvimento de sistemas energéticos limpos e sustentáveis, com potencial de suprir e, ainda, substituir a produção energética baseada no consumo de combustíveis fósseis (DAS & VEZIROĞLU, 2001; BARBOSA *et al.* 2001).

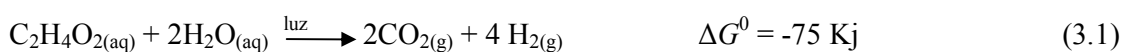
Uma das alternativas de combustível ambientalmente aceitável é o gás hidrogênio (H_2), que é considerado um dos mais promissores combustíveis limpos do futuro, gerando somente água após sua combustão (RUPPRECHT *et al.*, 2006). Pode ser produzido por bactérias fototróficas ao custo de energia solar e pequenas cadeias de ácidos orgânicos como doadores de elétrons e fonte de carbono (BARBOSA *et al.*, 2001). Apesar da economia futura do hidrogênio apresentar muitos aspectos positivos, sua viabilidade é dependente do desenvolvimento de sistemas que o produzam em larga escala com custo-benefício sustentável, a ponto de substituir a reforma a vapor do gás natural, o refinamento do petróleo e gaseificação do carvão (RUPPRECHT *et al.*, 2006).

O hidrogênio é produzido principalmente a partir de combustíveis fósseis (cerca de 90 %), de biomassa e da água. Além disso, sabe-se que a produção biológica de H_2 ocorre à temperatura e pressão ambientes, sendo, dessa maneira, um processo que demanda menos energia (DAS & VEZIROĞLU, 2001).

3.2 Produção biológica de hidrogênio

A produção biológica de gás hidrogênio pode ser realizada por organismos fotoautotróficos e fotoheterotróficos (DAS & VEZIROĞLU, 2001; AKKERMAN *et al.*, 2002). Algas produzem hidrogênio em pequena quantidade por meio da fotólise da água depois de cultivadas por um período na ausência de luz em condições anaeróbias. Quando estes microrganismos, ditos adaptados à anaerobiose são expostos à luz, a velocidade de produção do gás aumenta drasticamente, contudo, cessa uma vez que a fotossíntese normal é restabelecida (BENEMANN, 1997; DAS & VEZIROĞLU, 2001; AKKERMAN *et al.*, 2002).

Algumas bactérias fotoheterotróficas também utilizam a luz como fonte de energia, porém, ao invés de utilizarem o CO₂ como fonte de carbono necessitam de um composto orgânico como, por exemplo, ácido acético (Equação 3.1). Além do ácido acético, outros substratos orgânicos presentes em águas residuárias podem ser utilizados como fonte de carbono no lugar do CO₂, promovendo, por conseguinte, o processo biotecnológico mais limpo. A enzima responsável por essa reação é a nitrogenase (AKKERMAN *et al.*, 2002).



As seguintes bactérias fototróficas púrpuras e verdes são exemplos mais citados na literatura como produtores de hidrogênio: *Rhodobacter sphaeroides*, *R. capsulatus*, *R. sulidophilus*, *Rhodopseudomonas sphaeroides*, *R. palustris*, *R. capsulata*, *Rhodospirillum rubrum*, *Chromatium* sp. Miami PSB 1071, *Chlorobium limicola*, *Chloroflexus aurantiacus* e *Thiocapsa roseopersicina* (FASCETTI *et al.*, 1998; DAS & VEZIROĞLU, 2001; KOKU *et al.*, 2002).

Certas bactérias púrpuras não-sulfurosas podem crescer sob anaerobiose na ausência de luz, empregando o metabolismo fermentativo ou respiração anaeróbia. Outras delas crescem em condições aeróbias na ausência de luz, através da respiração. Apesar da ampla versatilidade metabólica apresentada por elas, toda a produção de hidrogênio ocorre devido ao metabolismo fotoheterotrófico, que acontece em condições anaeróbias sob iluminação (KOKU *et al.*, 2002; MADIGAN *et al.*, 2004).

3.2.1 Enzimas envolvidas na produção biológica de hidrogênio

O processo biológico de produção de hidrogênio é dependente da presença da enzima que catalisa a reação (Equação 3.2). Duas enzimas são cruciais para essa produção: nitrogenase, que é responsável pela formação de gás H₂ nas bactérias, através do metabolismo fotoheterotrófico, e hidrogenase, presente nas algas, que pode tanto produzi-lo quanto consumi-lo, e apresenta duas variantes: Fe-hidrogenase (ferro hidrogenase) e a NiFe-hidrogenase (níquel-ferro hidrogenase) (KOKU *et al.*, 2002; MANISH & BANERJEE, 2008).



A eficiência de operação da nitrogenase requer grandes quantidades de ATP e poder redutor (KOKU *et al.*, 2002) e, devido ao alto custo metabólico da manutenção da atividade dessa enzima, sua síntese e atividade são estritamente reguladas conforme o nível de nitrogênio contido na célula (REDWOOD & MACASKIE, 2006).

O principal inibidor da nitrogenase é o oxigênio, que causa destruição irreversível da enzima. Essa enzima não é regulada em resposta à disponibilidade de seu substrato (N₂), mas sim à presença do íon amônio, utilizado freqüentemente como fonte de nitrogênio no cultivo

das bactérias púrpuras fototróficas não-sulfurosas, que reprime tanto sua síntese como sua ação. Concentrações baixas presentes no meio de cultivo, como, por exemplo, 20 μM de amônio, inibiram rapidamente a atividade desta enzima em culturas de *R. sphaeroides* (KOKU *et al.*, 2002). Entretanto, a inibição é reversível e a enzima retoma sua atividade uma vez que o íon é consumido (REDWOOD & MACASKIE, 2006).

Segundo Koku *et al.*, (2002) o efeito inibidor sobre a nitrogenase ocorre mesmo quando a fonte de nitrogênio não contém amônio. Foi observado que células de *Rhodobacter capsulatus* crescidas em lactato e glutamato tiveram problemas relacionados a inibição da enzima nitrogenase quando lactato foi consumido antes do glutamato, culminando na geração de amônia. Tal fato explica a recomendação de vários autores para o emprego de altas relações C/N (maiores que 1) no cultivo de tais bactérias visando à produção do gás H_2 , condição que evita que a fonte de carbono seja consumida antes da de nitrogênio (HILMER & GEST, 1977).

Quando a nitrogenase é inibida, a atividade do ciclo do ácido tricarboxílico (CAT) fica limitada, ocorrendo metabolismo alternativo como, por exemplo, aquele que leva à formação de polissacarídeos, como o PHB (poli- β -hidroxibutirato), que pode ser utilizado posteriormente no metabolismo endógeno. Efeito similar ocorre quando a relação carbono/nitrogênio é baixa (menor que 1), resultando no acúmulo de amônia (KOKU *et al.*, 2002).

A intensidade luminosa necessária para atingir a atividade máxima da nitrogenase deve ser maior do que aquela na qual o crescimento celular é saturado. Segundo Sasikala *et al.* (1991), *Rhodobacter sphaeroides* O.U. 001 cultivada em tubos (30 mL), alimentada com malato (30 mM) e glutamato de sódio (10 mM), como fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente, apresentou produção de biomassa constante para intensidade luminosa maior que 3000 lux. Porém, a produção de hidrogênio aumentou de 0,8 $\mu\text{L H}_2/30\text{ mL}$ de meio

reacional sob 1000 lux para 30 μL H_2 /30 mL à 5000 lux, após esse valor a produção observada não se alterou para as intensidades testadas de 7500 e 10000 lux.

As hidrogenases, por sua vez, são inibidas por monóxido de carbono e também por oxigênio, contudo, apresentam maior tolerância ao último em relação às nitrogenases. Além disso, como algumas possuem níquel em sua composição, a limitação deste elemento no meio de cultivo causa a redução da biossíntese desta enzima (FISSLER *et al.*, 1994).

As hidrogenases das bactérias fototróficas são descritas como tendo metabolismo antagônico às nitrogenases. Tentativas para conseguir organismos mutantes, que não tenham a capacidade de sintetizar estas enzimas, têm sido numerosas e resultam em maior produção de hidrogênio. Ooshima *et al.* (1998) estudaram mutantes de *R. capsulatus* ST410, e observaram que a produção de hidrogênio foi mais significativa para esses microrganismos do que para os organismos selvagens (B100), cultivados com 60 mM de malato e 7 mM de glutamato, apresentando eficiência de conversão de 68 % em relação aos 25 % dos selvagens. A velocidade máxima de produção de hidrogênio apresentada pelos mutantes para diferentes intensidades luminosas variou, sendo 0,016 mL H_2 /h.mL de meio de cultivo, para a intensidade de 3000 lux, enquanto que para 6600 lux o valor foi de 0,1 mL H_2 /h.mL de meio.

3.2.2 Metabolismo fotoheterotrófico de bactérias púrpuras não-sulfurosas

Organismos anoxigênicos não podem gerar potencial de oxidação necessário para oxidar água e, portanto, utilizam ácidos orgânicos simples, como ácido acético, ou ainda sulfeto de hidrogênio (H_2S), como doadores de elétrons (AKKERMAN *et al.*, 2002). Sob condições anaeróbias, quando a fosforilação oxidativa está bloqueada, muitos organismos desenvolveram mecanismos de sobrevivência, que consistem em extrair energia desses compostos liberando prótons e elétrons, criando gradiente de prótons para manter o nível

ótimo de ATP. A síntese de ATP é dirigida pelo gradiente quimiosmótico de prótons e por intermediários fosforilados produzidos durante a fermentação (Figura 3.1). Devido à exigência de neutralidade elétrica, a liberação de prótons e elétrons, na ausência de oxigênio, promove a recombinação dessas partículas e a produção de gás H₂, ao invés de água, como ocorre no processo aeróbio (RUPPRECHT *et al.*, 2006).

A oxidação do substrato via ciclo do ácido tricarboxílico (CAT) produz elétrons (H₂X → 2H⁺ + e⁻ + X), os quais são transportados via NAD/NADH e ferredoxina (Fd), antes de serem recombinados com H⁺ através da enzima nitrogenase, produzindo hidrogênio molecular (Figura 3.1). Este processo é termodinamicamente desfavorável e requer a hidrólise das moléculas de ATP produzidas (RUPPRECHT *et al.*, 2006).

Os elétrons liberados de compostos orgânicos ou inorgânicos são transportados por uma série de carregadores, tais como, quinonas e citocromos. Durante este transporte, prótons são bombeados através da membrana, desenvolvendo gradiente de prótons no espaço periplasmático, que será utilizado pelas ATPases para a síntese de ATP. A energia extra, em forma de ATP, pode ser usada para transportar mais elétrons para a ferredoxina (Fd). Sob condições limitantes de nitrogênio, tais elétrons são usados pela enzima nitrogenase para reduzir N₂ à amônia (equação 3.3), promovendo vantagem no crescimento sob tais condições. Quando o N₂ não está presente, a enzima utiliza a energia extra, proveniente da Fd, para reduzir prótons a H₂ (DAS & VEZIROĞLU, 2001; AKKERMAN *et al.*, 2002; REDWOOD & MACASKIE, 2006).



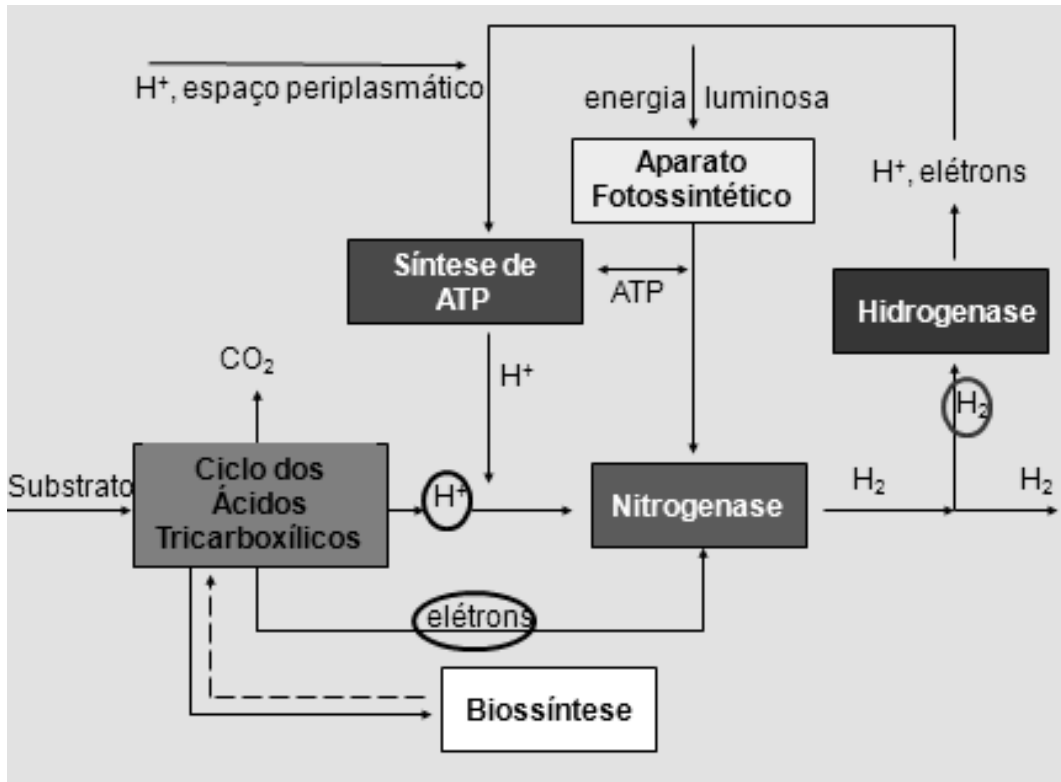


Figura 3.1: Metabolismo fotoheterotrófico (adaptado de KOKU *et al.*, 2002)

A energia requerida para o crescimento celular e para a produção de hidrogênio mediada pela nitrogenase é proveniente do aparato fotossintético, que é responsável pela conversão de energia luminosa em energia química, na forma de ATP.

O aparato fotossintético das bactérias púrpuras é simples, consistindo em um único fotossistema fixado na membrana intracelular dos microrganismos. É composto por complexos protéicos transmembranosos e ATPases. Os componentes responsáveis pela absorção de luz são pigmentos, que capturam energia luminosa e a transferem aos centros de reação, nos quais é iniciado o fluxo de elétrons, que envolve a passagem deles por vários carregadores (MADIGAN *et al.*, 2004).

A síntese do aparato fotossintético é regulada pelo oxigênio, pois a biossíntese dos pigmentos (bacterioclorofilas) é reversivelmente interrompida na presença desse gás, recomeçando na ausência do mesmo (KOKU *et al.*, 2002 e MADIGAN *et al.*, 2004). A luz é

outro fator que pode controlar essa síntese, entretanto, seu efeito não é tão forte como o do oxigênio. Sob condições anaeróbias, o número de vesículas fotossintéticas varia inversamente com a incidência luminosa. A síntese não é totalmente interrompida na ausência de luz, contudo, o cultivo contínuo nessa condição pode cessar a síntese das bacterioclorofilas (MADIGAN *et al.*, 2004).

3.3 Substratos para a produção de hidrogênio

Os principais critérios para a seleção das águas residuárias que podem ser utilizadas para a produção de hidrogênio são os seguintes: disponibilidade, custo, conteúdo de carboidratos e biodegradabilidade (KAPDAN & KARGI, 2006).

O acúmulo dos produtos finais do processo fermentativo, como os ácidos orgânicos, pode causar decréscimo na produção do gás. Assim, a remoção dessas substâncias pelas bactérias fototróficas púrpuras não-sulfurosas pode reduzir o problema relacionado à disposição de efluente fermentado e produzir mais hidrogênio (KOKU *et al.*, 2002; LI e FANG, 2008).

Segundo Koku *et al.* (2002), substratos preferidos pelos microrganismos que realizam a produção fototrófica de hidrogênio são ânions de ácidos orgânicos, tais como acético, butírico, láctico e málico, enquanto açúcares, como glicose e sacarose, não parecem eficientes. Entretanto, Macler *et al.* (1979) estudou a produção de hidrogênio por mutantes (Glc^+) e selvagens de *R. sphaeroides* (Glc^+) em experimentos com glicose (10 mM) e extrato de levedura (0,2 %), respectivamente como fontes de carbono e nitrogênio, em pH 7,2. Os autores verificaram produção de 12 mmols de H_2 para (Glc^+), enquanto os selvagens apresentaram baixa produção do gás, 1,4 mmols de H_2 , após fase *lag* considerável de quase 50 horas.

Mesmo que os microrganismos que realizam o processo de produção de H₂ preferam os substratos citados anteriormente, o uso de efluentes industriais para a produção fotossintética do gás é possível, mesmo que existam obstáculos ao uso de águas residuárias para essa finalidade. Dentre esses obstáculos podem ser citados como exemplos, a coloração da água residuária, que impede a passagem da luz, a alta concentração de amônia e matéria orgânica, e a presença de compostos tóxicos, tais como, metais pesados (KAPDAN & KARGI, 2006).

Embora grande variedade de substratos, presentes em águas residuárias, possa ser utilizada para o crescimento celular desses organismos, somente parcela é adequada para a produção do gás H₂. A via utilizada é extensa e deve diferir entre as espécies ou entre cepas da mesma espécie (KOKU *et al.*, 2002). A eficiência da conversão dos substratos em gás hidrogênio depende de fatores como a atividade do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (CAT), relação carbono/nitrogênio presente no meio de cultivo, potencial de redução dos substratos e possibilidade de conversão dos substratos em metabólitos alternativos, como poli-β-hidroxibutirato (PHB) (KOKU *et al.*, 2002; MADIGAN *et al.*, 2004).

Sasikala *et al.* (1995) estudaram o crescimento e a produção de hidrogênio por *Rhodobacter sphaeroides* O.U. 001, utilizando malato (30 mM) e glutamato de sódio como fonte de carbono e nitrogênio, respectivamente, em tubos de ensaio de 15 mL a 30±2°C e 2400 lux. O crescimento foi observado para todas as concentrações de glutamato testadas (0, 2, 5, 8, 11, 14, 17, 20 e 23 mM), e o aumento na concentração resultou em aumento na produção de biomassa. O mesmo não ocorreu com a produção do gás, que foi maior quando a concentração de glutamato foi 2 mM, alcançando um valor de aproximadamente 2,6 mL H₂/15 mL, e começou a decrescer para concentrações acima de 11 mM,

Conforme Eroğlu *et al.* (1999), *R. sphaeroides* O.U.001 cultivada em reator de coluna (0,4 L), sob iluminação de 200 W/m², em temperatura variando entre 31 a 36 °C e pH 7,3 a

7,8, apresentou velocidade média de produção de gás de 0,01 L H₂/h.L quando foi utilizada a relação carbono (malato de sódio) e nitrogênio (glutamato de sódio) de 15/2 (mM).

A produção de hidrogênio foi observada por Yetis *et al.* (2000) cultivando *Rhodobacter sphaeroides* O.U. 001, em reator em batelada (0,15 L e 0,4 L), a 32 °C, iluminado com 200 W/m², alimentado com água residuária de refinaria de açúcar pré-tratada. A água residuária com diluição de 20 % proporcionou a melhor velocidade de produção de 3,8 mL H₂/h.L de cultura (reator com 0,15 L) e 1,1 mL H₂/h.L de cultura (0,4 L). Após a escolha da melhor diluição (20 %), testou-se a produção de gás hidrogênio, que ocorreu utilizando-se ácido málico e sacarose como únicas fontes de carbono e adicionais, quando somadas à água residuária diluída. A velocidade de produção foi maior nos testes em que o reator foi alimentado somente com ácido málico (0,01 L H₂/h.L de cultura) e com água residuária adicionada de ácido málico (0,005 L H₂/h.L de cultura), do que nos ensaios com sacarose (valores não apresentados).

Barbosa *et al.* (2001) testaram quatro diferentes fontes de carbono no cultivo de bactérias fototróficas, *Rhodopseudomonas* sp., *R. palustris* e outra cultura não-identificada. O lactato (50 mM) e malato (15 mM) foram escolhidos por serem bastante empregados como fontes de carbono na produção de hidrogênio, enquanto acetato (6, 11 e 22 mM) e butirato (27 mM) foram escolhidos por serem os subprodutos dominantes do processo de fermentação anaeróbia (SERGES *et al.*, 1981 apud BARBOSA *et al.*, 2001). As maiores velocidades de produção de H₂ foram 25,2 mL H₂/h.L para *Rhodopseudomonas* sp. com acetato (22 mM) e glutamato de sódio (0,8 mM); 9,1 mL H₂/h.L para *R. palustris* e 7,9 mL H₂/h.L para a cultura desconhecida, ambas tendo como fonte de carbono e nitrogênio, respectivamente, lactato (50 mM) e glutamato de sódio (10 mM) . A variação nas velocidades de produção do gás apresentadas pelas espécies cultivadas e alimentadas com diferentes substratos pode ser explicada pelas variações que ocorrem no CAT (KOKU *et al.*, 2002).

Carlozzi & Sacchi (2001) realizaram estudos em reator tubular, cultivando *Rhodospseudomonas palustris* 42OL, em meio van Niel (1944) modificado, contendo 2,74 g/L de acetato de sódio, 0,65 g/L de cloreto de amônia e 0,2 g/L de extrato de levedura, com pH ($7,0 \pm 0,05$) e temperatura ($30 \pm 1^\circ\text{C}$) controlados, em regime semicontínuo, no qual a biomassa permanecia 46 segundos sob iluminação e 22 segundos no escuro. A variação na concentração inicial da biomassa (0,6; 1,0; 1,25; 1,5 e 2,0 g/L) apresentou diferentes produtividades diárias no reator. A maior produtividade volumétrica foi de 1,42 g/L.d e a maior produtividade do reator foi 75 g/reator.dia, obtidas quando a concentração de biomassa inicial utilizada foi de 1,0 g/L. Maiores concentrações iniciais de biomassa podem não ter resultado em maior produtividade, pois a cultura não estava em sua densidade ótima, fato que poderia ser solucionado diminuindo-se o diâmetro dos tubos que constituíam o reator.

Segundo Eroğlu *et al.* (2004), o resíduo de fábrica de processamento de azeitona, após pré-tratamento com fermentação utilizando lodos ativados, foi utilizado como substrato para produção fototrófica de hidrogênio por células suspensas de *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001.

O pré-tratamento foi suficiente para alterar o efeito inibidor representado pela elevada carga orgânica e coloração escura deste resíduo, o qual é um sério poluente, pois além da alta carga orgânica, (DQO-200 mg/L e DBO-100 mg/L), são encontrados compostos recalcitrantes como os polifenóis (EROĞLU *et al.*, 2004).

A maior velocidade de produção do gás hidrogênio via metabolismo fotofermentativo utilizando 50 % (v/v) do resíduo pré-tratado foi 0,0081 L/h. Os ensaios foram realizados em frascos de 55 mL totalmente preenchidos por meio de cultivo (40 %), resíduo utilizado como substrato (50 %) e inóculo (10 %), com pH ajustado a 6,7, sob iluminação de lâmpadas de tungstênio de 150 W (EROĞLU *et al.*, 2004).

A constituição do meio de cultivo é algo que deve ser considerado para proporcionar melhores condições ao crescimento dos microrganismos. Como discutido anteriormente, a relação carbono/nitrogênio é especialmente importante para o cultivo de bactérias fototróficas não-sulfurosas na produção de gás hidrogênio, uma vez que a fonte de nitrogênio e sua concentração no meio influenciarão a produção do gás. Assim, o meio de cultura deve estar sob condições limitantes de nitrogênio, ou seja, alta relação carbono/nitrogênio, forçando a bactéria usar o excesso de energia e poder redutor para produção de hidrogênio (KOKU *et al.* 2002).

O estudo do efeito de diferentes fontes de nitrogênio usadas pelos microrganismos para a produção de hidrogênio e biomassa tem sido realizado. Conforme Oh *et al.* (2004), o extrato de levedura (3 g/L) e glutamato (5 mM) mostraram superioridade em relação ao cloreto de amônio (5 mM), quando usados como fontes de nitrogênio, para a produção de hidrogênio por *Rhodopseudomonas. palustris* P4. Contudo, apesar do cloreto de amônio (NH₄Cl) mostrar-se inibidor para a produção do gás, o crescimento celular não foi inibido.

O glutamato de sódio é amplamente descrito na literatura como suplemento utilizado pelas bactérias fototróficas púrpuras não-sulfurosas para a produção do gás hidrogênio. Este composto possui cinco átomos de carbono e um de nitrogênio na sua estrutura química. Testes foram realizados visando verificar se a produção do gás hidrogênio ocorreria utilizando-se somente este substrato como fonte orgânica, uma vez que outros trabalhos indicaram que o carbono presente nesta molécula não tinha sido utilizado pelos microrganismos para a produção do gás (KOKU *et al.*, 2002). Segundo Koku *et al.* (2002), muitas espécies não produzem o gás hidrogênio quando o glutamato é utilizado como única fonte de carbono e nitrogênio, contudo, entre as fontes de nitrogênio utilizadas na maioria dos trabalhos o glutamato é a mais citada (KOKU *et al.*, 2002).

O inóculo utilizado no experimento de Oh *et al.* (2004), consistiu de células crescidas na presença de luz. Sob diferentes concentrações celulares (0,35 e 0,70 g/L) na presença de luz e (0,70 g/L) e no escuro, as velocidades específicas de produção de hidrogênio foram as seguintes: 7,2 mL H₂/g celular.h, 9,8 mL H₂/g celular.h e 7,0 mL H₂/g celular.h, respectivamente. Tais resultados demonstram que a concentração da biomassa e a iluminação são fatores significantes para a produção de gás hidrogênio via metabolismo fotoheterotrófico, entretanto os valores apresentados na literatura são muito distintos.

Carlozzi & Pushparaj (2006), testaram dois meios de cultura, com a finalidade de favorecer o crescimento da biomassa, a produção de gás H₂ e consumo de substrato. Os autores usaram meio denominado vN-A, descrito por Carlozzi & Sacchi, (2001), o qual apresentava relação C/N de 4,72 e meio vN-B, com relação C/N igual a 5, modificado de van Niel (1944). Após testes para a escolha do melhor meio de cultivo, não foi observada diferença significativa nas velocidades específica de crescimento de *Rhodospseudomonas palustris*, ou seja, de 0,0416/h (vN-A) e 0,0434/h (vN-B), respectivamente. Contudo, os autores adotaram meio vN-B, que continha acetato de sódio trihidratado (48,65 mM), cloreto de amônio (16,65 mM) e extrato de levedura (0,5 g/L), evitando que o meio de cultivo fosse a condição limitante no crescimento dos microrganismos.

Muitos trabalhos avaliam a melhor relação C/N para a produção do gás hidrogênio, entretanto, não há um consenso com relação a esse valor, a maioria dos autores sugere que C/N seja maior que 1, com a finalidade de evitar que a fonte de carbono seja consumida antes da fonte de nitrogênio. Segundo Eroğlu *et al.* (1999) a relação deve ser 15/2 mM (malato/glutamato) e para Sasikala *et al.* (1995) o valor de C/N deve ser 30/2-4 para o cultivo de *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001.

Andrade (2007) avaliou a produção de hidrogênio por bactéria fototrófica púrpura não-sulfurosa em reator em batelada, previamente purificada por Saavedra *et al.* (2005), e

identificada por meio da técnica de sequenciamento com *primers* específicos, com 92 % de similaridade com *Rhodospseudomonas palustris*. O meio para produção de gás hidrogênio foi o indicado por Fang *et al.* (2005). Nos ensaios, a concentração inicial do substrato ácido acético (10 mmol/L e 17 mmol/L), a concentração inicial de biomassa (0,02 g/L e 0,04 g/L) e a intensidade luminosa (4000-5000 lux e 9000-10000 lux), foram variadas para avaliar a influência das mesmas na produção do gás H₂.

Segundo o autor, não houve diferença na duração da fase lag das culturas alimentadas com 10 mmol/L e 17 mmol/L de ácido acético. Após 250 h de experimento, observou-se que a variação do crescimento celular não foi significativa, para os reatores que receberam maior concentração de substrato o valor foi de 0,18 g/L e 0,15 g/L massa seca para aqueles alimentados com 10 mmol/L de ácido acético (ANDRADE, 2007).

Testando diferentes concentrações de biomassa, Andrade (2007) verificou que para a concentração inicial de biomassa de 0,02 g/L o consumo de substrato foi de 51% em 384 h. Para o valor inicial de 0,04 g/L este consumo atingiu 70% em 408 h de experimento. Em relação à produção de gás hidrogênio, observou-se que a fase *lag* diminuiu de 100 h para 50 h quando a concentração de biomassa inicial foi 0,04 g/L. As produções máximas alcançadas nos ensaios com 0,02 g/L e 0,04 g/L de biomassa inicial foram de 8,8 mL H₂/g massa seca.h e 10,6 mL H₂/g massa seca.h, respectivamente. Com relação à intensidade luminosa as velocidades específicas de crescimento foram 0,0082/h e 0,0088/h e os tempos de geração foram 84,5 h e 78,8 h, para os reatores mantidos sob iluminação de 9000-10000 lux e 4000-5000 lux, respectivamente. Assim, o autor não observou significativas diferenças, exceto para a duração da fase lag de produção de gás H₂, que foi menor para a concentração de 0,04 g/L (50 h) e o consumo do ácido acético (70 %).

Tao *et al.* (2008) isolaram de águas residuárias, quatro cepas de bactéria fototrófica púrpura não-sulfurosa (ZX-2, ZX-3, ZX-4 e ZX-5), capazes de produzir gás hidrogênio. Tais

cepas foram identificadas como *Rhodobacter sphaeroides*. Os ensaios foram realizados com as seguintes fontes de carbono: succinato (50 mM), malato (30 mM), acetato (35 mM) e butirato (50 mM). Todas as cepas foram capazes de crescer e produzir gás H₂ usando as duas primeiras fontes de carbono. ZX-2 e ZX-4 não utilizaram acetato para crescer e produzir de gás, assim como ZX-4 também não usou o butirato. ZX-5 foi a cepa escolhida para os ensaios posteriores, por apresentar a melhor eficiência de conversão luminosa nos experimentos com as diferentes fontes de carbono, indicando ter potencial para ser aplicada na produção de gás H₂. Além disso, ZX-5 demonstrou capacidade de ajustar o pH em torno de 7 durante a processo fotossintético, quando os valores iniciais estavam entre 5,5-9,5. A intensidade luminosa foi variada (1500-5000 lux), e ZX-5 apresentou as maiores velocidades de produção (87,04 e 88,94 mL H₂/L.h) quando submetida a 4000-5000 lux, respectivamente.

Testes foram realizados utilizando diferentes fontes de nitrogênio: glutamato (3,5, 5, 7, 10 e 15 mM), sulfato de amônia (2, 3,5, 5 e 7 mM) e etanolamina (2, 3,5, 5 e 10 mM). O glutamato (7 mM) foi a fonte de nitrogênio que proporcionou a melhor produção: 123±2 mL H₂/35 mL (TAO *et al.*, 2008)

ZX-5 foi utilizada também nos experimentos nos quais 22 fontes de carbono foram testadas: malato (30 mM), acetato (35 mM), succinato (50 mM), lactato (50 mM), butirato (50 mM), ácido pirúvico (50 mM), propionato (70 mM), ácido valérico (70 mM), caproato (70 mM), ácido isovalérico (30 mM), ácido isobutírico (30 mM), glicose (15 mM), xilose (20 mM), frutose (25 mM), arabinose (30 mM), celobiose (7 mM), maltose (7 mM), sacarose (7 mM), etanol (20 mM), manitol (20 mM), ácido benzóico (30 mM) e ácido vanílico (10 mM). Nestas condições, ZX-5 foi capaz de crescer em todas as fontes de carbono, embora não tenha sido observada nenhuma produção de gás H₂, quando caproato, ácido isovalérico, arabinose, celobiose, etanol, ácido benzóico e ácido vanílico foram adicionados ao meio de cultivo (TAO *et al.*, 2008).

Apesar dos diversos trabalhos relatarem a possibilidade do uso de diferentes substratos para a produção do gás hidrogênio via metabolismo fotoheterotrófico, não está definido qual substrato pode ser utilizado por cada espécie e nem qual, dentre todos, é o que proporciona a maior geração do gás na prática. Além disso, outra dificuldade encontrada é para a escolha da intensidade luminosa, pois várias unidades são utilizadas, na maioria das vezes encontra-se W/m^2 e lux, mas é difícil estabelecer a relação entre as duas.

3.4 Sistemas híbridos

A combinação de bactérias fototróficas e fermentativas pode ser usada para a produção de gás hidrogênio a partir de carboidratos. A fermentação anaeróbia de resíduos orgânicos produz compostos intermediários, como ácidos orgânicos de baixo peso molecular, os quais serão convertidos a gás hidrogênio pelas bactérias fotoheterotróficas, como *Rhodobacter* spp., na presença de luz, sob condições de anaerobiose e alta relação C/N (KAPDAN & KARGI, 2006; REDWOOD & MACASKIE, 2006).

Açúcares simples, como glicose, sacarose e lactose são prontamente biodegradáveis e preferenciais para a produção de hidrogênio nesses sistemas híbridos. Entretanto, essas fontes de carboidrato são matérias-primas caras. Assim, o uso de água residuária para a produção do gás pode ser vantajoso. Resíduos sólidos ricos em carboidratos, como amido e celulose, e efluentes industriais biodegradáveis e não tóxicos, como os provenientes de indústrias de laticínios, fábrica de azeitonas, águas residuárias de cervejarias e lodo residual gerado no tratamento de águas residuárias podem ser usados como substratos pelas bactérias para a produção de gás hidrogênio nesse tipo de sistema (KAPDAN & KARGI, 2006; REDWOOD & MACASKIE, 2006).

Segundo Thangaraj & Kulandaivelu (1994), a bactéria fotossintética *Rhodopseudomonas capsulata* (DSM 1710) e a cianobactéria, *Anacystis nidulans* (IU 625) cresceram em efluente de usina de laticínios e açucareira após diluição (50-60%). Ambas as culturas apresentaram crescimento celular de 70-90% e produção de H₂ de 50-60% maior quando comparado ao crescimento em meio de cultura normal. Os ensaios de crescimento celular e produção de hidrogênio tiveram a duração de 30 dias e foram realizados em frascos (12 mL) contendo 5 mL de suspensão celular e *headspace* preenchido com argônio. Os frascos foram mantidos no escuro por três horas e depois transferidos para luz. As condições de cultivo foram as seguintes: iluminação por lâmpada fria fluorescente branca, com radiação na superfície da cultura de 10 W/m², temperatura constante de 30°C e pH 6,8.

Com a finalidade de reduzir os custos de produção de H₂, várias matérias-primas da agroindústria como soro, amido de batata e resíduo de refinaria de açúcar têm sido utilizadas para o crescimento e produção de hidrogênio por *Rhodopseudomonas* sp. (SINGH et al., 1994). Os autores realizaram ensaios com quatro cepas de *Rhodopseudomonas* sp., isoladas de zonas radiculares de Azola, Salvinia, Eichhornia e outras plantas presentes em arrozal, cultivadas em frascos sob atmosfera de argônio/gás carbônico (95/5 %), em meio basal descrito por Pfenning (1967), sob iluminação de 2000 lux, a 33°C, obtendo velocidade específica de produção de gás 12, 10, 9 e 12 µL H₂/h. mg peso seco, respectivamente.

Tao *et al.* (2007) cultivaram previamente *Rhodobacter sphaeroides* SH2C, em meio RCVB, sob condições de anaerobiose, em estufa com agitação (200 rpm), a 30 ± 1°C. Os testes de produção de gás hidrogênio foram realizados utilizando-se como substrato efluente de fermentação de sacarose (12 g/L), centrifugado a 8000 rpm, diluído para ajustar as concentrações de butirato (50 mM) e acetato (35 mM). As células foram cultivadas em frascos (38 mL), sendo 32 mL do efluente citado e 3,6 mL de meio RCVB modificado. Após esterilização por autoclave, 1 mL da cultura previamente cultivada foi adicionada aos tubos,

os quais foram cultivados sob iluminação (4000 lux) a 30°C. O rendimento máximo obtido aumentou de 3,67 mol H₂/mol sacarose na fermentação para 6,38 mol H₂/mol sacarose quando o efluente foi utilizado como substrato na fotofermentação, indicando que o processo combinado deve aumentar a capacidade de produção de hidrogênio a partir da biomassa e prevenir os problemas ambientais associados ao não tratamento dos efluentes provenientes do processo fermentativo.

Devido à necessidade do tratamento das diversas águas residuárias e a busca por combustíveis alternativos, o presente estudo visou avaliar potencial demonstrado pelas bactérias fototróficas púrpuras não-sulfurosas, relatado na literatura, para produção do gás hidrogênio e o consumo de ácidos orgânicos comumente encontrados nas águas residuárias. Para isso objetivamos purificar consórcio bactéria presente em amostra de lodo granulado e não utilizar cultura pura, o que é comumente utilizado, isso, porque, parece ser inviável o tratamento de uma água residuária por uma única espécie. Numa segunda etapa, avaliamos o desempenho dessa cultura mista para o consumo de ácidos orgânicos, como o ácido acético, butírico, cítrico, láctico e málico, e para a produção do gás.

4 Material e Métodos

O fluxograma experimental que resume as atividades realizadas no presente trabalho está apresentado na Figura 4.1.

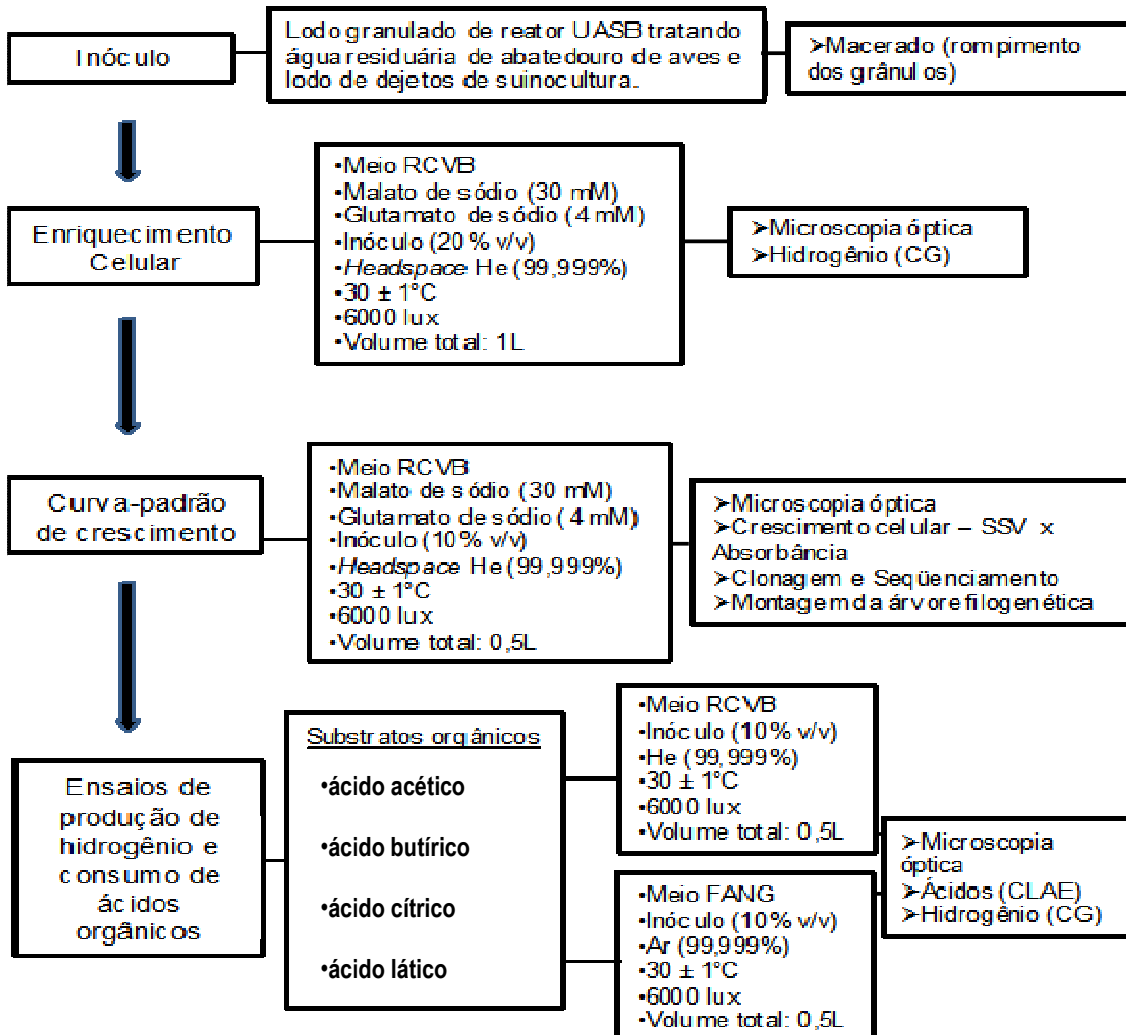


Figura 4.1: Fluxograma experimental

Com objetivo de obter o consórcio fototrófico utilizou-se inóculos de diferentes origens: (1) lodo de reator UASB utilizado no tratamento de dejetos de suinocultura cedido pela Universidade do Estado de São Paulo-UNESP, campus Jaboticabal e (2) lodo de reator UASB utilizado no tratamento de água residuária de avicultura cedido pela Avícola Dacar (Tiête – SP). Ambos foram previamente macerados com a finalidade de romper os grânulos.

O meio de cultivo utilizado no enriquecimento do consórcio microbiano foi o meio de cultivo RCVB, o qual foi descrito por Weaver *et al.* (1975). O mesmo meio de cultivo foi utilizado com sucesso por Tao *et al.* (2008) no isolamento de cepas de bactérias fototróficas púrpuras não-sulfurosas semelhantes à *Rhodobacter sphaeroides*, produtoras do gás H₂ alimentadas com diversas fontes de carbono, inclusive ácido málico.

Os primeiros ensaios tiveram como objetivo o enriquecimento celular. Foram realizados testes em frascos Duran (1 L), com 500 mL de meio reacional, sendo 400 mL de meio RCVB e 100 mL de inóculo, e 500 mL de *headspace* preenchido com gás He (99,999 %). As fontes de carbono e de nitrogênio utilizadas foram malato (30 mM) e glutamato de sódio (4 mM), respectivamente (Tabela 4.1). Os frascos foram mantidos em câmara de germinação a 30±1°C, sob iluminação de três lâmpadas fluorescentes de 20 W cada uma (~ 6000 lux).

Após o aparecimento da cultura púrpura, a biomassa foi transferida, com auxílio de alça de platina, sob condições de assepsia e anaeróbias, para frascos Duran (1 L), com 500 mL de meio reacional e *headspace* preenchido com gás He (99,999 %). As fontes de carbono e nitrogênio foram as mesmas do ensaio anterior (Tabela 4.1). Os frascos foram armazenados nas mesmas condições de temperatura e iluminação descritas acima.

Posteriormente, ao enriquecimento do consórcio microbiano, foi realizado ensaio para a determinação da curva-padrão de crescimento da biomassa, que relacionou o valor dos sólidos suspensos voláteis (SSV – g/L) com a absorbância (660 nm). Este ensaio foi realizado

em duplicata, em frascos Duran (5 L), sendo 3,6 L de meio RCVB e 0,4 L de inóculo. As fontes de carbono e de nitrogênio foram as mesmas do ensaio anterior (Tabela 4.1). Os frascos foram mantidos em câmara de germinação a $30\pm 1^\circ\text{C}$, sob iluminação de três lâmpadas fluorescentes de 20 W cada uma (~ 6000 lux). O substrato empregado neste ensaio foi ácido málico (30 mM), porque é o substrato universalmente utilizado pelas bactérias fototróficas púrpuras não-sulfurosas, enquanto outros podem ser utilizados apenas por algumas espécies.

Nos ensaios citados foi utilizada concentração da fonte de carbono e nitrogênio recomendada por Sasikala *et al.* (1995) e igual a 30 mM e 4 mM, respectivamente. Entretanto, como a produção do gás hidrogênio parecia não estar sendo favorecida, empregou-se nos ensaios posteriores concentrações de 15 e 2 mM, recomendada por Eroğlu *et al.* (1999). A relação C/N foi a mesma em todos os ensaios, contudo, optou-se por diminuir a concentração inicial, pois acreditava-se que isto poderia estar inibindo a produção do gás pelas bactérias fototróficas por bloquear alguma reação do metabolismo fotoheterotrófico.

Os primeiros ensaios com objetivo de verificar a ocorrência da produção de hidrogênio foram realizados em reatores anaeróbios de batelada, em triplicata. Os frascos de Duran (500 mL), continham 150 mL de *headspace* preenchido com He (99,999 %) e 350 mL de volume reacional constituído de meio RCVB modificado, alimentados com diferentes fontes de carbono separadamente, tais como, ácidos acético, butírico, cítrico, láctico e málico, mantidos em estufa a $30\pm 1^\circ\text{C}$, sob iluminação de três lâmpadas fluorescentes (Tabela 4.1). A fonte de nitrogênio foi glutamato de sódio.

Posteriormente, ensaios utilizando meio de cultivo descrito por Fang *et al.* (2005) denominado no presente trabalho como FANG, foram realizados em duplicata de reatores de batelada. Estes ensaios com este meio de cultivo foram realizados com o objetivo de verificar se a composição do meio FANG favoreceria a produção do gás hidrogênio.

Os ensaios com meio FANG foram realizados em frascos Duran (500 mL) com 150 mL de *headspace* preenchido com argônio (99,999 %) e 350 mL de volume reacional. Os substratos utilizados foram os seguintes: os ácidos acético, butírico, cítrico, láctico e málico, mantidos em estufa a $30\pm 1^\circ\text{C}$, sob iluminação de três lâmpadas fluorescentes. A fonte de nitrogênio foi glutamato de sódio (2 mM) (Tabela 4.1).

A substituição do hélio pelo argônio foi necessária, pois havia dificuldade na quantificação do gás hidrogênio, uma vez que, para o método cromatográfico utilizado, os tempos de retenção, do hélio e hidrogênio, eram muito próximos, e os picos se sobreponham. Portanto, a escolha do argônio foi relacionada ao fato do mesmo não inviabilizar a quantificação do gás de interesse.

Tabela 4.1: Resumo dos ensaios realizados em diferentes etapas deste estudo

Ensaio	Fonte de carbono	Fonte de nitrogênio	Relação C/N	Inóculo (%)	Volume Reacional (L)	Volume de <i>Headspace</i> (L)
Enriquecimento Celular (fase 1)	Málico (30 mM)	Glutamato (4 mM)	30/4	20 lodo	0,5	0,5
Enriquecimento Celular (fase 2)	Málico (30 mM)	Glutamato (4 mM)	30/4	~3 alças	0,5	0,5
Curva-Padrão de crescimento	Málico (30 mM)	Glutamato (4 mM)	15/2	10	4	1
Ensaios de produção de hidrogênio (Meio RCVB)	Acético	Glutamato (2 mM)	30/2	10	0,35	0,15
	Butírico		15/2	10	0,35	0,15
	Cítrico		20/2	10	0,35	0,15
	Láctico		20/2	10	0,35	0,15
	Málico		30/2	10	0,35	0,15
Ensaios de produção de hidrogênio (Meio FANG)	Acético	Glutamato (2 mM)	30/2	10	0,35	0,15
	Butírico		15/2	10	0,35	0,15
	Cítrico		10/2	10	0,35	0,15
	Láctico		20/2	10	0,35	0,15
	Málico		15/2	10	0,35	0,15

* as relação C/N é dada em concentração (mM). Deve-se considerar que os diferentes substratos possuem quantidades diferentes de átomos de carbono em sua molécula

4.1 Inóculo

Como mencionado anteriormente, neste trabalho foram usados como inóculo lodo granulado de diferentes origens. Um proveniente de reator UASB usado no tratamento de água residuária de abatedouro de aves (Dacar Industrial S.A., Tietê – SP) e outro usado no tratamento de dejetos de suinocultura (UNESP, Jaboticabal/SP). O lodo foi fragmentado para rompimento dos grânulos e, então, utilizado como inóculo visando purificação de cultura bacteriana produtora de gás hidrogênio utilizando condições nutricionais específicas para obtenção de *Rhodobacter sphaeroides*, que é indicada na literatura como bactéria fototrófica púrpura não sulfurosa, potencialmente produtora de hidrogênio (EROĞLU *et al.*, 1999; TAO *et al.*, 2008).

4.2 Meios de cultivo

4.2.1 Meio RCVB

Para os ensaios de enriquecimento, purificação celular e produção de hidrogênio foi empregado o meio de cultivo RCVB modificado (WEAVER *et al.*, 1975), preparado pela dissolução dos itens relacionados na Tabela 4.2 em água deionizada. Posteriormente, ajustou-se o pH em 6,8 com hidróxido de sódio (NaOH) e esterilizou-se a solução por filtração em sistema Millipore em membrana com porosidade de 0,22 µm, previamente esterilizado em autoclave a 121°C e 1 atm durante 20 minutos.

4.2.2 Meio FANG

Para os ensaios de produção do gás hidrogênio foi empregado o meio de cultivo descrito por Fang *et al.* (2005), preparado pela dissolução dos itens relacionados na Tabela 4.3 em água deionizada. Posteriormente, o pH foi ajustado a 7,0-7,2 com hidróxido de sódio. O meio de cultivo foi esterilizado por filtração em sistema Millipore em membrana com porosidade de 0,22 μm , previamente esterilizado em autoclave.

Tabela 4.2: Composição do meio RCVB modificado

Componentes	Quantidade – q.s.p. 1000 mL de água deionizada
Ácido málico-DL	2 g
Glutamato de sódio	37 mg
KH_2PO_4	0,6 g
K_2HPO_4	0,9 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	120 mg
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	75 mg
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot \text{H}_2\text{O}$	20 mg
Biotina	1 mL
Solução traço de metais (Tabela 4.4)	1 mL

Fonte: Weaver *et al.* (1975)

Tabela 4.3: Composição do meio de cultivo FANG

Componentes	Quantidade – q.s.p. 1000 mL de água deionizada
KH_2PO_4	0,5 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,4 g
NaCl	0,4 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	50 mg
Citrato de ferro III	3,9 mg
Solução traço de metais	20 mL
Solução vitamina B_{12}	20 mL

Fonte: Fang *et al.* (2005)

4.2.3 Solução traço de metais

Duas soluções traço de metais foram usadas na preparação dos meios de cultivo (Tabela 4.4 e Tabela 4.5) em água deionizada. Posteriormente, as soluções foram submetidas a atmosfera de hélio (99,999 %) por 20 minutos, e então, procedeu-se a distribuição em frascos de antibióticos (30 mL), também sob condições de anaerobiose. Os frascos foram fechados com tampas de butila, lacrados e esterilizados em autoclave a 121 °C e 1 atm, por 20 minutos. Os frascos foram armazenados sob refrigeração.

Tabela 4.4: Composição da solução traço de metais do meio RCVB

Componentes	Quantidade – q.s.p. 250 mL de água deionizada
H ₃ BO ₃	0,7 g
MnSO ₄ .H ₂ O	398 mg
NaMoO ₄ .2H ₂ O	188 mg
ZnSO ₄ .7H ₂ O	60 mg
Cu(NO ₃) ₂ .3H ₂ O	10 mg

Fonte: Weaver *et al.* (1975)

Tabela 4.5: Composição da solução traço de metais do meio FANG

Componentes	Quantidade – q.s.p. 250 mL de água deionizada
H ₃ BO ₃	30 mg
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	3 mg
ZnSO ₄ .7H ₂ O	10 mg
CoCl ₂ .2H ₂ O	20 mg
CuCl ₂ .2H ₂ O	1 mg
MnCl ₂ .4H ₂ O	3 mg
NiCl ₂ .6H ₂ O	10 mg

Fonte: Fang *et al.* (2005)

4.2.4 Solução de biotina

A solução-estoque de biotina foi preparada por meio da dissolução de 3 mg desta vitamina em 200 mL de água deionizada. A solução foi esterilizada por filtração em sistema Millipore em 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 hélio (99,999 %). Os frascos foram fechados com tampas de butila, lacrados e armazenados sob refrigeração.

4.2.5 Solução de vitamina B₁₂

A solução-estoque de vitamina B₁₂ foi preparada pela dissolução de 8 mg desse reagente em 200 mL de água deionizada. Após a completa dissolução, introduziu-se, por 20 minutos, atmosfera de hélio (99,999%). A solução foi esterilizada em sistema Millipore em 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 e condições de assepsia. Os frascos foram fechados com tampas de butila, lacrados e armazenados sob refrigeração.

4.2.6 Solução-estoque dos substratos

As soluções-estoque dos substratos foram preparadas pela dissolução dos sais em água deionizada. Os reagentes foram dissolvidos individualmente; quando houve necessidade de neutralizar a solução foi usado hidróxido de sódio. A neutralização com hidróxido de sódio foi necessária para a manutenção do pH do meio de cultivo (Tabela 4.6). Posteriormente,

procedeu-se a distribuição das soluções em frascos de antibióticos (30 mL), sob fluxo de hélio (99,999 %). Os frascos foram fechados com tampas de butila, lacrados e esterilizados em autoclave a 121°C e 1 atm, por 20 minutos. Os frascos foram armazenados a temperatura ambiente. As concentrações dos substratos adicionados ao meio foram diferentes, com a finalidade de manter a mesma concentração de carbono, e com isso a mesma relação C/N.

Tabela 4.6: Soluções-estoque

Componentes	Massa (g)	NaOH (g)	Volume de água deionizada (L)
Acetato de sódio	49,22	-	0,2
Butirato de sódio	33,04	-	1
Citrato de sódio	58,82	-	0,2
Ácido láctico (88 % pureza)	40,91	16	0,2
Ácido málico (99 %pureza)	50,25	30	0,25
Glutamato de sódio	18,71	-	0,2

4.3 Curva-padrão de crescimento celular

Para a obtenção da curva-padrão de crescimento do consórcio fototrófico procedeu-se ao ensaio, em duplicata, em reatores anaeróbios com volume total de 5 L, sendo 3,6 L preenchidos com meio RCVB, 0,4 L com inóculo e o restante (1 L) com hélio (99,999 %). Nesse ensaio foi usado ácido málico como fonte de carbono e glutamato como fonte de nitrogênio, nas mesmas concentrações dos ensaios de enriquecimento do consórcio, com relação C/N=7,5. Tayed & Madigan (1987) recomendam a utilização de ácido málico uma vez que, esse substrato é utilizado universalmente pelas bactérias fototróficas púrpuras não-sulfurosas.

A quantificação celular foi realizada por leitura de absorbância à 660 nm, em espectrofotômetro HACH (modelo DR/4000). Para a leitura da absorbância foram retirados 3

mL de amostra dos frascos, de forma asséptica, os quais foram colocados em tubos Falcon (15 mL), centrifugados a 10.000 rpm, 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspendido em água deionizada e, então, procedeu-se a leitura de absorbância no espectrofotômetro. As análises de SSV foram realizadas segundo APHA-AWWA-WPCF (2005). Tais valores foram relacionados entre si por meio de regressão linear e a equação dessa reta foi utilizada para estimar SSV dos ensaios a partir de valores de absorbância.

4.4 Determinação da velocidade específica de crescimento

A curva de crescimento da biomassa foi obtida pelo ajuste dos pontos amostrados ao modelo de Boltzmann (APÊNDICE 2), e a velocidade específica de crescimento (APÊNDICE 3), foi obtida derivando-se essa curva. Ambos os procedimentos foram realizados com auxílio do software Origin, versão 6.0.

4.5 Análise da diversidade microbiana

4.5.1 Exames microscópicos

Para avaliar a morfologia celular foram realizadas análises de microscopia óptica de contraste de fase, em microscópio Olympus BX-60, acoplado à câmera para captura de imagens (Evolution QE, Media Cybernetics Inc., USA) utilizando software Image Pro-Plus 4.5.

A coloração de Gram foi realizada para diferenciação dos microrganismos, conforme procedimento DMS, 1981. A observação foi realizada em microscópio óptico de luz comum com objetiva de imersão.

4.5.2 Análise de biologia molecular

As amostras de biomassa foram coletadas no final dos ensaios de enriquecimento do consórcio fototrófico. O DNA foi extraído de acordo com o protocolo de Griffiths (2000).

Para amplificação dos fragmentos do RNAr 16S foram usados *primers* específicos - 27F-1100R – (Lane, 1991) (

Tabela 4.7). Na reação em cadeia da polimerase (PCR – *polymerase chain reaction*) foram usados 0,4 μ M de cada *primer*, 200 μ M de dNTPs (GE Health Care), 2 Unidades de Taq DNA polimerase (Invitrogen) e aproximadamente 100 ng de DNA genômico.

Tabela 4.7: *Primers* utilizados na amplificação do gene do DNAr 16S

<i>Primers</i>	Seqüências (5' - 3')
27F	5'- AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'
1100R	5'-AGG GTT GCG CTC GTT G-3'

Fonte: Lane (1991)

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 3 μ L de produto de PCR purificado; 1 μ L de tampão com MgCl₂; 1 μ L de dATP; 1 μ L de Taq polimerase e 4 μ L de água ultra purificada estéril. 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 vector pGEm easy; 2 μ L do produto de PCR adenilado; 1 μ L T4 DNA ligase e 1 μ L de água ultra purificada estéril. 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 encontrava 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 µL de meio Luria-Bertani (Tabela 4.8) e incubação do mesmo por 45 minutos, sob agitação (150 rpm).

Após esse período, 100 µL 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 Luria-Ber, ampicilina, IPTG e X-Gal, e foram preparadas como descrito na Tabela 4.9.

Tabela 4.8: Composição do meio de cultivo Luria-Bertani

Nutrientes	Concentração (g/L)
Triptona	10
Extrato de levedura	5
NaCl	5
Agar	15

Tabela 4.9: Componentes adicionados ao meio de cultivo Luria-Bertani

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

Após 12 horas de incubação, as placas foram armazenadas em geladeira, para que pudesse ser visualizada com maior facilidade a coloração das colônias, pois aquelas que não receberam o inserto apresentariam coloração azulada e não seriam utilizadas.

Com auxílio de ponteira estéril, em fluxo laminar, cada colônia com o inserto crescida nas placas de Petri foram repicadas, individualmente em tubos contendo meio de cultivo LB (5 mL) e ampicilina (2 µL). Tais tubos foram mantidos em câmara de germinação, a 30°C sob agitação (150 rpm), por 12 horas.

Posteriormente, o DNA plasmidial foi extraído, conforme os seguintes passos: 2 mL da cultura crescida de *E. coli* foram centrifugados por 5 minutos a 4°C em 10.000 rpm. O sobrenadante foi desprezado, o *pellet* formado foi ressuscitado em 100 µL de solução de GTE (Tabela 4.10) agitado em vórtex e mantido a temperatura ambiente por 5 minutos. A cada tubo foram adicionados 200 µL da solução de NaOH SDS (Tabela 4.11), seguido de agitação manual e permanência em banho de gelo por 5 minutos. Adicionou-se 150 µL da solução de acetato de potássio (Tabela 4.12), procedeu-se a mistura em vórtex, novamente os tubos foram mantidos em banho de gelo por mais 5 minutos. Os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 4°C a 10000 rpm e o sobrenadante (400 µL) foi transferido, com auxílio de pipetas para novo tubo. A cada tubo foi adicionado 800 µL de etanol (95 %) e mantidos por 2 minutos a temperatura ambiente. Novamente, os tubos foram agitados em vórtex e centrifugados nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi retirado e o *pellet* lavado com 1 mL de etanol (70 %), centrifugado e o sobrenadante descartado. Os tubos foram mantidos invertidos por 4 horas para evaporação do etanol, após esse período o *pellet* foi ressuscitado com 30 µL de água ultra-purificada estéril e adicionou-se 1 µL de RNAase (10 mg/L).

O DNA plasmidial foi amplificado por PCR utilizando *primers* (CHUN, 1995) apresentados na Tabela 4.13, sob as condições do termociclador apresentadas na Tabela 4.14. Posteriormente, a eficiência de extração e a amplificação dos plasmídeos foram verificadas por eletroforese em gel de agarose.

Tabela 4.10: Composição da solução de GTE

Componentes	Volume (mL)
Solução de glicose 1M	1,25
Solução TRIS 1M	0,62
Solução de EDTA 0,5M	0,5
Água ultra purificada	22,63

Tabela 4.11: Composição da solução de NaOH/SDS

Componentes	Concentração (g/0,1L)
NaOH	0,8
SDS	1,053

Tabela 4.12: Composição da solução de acetato de potássio pH 4,8

Componentes	Volume (mL)
Solução de KCl 5M	100
Ácido acético glacial	19,17
Água ultra purificada	47,5

Tabela 4.13: *Primers* utilizados na amplificação do DNA plasmidial

Microrganismos	<i>Primers e seqüência (5' - 3')</i>
Domínio Bacteria	M13F (5'-CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC-3')
	M13R (5'-TTT CAC ACA GGA AAC AGC TAT GAC-3')

Fonte: Chun (1995)

Tabela 4.14: Programação do termociclador para amplificação dos fragmentos do DNA plasmidial

Nº de ciclos	Desnaturação inicial	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Resfriamento
30	94 °C 3 min	94 °C 20 s	60 °C 20 s	72°C 1,5 min	4 °C

Para a reação de seqüenciamento foi utilizado Big Dye Terminator (Applied Biosystem®) com nucleotídeos marcados. Foram utilizados 1 µL de Big Dye, 2 µL de produto de PCR purificado, 1 µL de *primer*, 2 µL de tampão e 4 µL de água ultra-purificada estéril, totalizando 10 µL. Os tubos foram colocados em termociclador sob as condições apresentadas na Tabela 4.15.

Tabela 4.15: Programação do termociclador para reações de seqüenciamento

Desnaturação	Anelamento	Extensão
94°C por 15 segundos	50° C por 15 segundos (M13F)	60°C por 4 minutos
35 ciclos		

Para a precipitação do DNA foram adicionados 40 µL de isopropanol (65 %) em todos os tubos, os quais foram mantidos por 15 minutos na ausência de luz em temperatura ambiente. Centrifugou-se a 14.000 rpm a 20°C por 45 minutos. 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 seqüências de nucleotídeos foi realizada em analisador automático de DNA modelo ABI PRISM 310 (Applied Biosystems®).

4.5.3 Análise das seqüências de DNAr 16S

As seqüências de nucleotídeos foram processadas por meio do *software* Seqman do pacote *Lasergene DNASTar* para remoção do vetor e de bases com baixa qualidade.

Para a afiliação filogenética das seqüências, utilizou-se a ferramenta SEQ MATCH a fim de comparar as seqüências com os bancos de dados do Ribossomal Database Project (RDP: http://rdp.cme.msu.edu/seqmatch/seqmatch_intro.jsp), que classificam as seqüências em possíveis níveis taxonômicos.

Para definição das unidades taxonômicas operacionais (UTOs) foi usado o programa DOTUR (SCHLOSS & HANDELSMAN, 2005). Para tanto, utilizou-se uma matriz de distância evolutiva calculada por meio do programa DNADIST (algoritmo do Kimura) do pacote PHYLIP 3.63 (FELSENSTEIN: <http://evolution.genetics.washington.edu/phytip.html>), a partir do alinhamento feito usando-se o programa

Clusta X 2.0, com definições de parâmetros padrão. Os números de UTOs e de seqüências de cada UTO foram determinados considerando-se a distância evolutiva de 0,03.

As UTOs foram alinhadas com as seqüências do banco de dados RDP no programa Clustal X 2.0. As relações filogenéticas obtidas foram analisadas pelos métodos "neighbor-joining" e máxima parcimônia do pacote PHYLIP 3.63. Análises de *bootstrap* foram baseadas em 100 reamostragens.

4.6 Análises Cromatográficas

4.6.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Nesse trabalho foi realizado o desenvolvimento e validação de método para determinação de onze ácidos orgânicos de cadeia curta por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Esse método foi desenvolvido para viabilizar a análise desses componentes simultaneamente nas amostras provenientes dos reatores fototróficos. Os ácidos orgânicos analisados foram os seguintes: cítrico, málico, succínico, lático, fumárico, acético, propiônico, isobutírico, butírico, isovalérico e valérico, os quais foram selecionados porque poderiam ser subprodutos da fermentação dos substratos aplicados nessa pesquisa.

4.6.2 Instrumentação

O método foi desenvolvido por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em sistema Shimadzu® equipado com bomba LC-10ADVP, válvula FCV-10ALVP, detector ultravioleta (UV) com arranjo de diodos (SPD-M10 AVP), controlador SCL-10AVP e injetor Rheodyne® (100 µL loop). A coluna usada foi Aminex® HPX-87H (300 mm x 7,8 mm; Bio-

Rad). Os resultados das injeções cromatográficas foram analisados em software Class-VP (Shimadzu®).

As condições cromatográficas, baseadas na metodologia descrita por Shneider *et al.* (1987), foram ajustadas a fim de se obter melhor separação e quantificação dos onze analitos. As variáveis testadas foram às seguintes: fase móvel (ácido sulfúrico 0,005 M, com adição ou não de 3% de acetonitrila e 0,5% de ácido fosfórico), temperatura do forno (47 a 64 °C), fluxo (0,5 a 0,8 mL/min) e comprimento de onda (208 e 210 nm).

4.6.3 Preparo dos padrões

As amostras e as diluições para obter as curvas de calibração foram previamente tratadas antes da injeção no cromatógrafo líquido. As amostras foram preparadas em balão volumétrico (5 mL) e acidificadas com 200 µL de solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄ 2M (pH<2). Em seguida, cada amostra foi filtrada em membrana com porosidade de 0,2 µm.

4.6.4 Elaboração das curvas de calibração

4.6.4.1 Preparo das soluções-estoques de ácidos orgânicos

A solução-estoque de cada ácido foi preparada com concentração de aproximadamente 10 a 20 g/L cada um, dependendo da sua solubilidade, diluídos em água ultrapurificada. Os ácidos orgânicos pouco solúveis em água, como por exemplo, propiônico, isobutírico, butírico, isovalérico e valérico foram diluídos em água ultrapurificada adicionando-se hidróxido de sódio (NaOH) conforme reação estequiométrica de neutralização dessas

substâncias. Tais soluções-estoques foram armazenadas em frascos plásticos e estocadas em freezer a -20°C até seu uso.

Para o preparo de cada substância foi usada a equação 4.1. Na equação:

C: concentração (g/L),

m: massa da substância (g) e

V: volume final da solução (L).

$$C = \frac{m}{V} \quad (4.1)$$

Para as substâncias líquidas com porcentagem de pureza maior que 98% utilizou-se este cálculo direto (Equação 4.1) de preparação da solução. Anotou-se a massa de cada substância pesada para calcular a real concentração da solução-estoque preparada. A concentração dessas soluções e a porcentagem de pureza de cada ácido estão apresentadas na Tabela 4.16.

Tabela 4.16: Pureza e concentração das soluções-estoques de ácidos orgânicos

Ácido	Pureza (%)	Concentração-Estoque (g/L)
Cítrico	99,5	10,02
Málico	99,0	10,00
Succínico	99,0	10,01
Lático*	91,0	10,01
Fumárico	99,0	5,00
Acético	99,8	20,02
Propiônico	99,5	20,03
Isobutírico	99,5	20,00
Butírico	99,0	20,02
Isovalérico	98,0	20,01
Valérico	99,0	10,07

* Preparada como lactato de sódio

4.6.4.2 Curvas de calibração

Para preparar as diluições das amostras padrão para a confecção das curvas de calibração foi preparada uma solução contendo todas as substâncias de interesse, chamada solução-mãe, de concentração conhecida (neste caso, de aproximadamente 1 g/L).

A partir desta solução retiraram-se alíquotas para fazer todas as diluições usadas para a elaboração das curvas de calibração, usando água ultrapurificada e substrato sintético (meio RCVB) como solventes. As diluições de cada ponto da curva foram feitas em triplicata, ou seja, foram preparadas três soluções para cada concentração.

A quantificação das substâncias foi feita através do método padrão externo, em que a porcentagem em massa de uma amostra de concentração desconhecida é determinada a partir de um gráfico de calibração.

As diluições para as curvas de calibração foram preparadas em sete diferentes concentrações: 20, 50, 100, 300, 500, 700 e 1000 mg/L, as quais foram calculadas por meio da fórmula de volumetria (Equação 4.5).

$$C_1 V_1 = C_2 V_2 \quad (4.5)$$

Sendo:

C_1 : concentração da solução-mãe (mg/L),

V_1 : volume da solução-mãe (mL),

C_2 : concentração requerida da diluição (mg/L),

V_2 : volume da solução final (mL).

Na Tabela 4.17 apresentam-se as concentrações reais médias de cada ponto para cada ácido. Esses dados foram inseridos no software para a confecção das curvas de calibração nas diluições em água e substrato sintético.

Tabela 4.17: Valores calculados das concentrações para as curvas de calibração

Ácido	Concentração real						
	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5	Ponto 6	Ponto 7
Cítrico	20,000	50,000	100,000	299,999	499,998	699,997	999,996
Málico	20,000	50,000	100,000	300,000	500,000	700,000	1000,000
Succínico	20,000	50,000	100,000	300,000	500,000	699,999	999,999
Lático	20,000	50,000	100,000	300,000	500,000	699,999	999,999
Fumárico*	0,200	0,500	1,000	3,000	5,000	7,000	10,000
Acético	20,020	50,050	100,100	300,300	500,500	700,700	1001,000
Propiônico	20,030	50,075	100,150	300,450	500,750	701,050	1001,500
Isobutírico	20,000	50,000	100,000	300,000	500,000	700,000	1000,000
Butírico	20,020	50,050	100,100	300,300	500,500	700,700	1001,000
Isovalérico	20,010	50,025	100,050	300,150	500,250	700,350	1000,500
Valérico	19,999	49,998	99,995	299,985	499,976	699,966	999,951

*Diluição cem vezes menor que os demais devido ao alto sinal cromatográfico

4.6.5 Validação do método

O método de análise de ácidos orgânicos por CLAE foi validado pela determinação de sua linearidade, precisão, precisão instrumental e limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) de acordo com Damasceno *et al.* (2008), Duarte *et al.* (2006) e Ribani *et al.* (2004).

4.6.6 Determinação da concentração dos substratos orgânicos utilizados

O consumo dos substratos foi acompanhado através da análise de amostras líquidas (3 mL), que foram retiradas de maneira asséptica e colocadas em tubos Falcon (15 mL), centrifugadas a 10.000 rpm, 4°C por 10 minutos. O sobrenadante retirado do tubo foi diluído

e acidificado com ácido sulfúrico (2M). Posteriormente, foi filtrado em membrana de 0,22 μm e analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE, Shimadzu®), com detector ultravioleta (UV) com arranjo de diodos, em coluna Aminex® HPX-87H (300 mm x 7,8 mm; Bio-Rad).

4.6.7 Determinação do gás hidrogênio

A concentração de hidrogênio foi avaliada por meio da retirada de amostra (250 μL) do *headspace* dos reatores fototróficos. A análise foi realizada em cromatógrafo gasoso GC-2010 SHIMADZU, equipado com detector de condutividade térmica (TCD), com coluna Carboxen 1010 plot 30 m X 0,53 mm, sendo o gás de arraste o argônio (grau cromatográfico). As temperaturas do forno, da coluna e do detector foram 200°C, 30°C e 230°C, respectivamente.

5 Resultados e Discussão

5.1 Desenvolvimento e validação de método para determinação de ácidos orgânicos por cromatografia líquida de alta eficiência

As melhores condições para separação dos analitos foram às seguintes: solução de ácido sulfúrico 0,005 M como fase móvel, temperatura do forno a 64 °C, fluxo de 0,8 mL/min a 208 nm. Nestas condições, o tempo total de análise dos onze ácidos orgânicos foi de aproximadamente 23 minutos. Na Figura 5.1 apresenta-se o cromatograma dos onze analitos obtidos nestas condições.

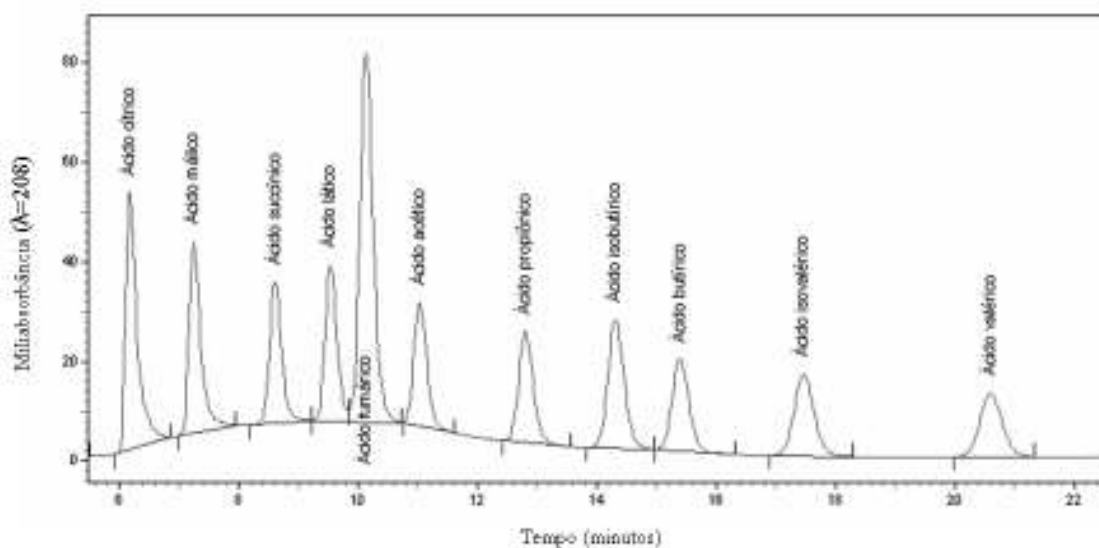


Figura 5.1: Cromatograma típico de ácidos orgânicos de cadeia curta determinado por CLAE, com detector de UV e arranjo de diodos. Condições: coluna Aminex® HPX-87H, fase móvel: 0,005 M H₂SO₄; fluxo: 0,8 mL/min, temperatura do forno: 64 °C e $\lambda=208$ nm

5.1.1 Linearidade

A linearidade do método foi avaliada por meio da regressão linear da concentração (mg/L) de cada substância e área cromatográfica correspondente. As equações de regressão linear das curvas de calibração e o coeficiente de determinação (R^2) de cada componente analisado estão apresentados na Tabela 5.1.

De acordo com esses valores, pode-se dizer que o método apresentou linearidade para as concentrações analisadas (20 a 1000 mg/L) nas condições cromatográficas aplicadas, com R^2 superior a 0,999, tanto para diluições feitas em água ultrapurificada quanto para aquelas feitas em substrato sintético, exceto para o ácido acético (Tabela 5.1).

Tabela 5.1: Equações das curvas de regressão em água ultrapurificada e substrato sintético

Ácido	Diluição	Equação	R ²
Cítrico	Água	Y = 7512,3 x - 15979,6	0,9996
	Meio RCVB	Y = 7355,5 x + 1350,9	0,9997
Málico	Água	Y = 5826,6 x - 30813,7	0,9992
	Meio RCVB	Y = 5699,8 x - 12108	0,9997
Succínico	Água	Y = 3834,8 x + 15007,1	0,9995
	Meio RCVB	Y = 3797,4 x + 33222	0,9998
Lático*	Água	Y = 4196,9 x + 15704,7	0,9993
	Meio RCVB	Y = 4375 x - 6312,4	0,9998
Fumárico	Água	Y = 11720,8 x - 3921	0,9992
	Meio RCVB	Y = 11723,3 x - 21001,8	0,9997
Acético	Água	Y = 4028,9 x - 32239,3	0,9952
	Meio RCVB	Y = 4066,8 x - 60065	0,9937
Propiônico	Água	Y = 3836,2 x + 11569,8	0,9994
	Meio RCVB	Y = 3836,1 x + 9057,2	0,9998
Isobutírico	Água	Y = 4754 x + 26167,7	0,9993
	Meio RCVB	Y = 4876,9 x + 23007	0,9997
Butírico	Água	Y = 3715,6 x + - 805,5	0,9995
	Meio RCVB	Y = 3688,1 x + 8532,6	0,9997
Isovalérico	Água	Y = 3869,3 x - 57567,5	0,9952
	Meio RCVB	Y = 3937,5 x + 3470,9	0,9998
Valérico	Água	Y = 3514,9 x - 2257	0,9995
	Meio RCVB	Y = 3528,9 x - 1428,5	0,9999

5.1.2 Precisão instrumental

A precisão foi expressa como coeficiente de variação (CV) dos tempos de retenção de cada analito diluído em água ultrapurificada e meio RCVB nas sete diferentes concentrações analisadas, conforme a Equação 5.1.

$$CV(\%) = \frac{DP_{TR}}{Média_{TR}} \cdot 100 \quad (5.1)$$

Sendo,

CV: coeficiente de variação,

TR: tempo de retenção e

DP: desvio padrão.

Nas condições empregadas, o CV variou de 0,0352 a 0,3258 % e de 0,0445 a 0,3303 % para diluição em água e meio RCVB, respectivamente (Tabela 5.2).

Tabela 5.2: Precisão do método para cada analito diluído (n=3) em água ultrapurificada e substrato sintético

Ácido	Água			Meio RCVB		
	Média TR* (min)	Desvio Padrão	CV(%)	Média TR* (min)	Desvio Padrão	CV(%)
Cítrico	6,1882	0,0178	0,2870	6,1700	0,0070	0,1130
Málico	7,2589	0,0232	0,3194	7,2365	0,0068	0,0940
Succínico	8,6163	0,0240	0,2782	8,5953	0,0067	0,0775
Lático	9,5432	0,0196	0,2056	9,5125	0,0312	0,3303
Fumárico	10,1606	0,0331	0,3258	10,1291	0,0069	0,0678
Acético	11,0341	0,0179	0,1618	11,0199	0,0067	0,0610
Propiônico	12,7951	0,0130	0,1014	12,7902	0,0076	0,0592
Isobutírico	14,2930	0,0091	0,0637	14,2960	0,0077	0,0537
Butírico	15,3712	0,0086	0,0559	15,3770	0,0068	0,0445
Isovalérico	17,4226	0,0061	0,0352	17,4403	0,0081	0,0463
Valérico	20,5414	0,0083	0,0405	20,5664	0,0102	0,0496

* TR: tempo de retenção

A precisão instrumental (repetibilidade) foi estimada como coeficiente de variação (CV) dos tempos de retenção de dez injeções sucessivas da solução-padrão à concentração de 700 mg/L diluído em meio RCVB. Nas condições cromatográficas aplicadas, o CV variou de 0,0632 a 0,1083 % (Tabela 5.3). Os valores de CV obtidos nestas análises foram menores do que os obtidos por Damasceno *et al.* (2008), 0,8 a 1,56 % e Duarte *et al.* (2006) 0,74 a 1,46 %, para os métodos desenvolvidos para análise de aldicarbe e linear alquilbenzeno sulfonado (LAS), respectivamente.

Tabela 5.3: Repetibilidade do método para 700 mg/L (n=10) em substrato sintético

Ácido	Média TR (min)	Desvio Padrão	CV(%)
Cítrico	6,1791	0,0067	0,1083
Málico	7,2443	0,0070	0,0965
Succínico	8,6005	0,0080	0,0932
Lático	9,5342	0,0081	0,0849
Fumárico	10,1372	0,0083	0,0818
Acético	11,0240	0,0089	0,0805
Propiônico	12,7899	0,0094	0,0738
Isobutírico	14,2900	0,0101	0,0706
Butírico	15,3685	0,0105	0,0686
Isovalérico	17,4216	0,0112	0,0644
Valérico	20,5379	0,0130	0,0632

5.1.3 Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração da substância em análise que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada. O limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração da substância em análise que pode ser medida, utilizando determinado procedimento experimental (RIBANI *et al.*, 2004).

O LD e LQ de cada ácido para este método foram calculados de acordo com metodologia descrita por Ribani *et al.* (2004), para as curvas de calibração feitas em meio RCVB. Os valores de LD e LQ estão apresentados na Tabela 5.4.

Tabela 5.4: Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

Ácido	LD (mg/L)	LQ (mg/L)
Cítrico	2,389	7,241
Málico	2,027	6,143
Succínico	3,682	11,156
Lático	3,462	10,490
Fumárico	2,362	7,158
Acético	1,302	3,946
Propiônico	2,540	7,698
Isobutírico	3,997	12,113
Butírico	2,278	6,902
Isovalérico	1,321	4,004
Valérico	1,521	4,609

Os valores de LD e LQ variaram de 1,302 mg/L (ácido acético) a 3,997 mg/L (ácido isobutírico) e de 3,946 mg/L (ácido acético) a 12,113 mg/L (ácido isobutírico), respectivamente. De acordo com tais valores, pode-se afirmar que o método empregado para a quantificação desses ácidos orgânicos foi eficiente.

5.2 Obtenção do consórcio fototrófico anoxigênico

Como um dos objetivos do presente trabalho era obter consórcio fototrófico capaz de utilizar ácidos orgânicos e produzir gás hidrogênio, optou-se por misturar os dois inóculos enriquecidos, contribuindo dessa maneira para aumentar a diversidade microbiana.

Após três semanas de incubação, a cultura fototrófica púrpura pôde ser observada aderida à parede dos frascos para os dois inóculos (Figura 5.2a). Após, sucessivos repiques em meio estéril, com auxílio de alça de platina, obteve-se o consórcio fototrófico (Figura 5.2b). Para ambos os inóculos a fonte de carbono utilizada foi o ácido málico, na forma neutralizada (malato de sódio), descrito na literatura como o substrato universalmente utilizado pelas bactérias fototróficas (TAYED & MADIGAN, 1987).

Durante a fase de enriquecimento para obtenção do consórcio fototrófico foram observadas várias morfologias celulares, tais como, bacilos, cocos e espiroquetas, que se apresentavam na maioria das vezes agrupados (Figura 5.3a e Figura 5.3b).

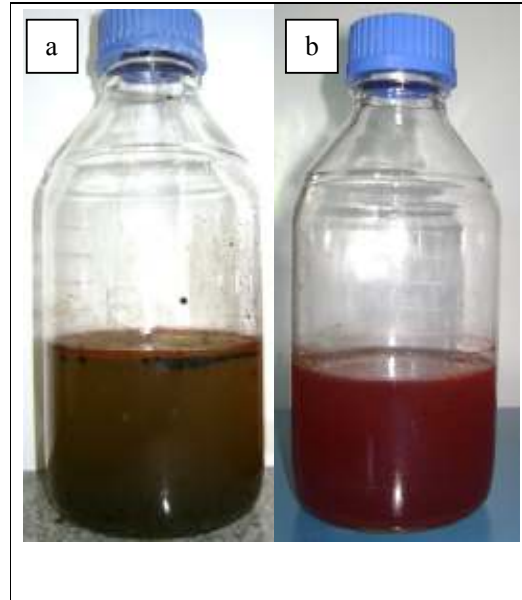


Figura 5.2: a) Consórcio fototrófico de bactéria púrpura não-sulfurosa após três semanas de incubação; b) Biomassa fototrófica púrpura não-sulfurosa

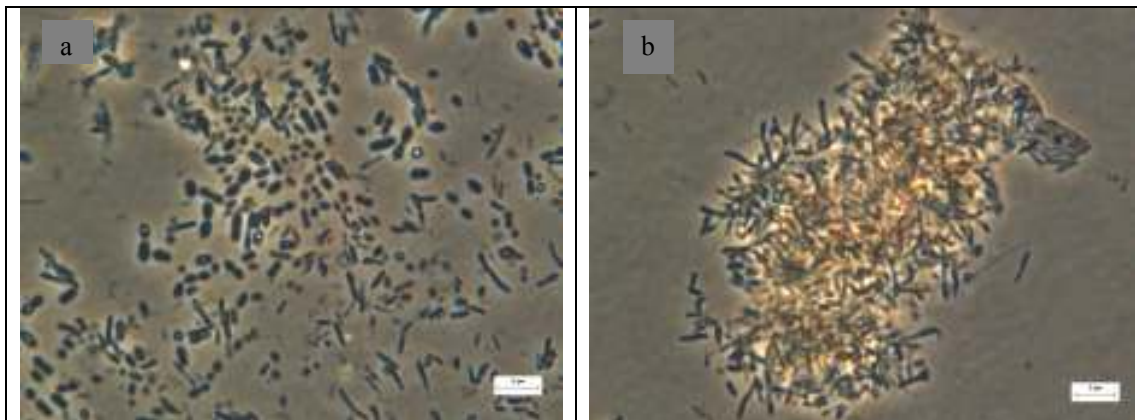


Figura 5.3: Microscopia óptica de contraste fase das amostras dos reatores em batelada na fase enriquecimento (Aumento -2000X): a) morfologias celulares, tais como, bacilos, cocos e espiroquetas, e b) aglomerado celular

Após a purificação do consórcio fototrófico pôde-se observar o predomínio de bacilos, além de cocos unidos aos pares (Figura 5.4).



Figura 5.4: Microscopia óptica de contraste fase das amostras dos reatores em batelada na fase purificação (Aumento -2000X)

A partir da técnica de coloração de Gram, realizada em amostras do consórcio fototrófico, pôde-se observar o predomínio de células Gram-negativas, que é a coloração indicada na literatura das bactérias fototróficas púrpuras não-sulfurosas (Figura 5.5a e Figura 5.5b). Outras bactérias, encontradas na análise molecular, também possuem morfologia semelhante a bacilos Gram-negativos, como, por exemplo, *Propionivibrio* sp. e *Sulfurospirillum* sp. e justificam o predomínio de bacilos com tal coloração no consórcio microbiano.

Todavia, apesar da maior parte das bactérias serem Gram-negativas alguns bacilos Gram-positivos também foram observados. Dentre esses, foi observado na análise molecular bactérias semelhantes a *Propionicimonas* sp., as quais são bacilos ligeiramente curvos e Gram-positivos (AKASAKA *et al.*, 2003). Outro gênero identificado na análise molecular foi *Clostridium*. Tais bactérias são Gram-positivas e formadoras de endósporos. Microrganismos deste gênero são comumente citados na literatura como produtores de gás hidrogênio via metabolismo fermentativo por meio do consumo de diversos substratos, tais como açúcares (sacarose, glicose e xilose, entre outros). Contudo, estas fontes de carbono não foram

utilizadas como substrato e, por isso, acredita-se que esses microrganismos não foram os responsáveis pela produção do gás neste trabalho (NANDI *et.al.*, 1998; MADIGAN *et al.*, 2005;). Além disso, produção favorável de gás hidrogênio por tais células ocorre em pH 5,5 no escuro. Essa condição de pH não foi usada nos experimentos, uma vez que esse valor foi mantido em 6,8 e iluminação de 6.000 lux.

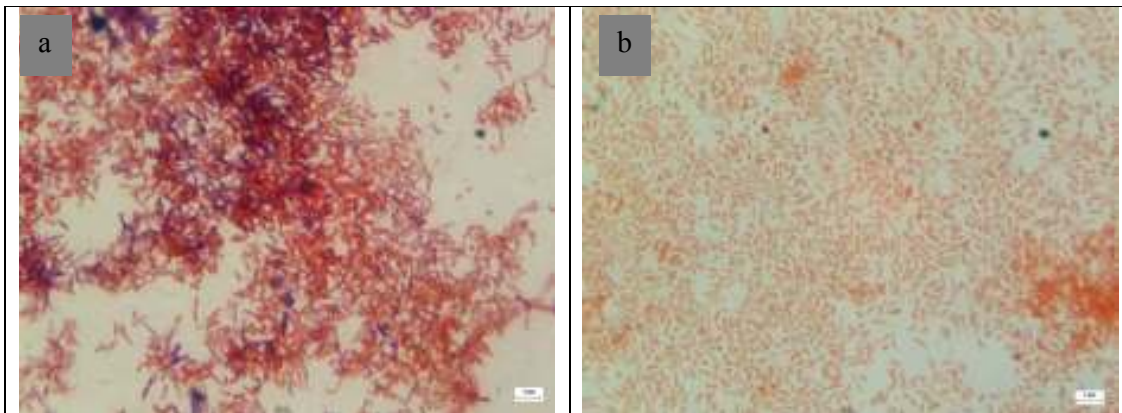


Figura 5.5: Microscopia óptica de luz comum de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (Aumento -2000X)

Ao longo dos exames microscópicos foram observados bacilos, os quais apresentavam regiões circulares brancas, que estão indicados com setas vermelhas na Figura 5.6. Tais estruturas, observadas em análises de microscopia óptica de contraste de fase, foram relacionadas com estruturas de resistência mencionadas acima, os endósporos, as quais são produzidas por bacilos Gram-positivos, como, por exemplo, *Clostridium*; outra possibilidade é que estas estruturas sejam materiais de reserva, tais como glicogênio ou PHB, os quais são armazenados por algumas espécies e podem ser utilizados para o crescimento celular quando as condições ambientais são desfavoráveis (MADIGAN *et al.*, 2005).

Exemplo dessa constatação foi verificado por YIĞIT *et. al.* (1999) com *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001. Tais bactérias fototróficas foram capazes de produzir hidrogênio (35 mL em 198 h) e acumular PHB (0,5 g/L) em meio de cultura contendo 30 % de água residuária de refinaria de açúcar. A produção também foi constatada pela mesma cultura

quando ácido málico e glutamato de sódio foram utilizados como fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente, nas relações 7,5/10 e 15/2. Apesar de ser possível a produção concomitante do gás e do polímero, sabe-se que a produção de hidrogênio decresce quando a produção do PHB inicia-se, pois ambos os processos utilizam o poder redutor gerado a partir do metabolismo dos ácidos orgânicos (YIĞIT *et. al.*, 1999).

No presente trabalho foram utilizadas as mesmas fontes de carbono e nitrogênio, para relação 15/2, utilizadas por YIĞIT *et al.* (1999). Clones semelhantes à *Rhodobacter* sp. foram identificados na análise molecular e, por se tratar do mesmo gênero citado, provavelmente, tais estruturas sejam relacionadas ao material de reserva, PHB o que pode ter contribuído para o decréscimo na produção do gás H₂, como apresentado posteriormente.

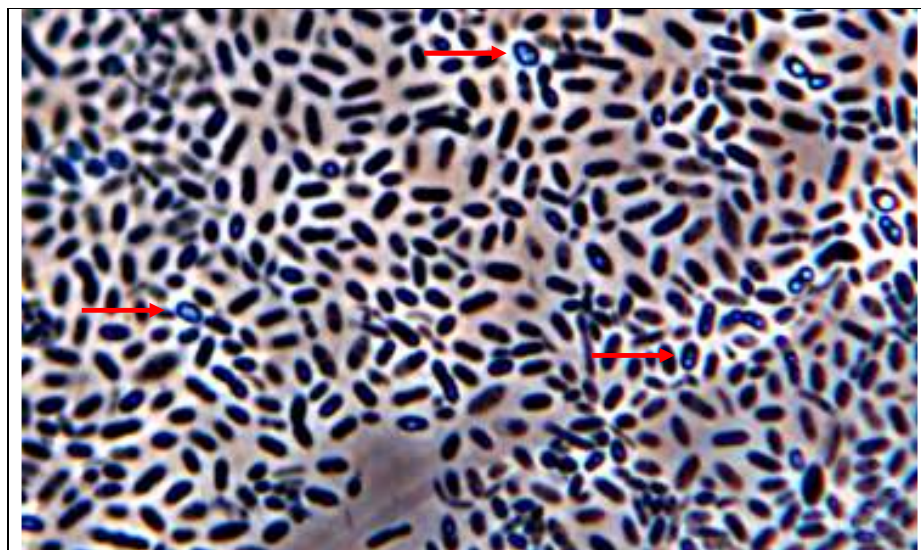


Figura 5.6: Microscopia óptica de contraste de fase de amostras do consórcio microbiano fototrófico

5.3 Caracterização filogenética do consórcio fototrófico

Na análise filogenética por meio de fragmentos do DNAr 16S foram obtidos 54 clones. Desse total de clones, 43 foram utilizados na construção da árvore filogenética. Essas 43 seqüências foram agrupadas em 17 unidades taxonômicas operacionais (UTO), com mais

de 97 % de similaridade para algumas delas. Na Figura 5.7 pode-se observar o número de unidades taxonômicas operacionais versus a porcentagem de similaridade entre as seqüências. Optou-se por agrupar tais seqüências em 17 UTOs com similaridade de 97 % com a finalidade de obter grupos representativos dos microrganismos presentes no consórcio.

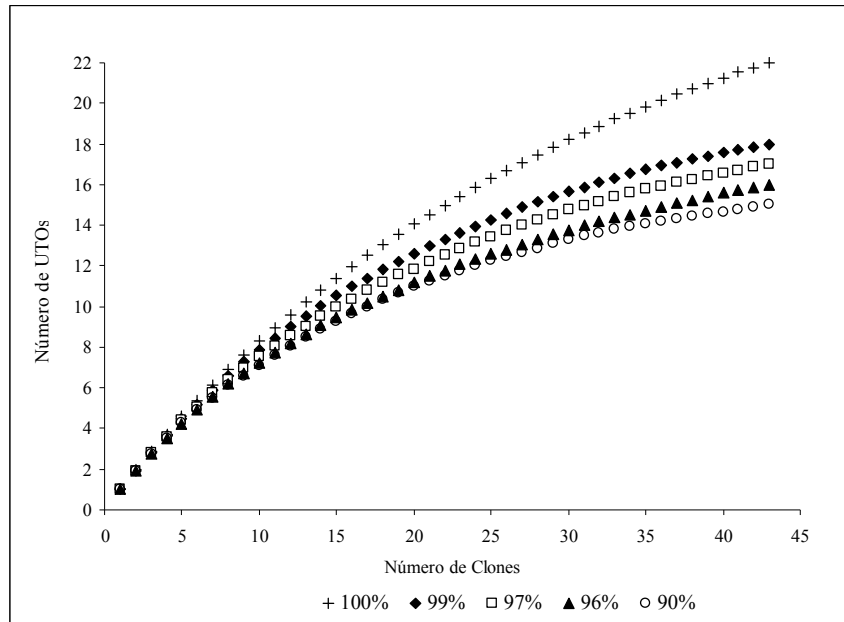


Figura 5.7: Curva de rarefação

Na Figura 5.8 está representada a distribuição dos clones obtidos na análise molecular para as 17 UTOs. Nas UTOs 1, 2, 3, 4, 5 e 6 há somente um clone. As de número 7, 8, 9 e 10 contêm dois clones cada, enquanto as UTOs 11, 12, 13, 14 e 15 agrupam 3 clones cada uma. As UTOs que agruparam mais clones foram 16 e 17, respectivamente, com 5 e 9 clones.

A UTO 1 compreende um clone semelhante a *Acholeplasma* sp., microrganismo do gênero *Mollicutes*, representado por bactérias sem parede celular, relacionadas muitas vezes como Gram-positivas por suas características filogenéticas. Entretanto, não se coram como Gram-positivas devido a ausência de parede celular. São descritos na literatura como microrganismos patogênicos de plantas e animais (HILL, 1992).

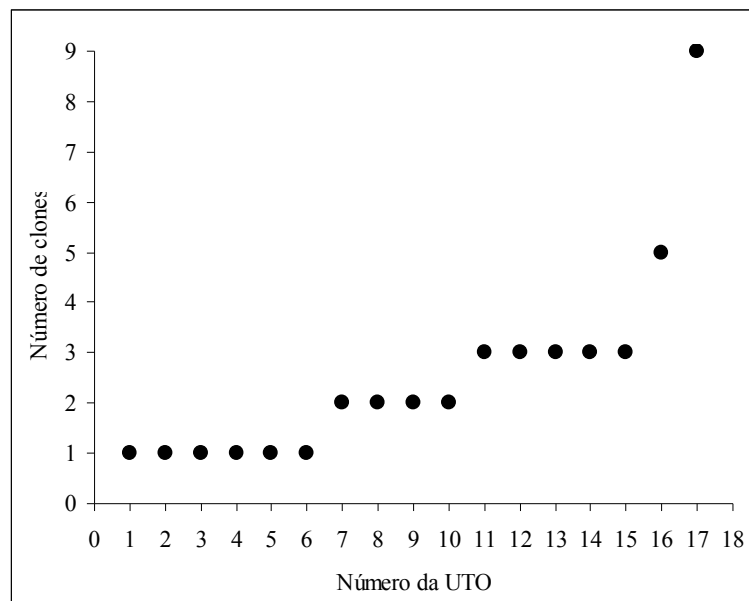


Figura 5.8: Distribuição dos 43 clones nas 17 unidades taxonômicas operacionais (UTOs)

Clones semelhantes à *Clostridium* foram agrupados em duas diferentes UTOs. Um deles foi agrupado na UTO 2, e outros 5 foram reunidos na UTO 16. Tais bactérias formam endósporos quando as condições ambientais são desfavoráveis. Essas bactérias realizam metabolismo fermentativo e são capazes de utilizar ampla variedade de substratos orgânicos para produzir gás hidrogênio e ácidos orgânicos. Essas bactérias são predominantes na biomassa granulada dos reatores UASB, a qual foi usada como inóculo nesse trabalho (MAINTINGUER *et al.*, 2008). Portanto, embora as condições impostas não foram favoráveis ao desenvolvimento de tais bactérias, as mesmas permaneceram no reator. As seqüências obtidas nessa pesquisa foram semelhantes aquelas de ambientes com concentrações elevadas de antibióticos, demonstrando que este gênero é bastante resistente a condições ambientais seletivas (Von ARB *et al.*, submetido em 2005).

As UTOs 7 e 8 compreenderam clones com seqüências semelhantes a bactéria não-cultivada (Liu *et al.*, 2006). Liu *et al.* (2006) utilizaram reator alimentado com glicose,

quinolina (um dos principais hidrocarbonetos aromáticos policíclicos nitrogenados) e nitrato de sódio com a finalidade de degradar a quinolina e remover matéria orgânica sob condições desnitrificantes e encontraram sequencias que foram semelhantes as obtidas no presente trabalho.

A UTO 9 agrupou 3 clones com seqüências semelhantes à *Propionicimonas paludica*, espécie capaz de fermentar a glicose e na presença de excesso de cianocobalamina (vitamina B₁₂) produzir acetato, lactato, succinato e propionato, além de gás carbônico. São microrganismos anaeróbios facultativos, todavia, Akasaka *et al.* (2003) isolaram duas cepas sob condições anaeróbias. São capazes de crescer em meio basal, utilizando diversas fontes de carbono, tais como, arabinose, xilose, frutose, galactose, glicose, manose, celobiose, maltose, sacarose. Além destas, foram capazes de crescer em piruvato e lactato, e em menor intensidade em malato, fumarato e succinato. Em relação à coloração de Gram coram-se como células Gram positivas, contudo não formam endósporos (AKASAKA *et al.*, 2003). A utilização de ácido málico na composição do meio de cultura justifica a presença de tais bactérias no consórcio.

Três clones tiveram suas seqüências relacionadas com *Magnetospirillum* (97% - 98%), gênero que pertencente ao subfilo α -proteobacteria. São microrganismos que possuem metabolismo fotoheterotrófico, ou seja, consomem ácidos orgânicos simples ou aminoácidos como fonte de carbono e luz como fonte de energia (IMHOFF, 2006). Portanto, à presença de luz e ácido málico favoreceram o crescimento dessas bactérias.

As UTOs 15 e 17 compreenderam 3 e 9 clones, respectivamente, os quais foram relacionados com *Sulfurospirillum*, pertencente à família *Campylobacteraceae* e subfilo *Epsilonproteobacteria*. Tais microrganismos são capazes de utilizar ácido acético, ácido láctico e hidrogênio como doadores de elétrons no processo de redução de sulfato (KODAMA *et al.*, 2007). Nessa pesquisa, ácido acético e hidrogênio foram provenientes do metabolismo

fotoheterotrófico das bactérias púrpuras não-sulfurosas favorecendo a presença de *Sulfurospirillum*, além da presença de sulfato no meio de cultura como aceptor de elétrons.

As espécies de interesse, bactérias púrpuras não-sulfurosas, estão incluídas no filo *Proteobacteria*, sendo o mais amplo do Domínio *Bacteria*, com ampla diversidade morfológica e fisiológica. As bactérias fototróficas púrpuras não-sulfurosas estão incluídas nos subfilos α -*Proteobacteria* e β -*Proteobacteria*, enquanto as utilizadoras de compostos de enxofre (púrpuras sulfurosas), como por exemplo, *Chromatium*, pertencem ao subfilo γ -*Proteobacteria*. (IMHOFF, 2006).

A UTO 3 continha um clone semelhante a *Rhodoplanes cryptolactis*, espécie de bactéria fototrófica púrpura não-sulfurosa isolada de fonte termal a partir de florescimento de *Chloroflexus*. *Rhodoplanes cryptolactis* são bacilos Gram-negativos que se arranjam em formato de rosetas em culturas envelhecidas. Crescem preferencialmente sob condições anaeróbias consumindo ácidos orgânicos como fonte de carbono e utilizam luz como fonte de energia, ou seja, realizam metabolismo fotoheterotrófico. Os principais substratos utilizados são os seguintes: ácido pirúvico, acético, málico, succínico e butírico. Vitamina B₁₂, ácido nicotínico e ácido *p*-amino benzóico são requeridos para o crescimento (OKAMURA *et al.*, 2007). Nesse trabalho a disponibilidade de luz, a presença de ácidos orgânicos, tais como, málico; ácido nicotínico e cianocobalamina, como fatores de crescimento, podem ter favorecido o crescimento destas células.

Um clone (UTO 4) teve sua seqüência semelhante à *Rhodopseudomonas palustris*, espécie descrita na literatura como produtora de gás hidrogênio a partir de vários ácidos orgânicos, entre eles, ácido málico, utilizado no presente trabalho na etapa de enriquecimento do consórcio. A seqüência depositada no banco de dados não possui trabalho publicado.

Segundo Vincenzi *et al.* (1986), células de *Rhodopseudomonas palustris* imobilizadas em ágar, sob ciclos de luz e ausência de iluminação, foram capazes de produzir gás

hidrogênio a partir de ácido málico e glutamato de sódio (20/10 mM). As condições empregadas no presente trabalho foram direcionadas para favorecer o crescimento de tais células, uma vez que o objetivo era obter consórcio que apresentasse diversidade de bactérias fototróficas púrpuras não-sulfurosas, como por exemplo, *Rhodopseudomonas palustris*.

Os dois clones pertencentes às UTOs 5 e 6 foram semelhantes a *Rhodospirillum photometricum*, bactéria fototrófica púrpura não-sulfurosa, pertencente ao subfilo alfa-proteobacteria. Cepas semelhantes a esta espécie foram obtidas de lagoa de água doce em meio contendo ácido málico e ácido nicotínico, como doador de elétrons e fator de crescimento, respectivamente. Não há relatos na literatura sobre a produção de hidrogênio utilizando cultura pura de tal espécie, entretanto, as condições de cultivo adotadas nesse trabalho foram propícias para o crescimento dessas células (SARKAR & BANERJEE, 1980).

A UTO 10 e 12 compreenderam clones semelhantes a *Rhodobacter* (91 % de similaridade) e *Rhodobacter capsulatus*, (98 %), espécies fototróficas pertencente ao subfilo α -proteobacteria. Tais células utilizam vários ácidos orgânicos em seu metabolismo fotoheterotrófico para a produção do gás hidrogênio. Segundo Laurinavichene *et al.* (2008) *Rhodobacter capsulatus* foi capaz de usar acetato, lactato, propionato e butirato para a produção de gás H₂. No presente trabalho, provavelmente tais células foram favorecidas pela presença dos ácidos orgânicos e glutamato no meio de enriquecimento. Apesar do meio conter ácido málico, que não foi citado como substrato preferencial para estas bactérias, o mesmo é metabolizado pelos microrganismos gerando ácido acético, substrato que pode ser utilizado por essas células.

Alguns clones obtidos neste trabalho foram relacionados ao mesmo gênero *Rhodobacter* apresentado por Li *et al.* (2008). Os autores purificaram cultura de bactéria fototrófica produtora de hidrogênio a partir de sedimento de rio na presença de ácidos acético (30 mM) e butírico (30 mM), sob iluminação de 200 W/m² a 30 °C Os autores obtiveram

clones semelhantes a *Rhodobacter* sp. TCRI 14 e a *Rhodobacter sphaeroides*, entre outros. O presente trabalho também purificou o consórcio na presença de ácido málico e temperatura de 30 °C, por isso clones do mesmo gênero foram observados.

Na Figura 5.9 está representada a árvore filogenética dos clones seqüenciados para o Domínio Bacteria.

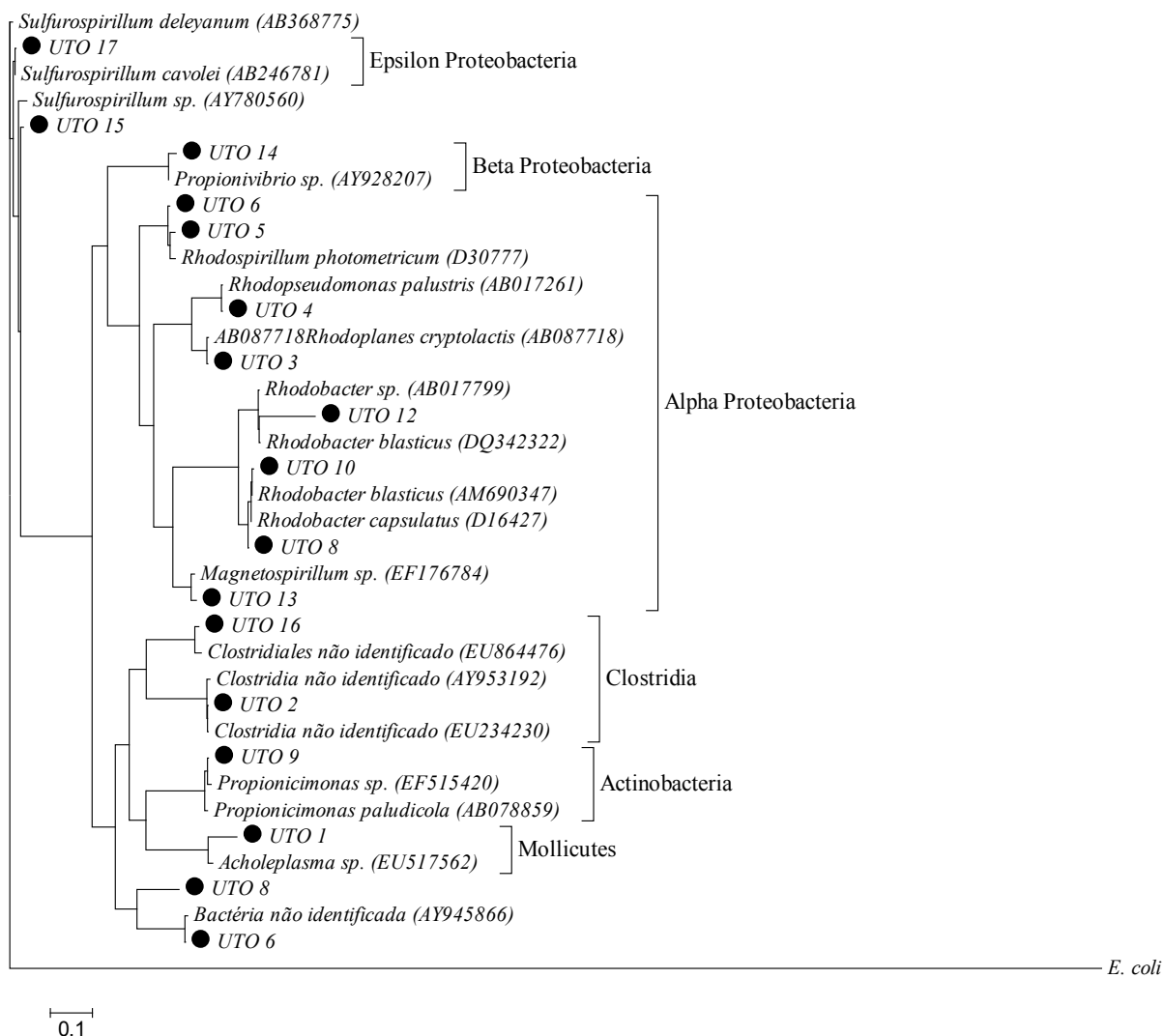


Figura 5.9: Árvore filogenética dos clones seqüenciados para o Domínio Bacteria. O número de acesso dos dados está apresentado entre parênteses após o nome da espécie. A barra de escala demonstra a distância filogenética e *E. coli* foi o outgroup escolhido.

Na Tabela 1 estão descritas as UTOs, afiliação das seqüências obtidas dos clones do consórcio fototrófico, número de acesso do GenBank e taxonomia das bactérias identificadas.

Tabela 5.5: Afiliação das seqüências obtidas dos clones do consórcio fototrófico

UTO	Similaridade	Nº de acesso do Genbank	Taxonomia	Referência
1	92 %	EU517562 <i>Acholeplasma</i> sp.	Tenericutes; Mollicutes; Acholeplasmatales; Acholeplasmatacea; <i>Acholeplasma</i>	Penner <i>et al.</i> , 2008 (não publicado)
2	100 %	AY953192 Bactéria anaeróbia não cultivada	Firmicutes; Clostridia	Von Arb <i>et al.</i> , 2008 (não publicado)
	100 %	EU234230 Bactéria não cultivada		Li <i>et al.</i> , 2007 (não publicado)
3	96 %	AB087718 <i>Rhodopseudomonas</i> <i>cryptolactis</i>	Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Hyphomicrobiaceae; <i>Rhodoplanes</i>	Okamura <i>et al.</i> , 2007
4	99 %	AB017261 <i>Rhodopseudomonas</i> <i>palustris</i>	Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Bradyrhizobiaceae; <i>Rhodopseudomonas</i>	Hamada <i>et al.</i> , 1998 (não publicado)
5 e 6	85 %	D30777 <i>Rhodospirillum</i>	Proteobacteria; Alphaproteobacteria Rhodospirillales Rhodospirillaceae <i>Rhodospirillum</i>	Kishimoto <i>et al.</i> , 1995
7 e 8	94 %	AY945866 Bactéria não cultivada	Bacteria; Não classificada	Liu <i>et al.</i> , 2006
9	89,5 %	AB078859 <i>Propionicimonas</i>	Actinobacteria; Actinobacteria;	Akasaka <i>et al.</i> , 2003
	97 %	EF515420 Bactéria não cultivada	Actinomycetales; Nocardioideaceae <i>Propionicimonas</i>	Dryden <i>et al.</i> , 2007 (não publicado)

Tabela 5.1 (Cont.): Afiliação das seqüências obtidas dos clones do consórcio fototrófico

10 e 11	98,5 %	AM690347 <i>Rhodobacter capsulatus</i>	<i>Proteobacteria;</i> <i>Alphaproteobacteria</i> <i>Rhodobacterales</i>	Srinivas <i>et al.</i> , 2007 (não publicado)
	98 %	D16427 <i>Rhodobacter capsulatus</i>	<i>Rhodobacteraceae</i> <i>Rhodobacter</i>	Hiraishi <i>et al.</i> , 1995
12	91,5 %	DQ342322 <i>Rhodobacter</i>	<i>Proteobacteria;</i> <i>Alphaproteobacteria</i> <i>Rhodobacterales</i>	Helsel <i>et al.</i> , 2007
	93 %	AB017799 <i>Rhodobacter sp.</i>	<i>Rhodobacteraceae</i> <i>Rhodobacter</i>	Inui <i>et al.</i> , 2003
13	86 %	EF176784 <i>Magnetospirillum sp.</i> não cultivado	<i>Proteobacteria;</i> <i>Alphaproteobacteria</i>	Cook <i>et al.</i> , 2007
14	90 %	AY928207 Bacteria	<i>Proteobacteria;</i> <i>Betaaproteobacteria</i> <i>Rhodocyclales</i> <i>Rhodocyclaceae</i> <i>Propionivibrio</i>	Haveman <i>et al.</i> , 2005 (não publicado)
15	92 %	AY780560 <i>Sulfurospirillum sp.</i>	<i>Proteobacteria;</i> <i>Epsilonproteobacteria</i> <i>Campylobacterales</i> <i>Campylobacteraceae</i> <i>Sulfurospirillum</i>	Duhamel & Edwards, 2006
16	100 %	EU864476 Bacteria anaerobia não cultivada	Firmicutes; Clostridia	Li <i>et al.</i> , 2008 (não publicado)
17	100 %	AB246781 <i>Sulfurospirillum cavolei</i>	<i>Proteobacteria;</i> <i>Epsilonproteobacteria</i> <i>Campylobacterales</i>	Kodama <i>et al.</i> , 2007
	99 %	AB368775 <i>Sulfurospirillum deleyianum</i>	<i>Campylobacteraceae</i> <i>Sulfurospirillum</i>	Matsumoto & Nishimura, 2007 (não publicado)

Na Figura 5.10 está apresentada a porcentagem de clones pertencentes aos diversos grupos (alfa, beta e epsilon-proteobacteria e clostridia). Trinta e cinco por cento das seqüências foram classificadas como alfa-proteobacteria, filo Proteobacteria que compreende as espécies de bactérias púrpuras não-sulfurosas. Outras seqüências (7 %) foram relacionadas com beta-proteobacteria, subfilo que também compreende espécies de bactérias fototróficas.

Clones semelhantes à epsilon-proteobacteria representaram 28 % e foram semelhantes a *Sulfurospirillum*, gênero que utiliza H₂ como doador de elétrons em seu metabolismo. Quatorze por cento dos clones foram semelhantes a *Clostridium*, bactérias fermentativas, endósporo positivas e produtoras de gás hidrogênio. De maneira geral, as condições empregadas no presente trabalho para purificação do consórcio microbiano foram adequadas, uma vez que foi obtido consórcio com ampla diversidade filogenética e fisiológica.

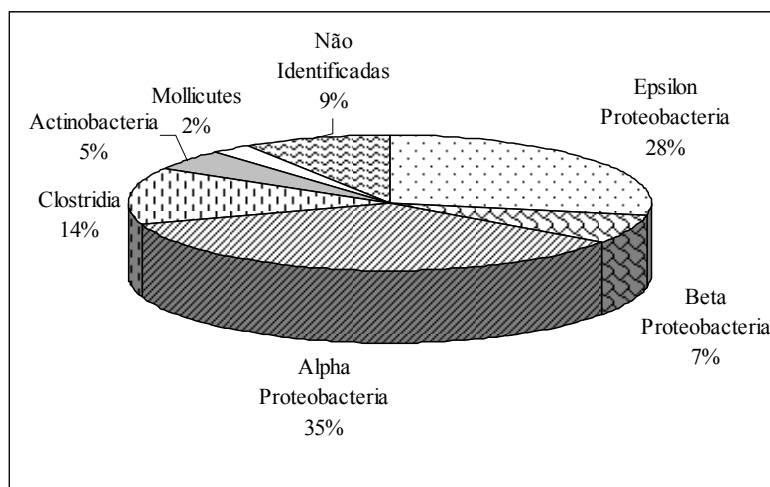


Figura 5.10: Porcentagens dos clones pertencentes aos grupos identificados no consórcio fototrófico

5.4 Avaliação do crescimento celular e consumo do substrato

O ensaio visando à obtenção da curva-padrão de crescimento foi realizado em duplicata, e a partir deste pôde-se relacionar absorvância a 660 nm aos sólidos suspensos voláteis (SSV – g/L). Os valores de SSV e A₆₆₀ estão apresentados em APÊNDICE 1. O ensaio para obter a curva-padrão de crescimento foi realizado nas mesmas condições da etapa de enriquecimento do consórcio.

A fonte de carbono foi escolhida por ser substrato universal utilizado pelas bactérias fototróficas púrpuras não-sulfurosas e, assim, não estaria selecionando nenhuma espécie em detrimento de outras. Apesar das condições escolhidas terem sido seletivas para as bactérias

de interesse, sabe-se que outros microrganismos estavam presentes. Entretanto, o comprimento de onda utilizado para quantificar o crescimento da biomassa foi específico para células de bactérias fototróficas púrpuras não-sulfurosas.

O crescimento do consórcio de bactérias fototróficas púrpuras não-sulfurosas (Figura 5.11) foi calculado conforme a equação 5.1:

$$\text{SSV (g/L)} = 0,9204 \cdot A_{660\text{nm}} + 0,0019 \quad (5.1)$$

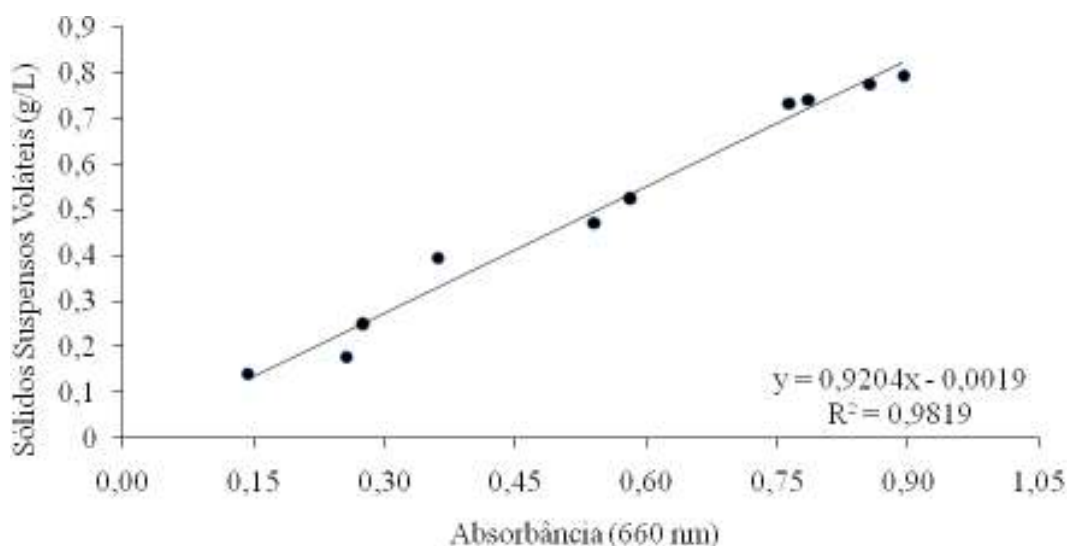


Figura 5.11: Relação entre absorbância e SSV

A concentração inicial de biomassa para todos os ensaios foi de aproximadamente 0,06 g SSV/L (Tabela 5.6). O crescimento celular foi observado nos reatores alimentados com todos os substratos utilizados como fonte de carbono (ácidos acético, butírico, cítrico, láctico e málico). Todavia, foi observado favorecimento do crescimento da biomassa naqueles reatores alimentados com ácido málico (0,06 a 0,94 g/L) e ácido láctico (0,06 a 0,98 g/L), enquanto, menor crescimento foi observado quando glutamato de sódio foi testado como única fonte de carbono e nitrogênio (0,07 a 0,44 g/L).

Nos ensaios utilizando ácido acético a concentração da biomassa variou de 0,06 g/L a 0,62 g/L em 14 dias de ensaio. O crescimento celular suportado pelo ácido butírico variou de 0,06 g/L (inicial) a 0,78 g/L (valor máximo) após 11 dias de operação. Em relação ao ácido cítrico os valores de SSV variaram de 0,07 a 0,8 g/L após 23 dias de operação. Dentre os substratos empregados nos testes o ácido cítrico foi aquele que apresentou a menor velocidade máxima de crescimento (0,054 g SSV/L.d), entretanto, o valor máximo de SSV foi similar aos obtidos nos ensaios com as outras fontes de carbono.

Tabela 5.6: Valores de SSV iniciais e máximos obtidos nos ensaios com diferentes substratos para o meio RCVB

Substratos	SSV inicial (g/L)	SSV máximo (g/L)	Tempo (d)
Ácido acético	0,06	0,62	14
Ácido butírico	0,06	0,78	11
Ácido cítrico	0,07	0,80	23
Ácido láctico	0,06	0,98	14
Ácido málico	0,06	0,94	13
Ácido glutâmico	0,07	0,44	17

Variações foram observadas nas velocidades específicas de crescimento. A maior velocidade foi observada para as células crescidas em ácido acético (0,25 g SSV/L.d), ácido butírico (0,24 g SSV/L.d), láctico (0,19 g SSV/L.d), málico (0,18 g SSV/L.d) e, por último com a menor velocidade, ácido cítrico (0,05 g SSV/L.d) (Tabela 5.7). Apesar da velocidade máxima de crescimento da biomassa ter sido menor para o ácido cítrico, este foi o único substrato que foi consumido na totalidade.

Tabela 5.7: Velocidade máxima específica de crescimento da biomassa para diferentes substratos orgânicos em meio de cultivo RCVB

Substratos	Velocidade específica de crescimento da biomassa (g SSV/L.d)
Ácido acético	0,25
Ácido butírico	0,24
Ácido cítrico	0,05
Ácido láctico	0,19
Ácido málico	0,18
Ácido glutâmico	0,04

A porcentagem de consumo dos substratos, para os ensaios realizados com meio de cultivo RCVB foram: ácido acético (25 %), butírico (34 %), cítrico (100 %), láctico (59 %) e málico (99,5 %). Esses valores foram observados após 20 dias de operação para todos os substratos, exceto para o cítrico que foi consumido em 5 dias.

A concentração inicial e final e porcentagem consumida dos substratos em meio RCVB estão apresentadas na Tabela 5.8.

Tabela 5.8: Variação das concentrações dos substratos nos ensaios com meio RCVB

Substratos	Valor inicial (mg/L)*	Valor final (mg/L)*	Consumo (mg/L e %)*	
Ácido Acético	1794±17	1348±53	446	25
Ácido Butírico	1273±18	836±55	437	34
Ácido Cítrico	3974±15	0,3±1	3974	100
Ácido Láctico	2097±102	852±404	1244	59
Ácido Málico	4076±105	20±1	4056	99,5

* Média das triplicatas

O perfil do consumo e produção de ácidos, para os diversos substratos empregados estão apresentados nas Figura 5.12 a Figura 5.21.

Quando o ácido cítrico (3.974 mg/L – 21 mmols) foi empregado como fonte de carbono, o mesmo foi consumido (aproximadamente 100 %) em 5 dias de operação, quando a concentração analisada foi menor do que os limites de detecção e quantificação (Tabela 5.8).

Ao mesmo tempo em que o ácido cítrico foi consumido, ácido acético foi gerado, atingindo valor máximo de 2.150 mg/L em 5 dias de ensaio. Ao final do ensaio (23 d) restavam 1.303 mg/L de ácido acético, assim, do total de ácido acético produzido, 39 %, foram consumidos pelos microrganismos. O crescimento celular continuou após 5 dias de ensaio, período em que não havia mais ácido cítrico disponível. Portanto, o consumo do ácido acético proveniente da utilização do ácido cítrico foi responsável para manutenção do crescimento celular e produção de hidrogênio. Outros intermediários, tais como, ácido butírico (35 mg/L), málico (24 mg/L), propiônico (47 mg/L) e succínico (56 mg/L) foram gerados em menores concentrações e, por isso, não estão apresentados na Figura 5.12.

Em relação ao crescimento celular nos reatores com ácido cítrico, o valor de SSV variou de 0,07 g/L (inicial) a 0,8 g/L após 23 dias de operação, com velocidade máxima específica de crescimento de 0,054 g SSV/L.d. Apesar do valor máximo de SSV ser similar aos obtidos para os outros substratos, tal valor foi atingido após 23 dias de incubação do consórcio, período maior do que os obtidos para os outros ácidos utilizados como fonte de carbono (Figura 5.12).

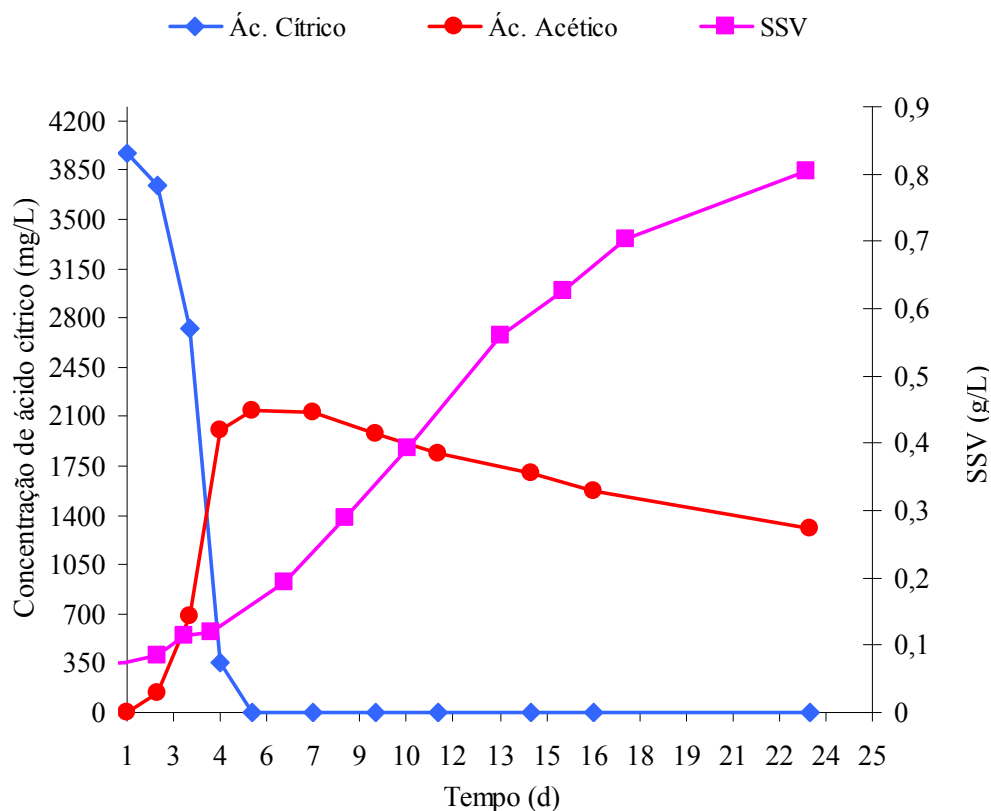


Figura 5.12: Variação temporal do crescimento do consórcio fototrófico, consumo ácido cítrico e produção de ácido acético em meio RCVB

A maioria das bactérias fotossintéticas não é capaz de utilizar ácido cítrico como fonte de carbono. Entretanto, *Rhodospseudomonas gelatinosa*, foi capaz de crescer na presença de luz e atmosfera anaeróbia utilizando esse substrato como única fonte de carbono. A enzima que realiza a catálise da reação de lise da molécula de citrato, citrato liase, é aparentemente inativa sob condições aeróbias, resultando na incapacidade destes microrganismos de utilizá-lo aerobiamente (CLAYTON & SISTROM, 1978).

A citrato liase degrada tal substrato de maneira rápida e descontrolada que resulta no acúmulo de produtos, como por exemplo, ácido acético e málico. Após consumo total do citrato, pôde-se observar ainda crescimento celular, o qual foi suportado pela utilização dos produtos gerados durante a sua degradação. Esta fase de consumo dos subprodutos pode ser

precedida de uma fase *lag*, que é o tempo que as células necessitam para produzir as enzimas responsáveis pela catálise dos subprodutos (CLAYTON & SISTROM, 1978). No presente trabalho foi observado esse mesmo comportamento; ou seja, consumo de citrato e geração de ácido acético.

Segundo Giffhorn *et al.*, (1972) citrato liase é rapidamente inativada depois que o ácido cítrico não está mais disponível no meio de cultura, fato que é essencial para que ocorra o consumo dos produtos gerados. Além disso, deve ocorrer a ativação da enzima citrato sintase, a qual é responsável pela síntese de citrato, que é o primeiro intermediário do ciclo dos ácidos tricarboxílicos, o mesmo ciclo que será responsável pela degradação do acetato e malato.

Nos reatores alimentados com ácido málico (4.076 mg/L – 30 mmols/L) em meio RCVB, o consórcio microbiano foi capaz de consumir 99,5 % do substrato disponível em 23 dias de operação. Durante o consumo do ácido málico foram gerados ácido acético (435 mg/L – 7,25 mmols/L) e ácido succínico (1.700 mg/L – 14,2 mmols/L) (Figura 5.13). Tais ácidos não foram consumidos durante o período de operação, talvez porque não houve consumo total do ácido málico, como ocorreu para o ácido cítrico, citado anteriormente. Outros intermediários, tais como, ácido cítrico (10,1 mg/L) e ácido láctico (87,7 mg/L) foram observados em menores concentrações.

A velocidade máxima específica de crescimento na presença de ácido málico foi de 0,18 g SSV/L.d. O valor de SSV inicial e máximo, após 17 dias de operação, foram de 0,6 g/L e 0,94 g/L, respectivamente. A maior variação dentre os valores de SSV foi observada para este substrato, fato que já era esperado uma vez que ele foi o substrato utilizado nas etapas de purificação do consórcio.

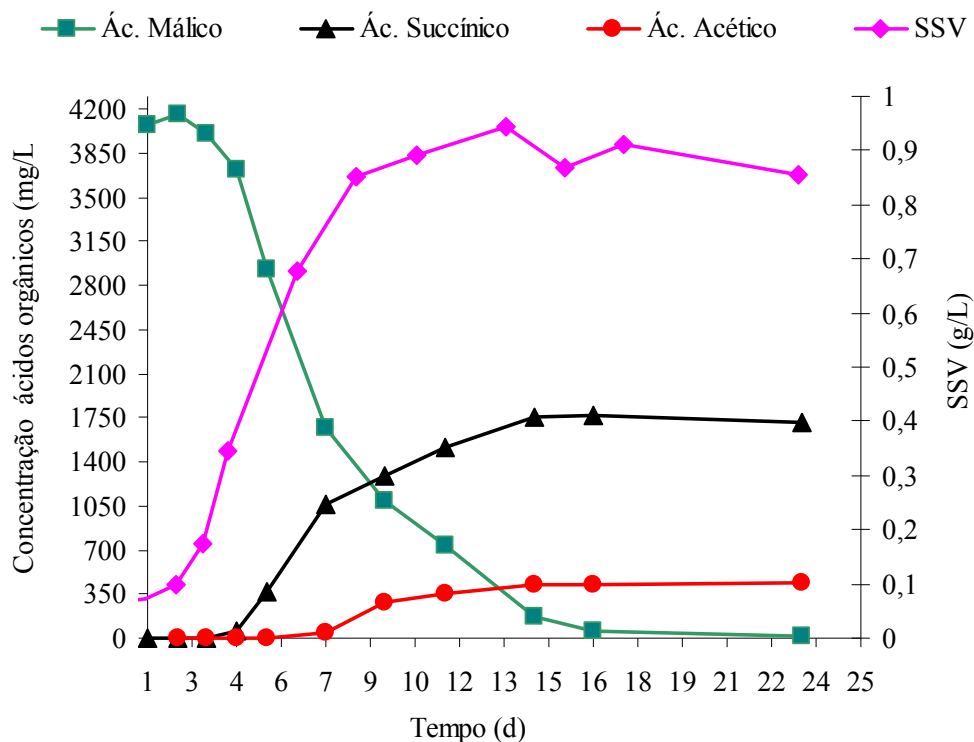


Figura 5.13: Variação temporal do crescimento do consórcio fototrófico, consumo de ácido málico e produção dos ácidos acético e succínico em meio RCVB

No ensaio com ácido butírico a concentração inicial foi 1.273 mg/L (14,5 mmols/L), dos quais restaram 836 mg/L (9,5 mmols/L) após 23 dias de operação (consumo 34 %). Nesse ensaio, foi gerado ácido acético cujo valor máximo foi de 272 mg/L em 7 dias de operação. Ao final de 16 dias, restavam 229 mg/L de ácido acético, totalizando seu consumo em 15 %. Diferente dos ensaios mencionados anteriormente, nesse caso, o intermediário gerado, ácido acético, foi consumido enquanto ainda havia ácido butírico disponível. O valor inicial de SSV foi de 0,06 g/L e atingiu valor de 0,78 g/L em 11 dias de operação. A velocidade máxima específica de crescimento foi de 0,24 g SSV/L.d (Figura 5.14).

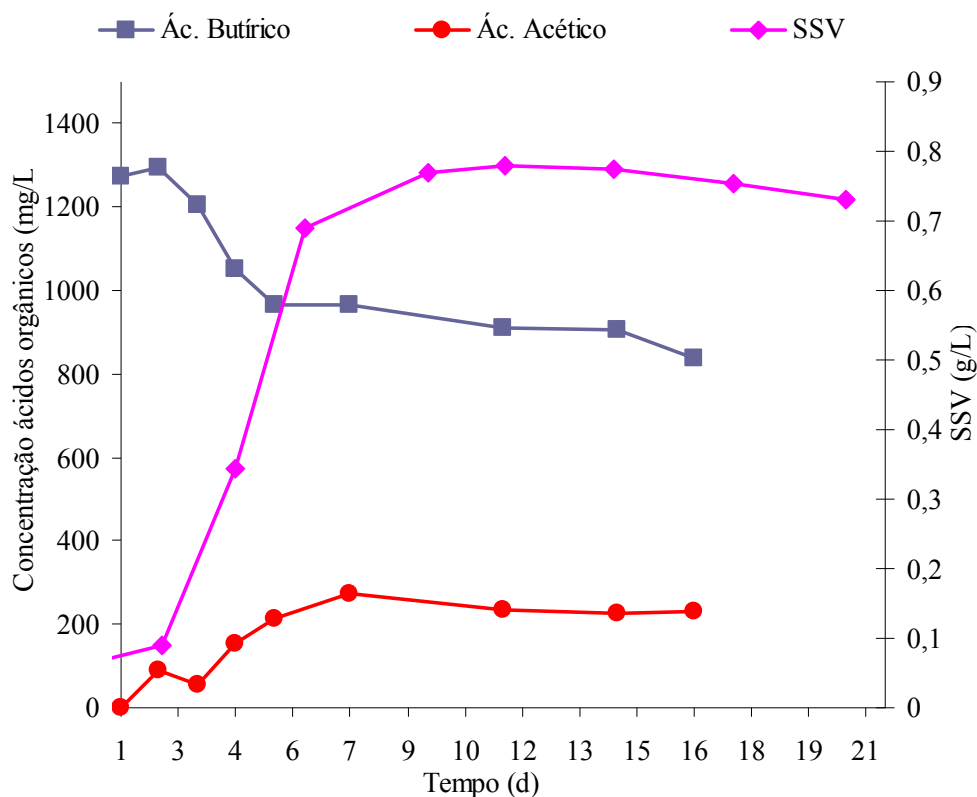


Figura 5.14: Variação temporal do crescimento do consórcio fototrófico, consumo do ácido butírico e produção de ácido acético em meio RCVB

Outro substrato utilizado foi o ácido láctico, que também não foi completamente consumido. Nos ensaios foi utilizada concentração inicial de 2.097 mg/L (23 mmols/L). Após 21 dias de operação restaram 1.244 mg/L (13,8 mmols/L), totalizando consumo de 59 %. Concomitante com o consumo do ácido láctico ocorreu geração e consumo de ácido acético. O valor máximo de ácido acético produzido foi de 150 mg/L em 10 dias de operação, dos quais restaram 60 mg/L após 21 dias (Figura 5.15). O valor inicial, SSV foi de 0,06 g/L e atingiu valor máximo de 0,98 g/L após 14 dias de operação. A velocidade máxima de crescimento para este substrato foi de 0,19 g SSV/L.d.

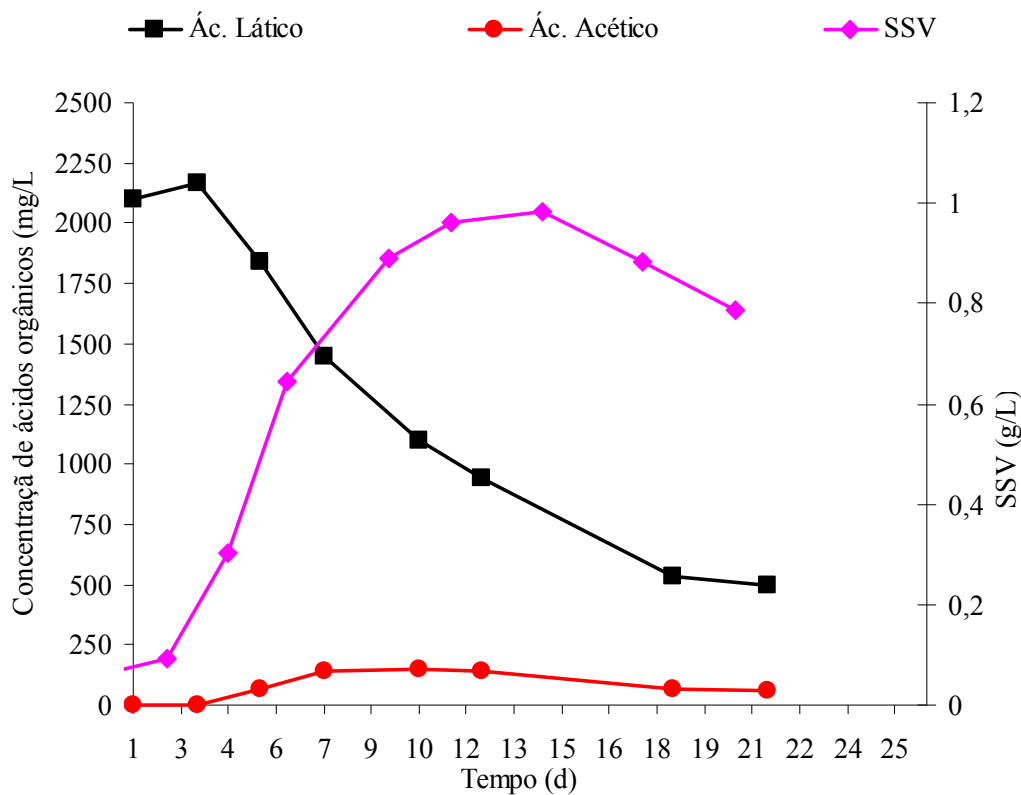


Figura 5.15: Variação temporal do crescimento do consórcio fototrófico, consumo de ácido láctico e produção de ácido acético em meio RCVB

Em relação ao ensaio com ácido acético foi utilizada concentração inicial de 1.794 mg/L (30 mmols/L). Após 21 dias de operação foi observado 1.348 mg/L (22,5 mmols/L), portanto consumo de 25 %. Sob tais condições foi constatado o menor consumo em relação os demais substratos avaliados nesse trabalho (Figura 5.16). O valor inicial de SSV foi de 0,06 g/L atingindo concentração máxima de 0,6 mg/L após 14 dias de operação.

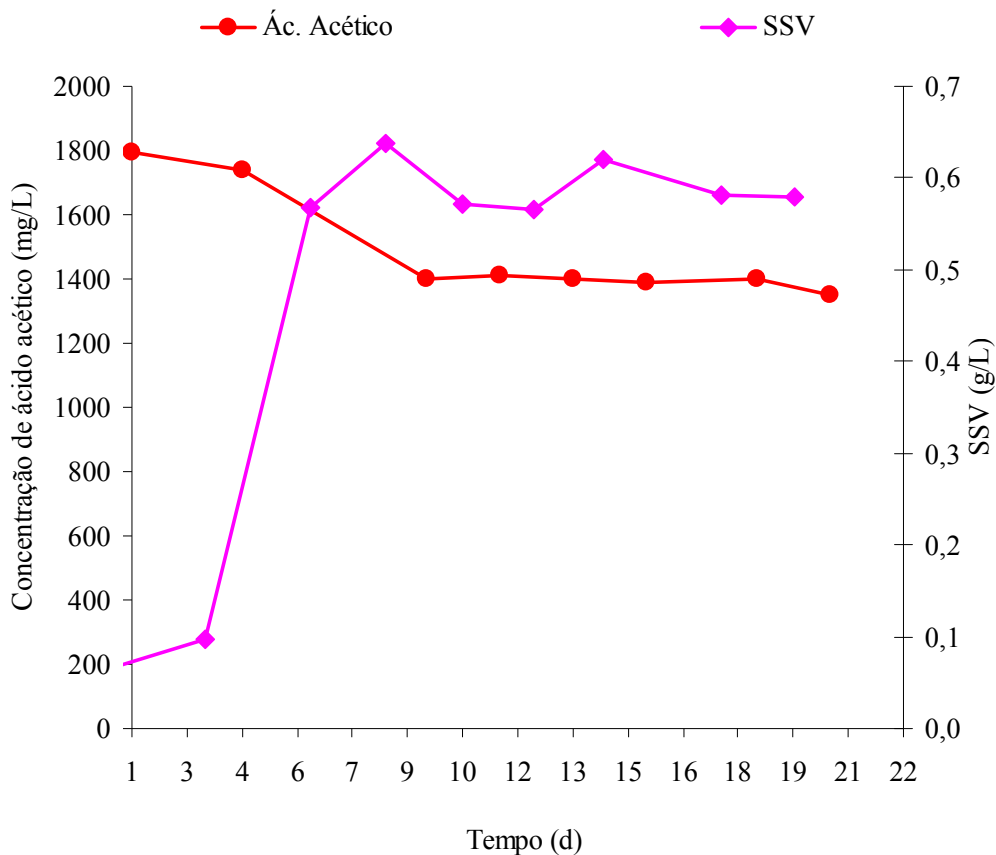


Figura 5.16: Variação temporal do crescimento do consórcio fototrófico e consumo de ácido acético em meio RCVB

O crescimento celular foi favorecido em ácido málico, entretanto, foi observado aumento da biomassa para todos os substratos.

Na primeira série de experimentos, realizados em meio de cultivo RCVB, o ácido acético gerado só foi consumido quando o substrato empregado foi totalmente consumido, como por exemplo, no ensaio com ácido cítrico.

Nos ensaios em meio de cultivo Fang *et al.* (2005), o crescimento da biomassa também foi observado para todos os substratos citados (Tabela 5.9).

O valor inicial de SSV para os reatores alimentados com ácido acético em meio FANG foi 0,09 g/L e atingiu valor máximo de 0,94 g/L após 28 dias de operação. Para os reatores suplementados com ácido butírico o valor inicial de SSV foi 0,18 g/L e atingiu valor máximo

após 28 dias de operação com SSV igual a 1,1 g/L. Para o ácido cítrico, a variação no valor de SSV foi de 0,13 a 0,56 g/L, após 21 dias de operação. O valor inicial e máximo de SSV na presença de ácido láctico foi de 0,14 e 0,74 g/L, respectivamente. Para os ensaios realizados com ácido málico as concentrações foram, respectivamente, 0,17 g/L e 0,47 g/L.

Tabela 5.9: Valores de SSV iniciais e máximos obtidos nos ensaios com diferentes substratos para o meio FANG

Substratos	SSV inicial (g/L)	SSV máximo (g/L)	Tempo (d)
Ácido acético	0,09	0,94	28
Ácido butírico	0,18	1,1	28
Ácido cítrico	0,13	0,56	21
Ácido láctico	0,14	0,74	11
Ácido málico	0,17	0,47	28

A velocidade específica de crescimento observada para as células crescidas em meio RCVB (0,04 a 0,25 g SSV/L.d, Tabela 5.7) foram similares as observadas para o crescimento em meio FANG (0,04 a 0,21 g SSV/L.d, Tabela 5.10).

Tabela 5.10: Velocidades máximas específicas de crescimento da biomassa para diferentes substratos orgânicos em meio de cultivo FANG

Substratos	Velocidade específica de crescimento da biomassa (g SSV/L.d)
Ácido acético	0,05
Ácido butírico	0,13
Ácido cítrico	0,05
Ácido láctico	0,21
Ácido málico	0,04

Para ambos os ensaios, em meio FANG e RCVB, o volume de inóculo foi o mesmo (10% v/v). Todavia, os valores iniciais de SSV para os experimentos realizados utilizando-se o meio de cultivo FANG foram maiores (média de 0,14 g SSV/L) do que aqueles observados para o meio RCVB (média de 0,06 g SSV/L). Isto porque, a biomassa utilizada para os testes

com meio FANG foram previamente cultivadas em meio RCVB. Entretanto, não se observou diferença significativa nos valores finais de SSV em ambos os ensaios. Os valores médios em diferentes substratos foram 0,762 e 0,82 g SSV/L para ensaios em meio FANG e RCVB, respectivamente.

Não se pode falar qual foi a melhor condição empregada nos ensaios sem pontuar os critérios que devem ser levados em consideração. Em relação ao crescimento celular, o meio de cultivo RCVB foi, em geral, o que proporcionou maior crescimento da biomassa (SSV) e as maiores velocidades máximas de crescimento, o que talvez possa estar relacionado com o menor valor de SSV observado nestes ensaios, pois por tratar-se de uma cultura frototrófica a menor concentração de sólidos proporcionaria maior passagem de luminosidade, estimulando o crescimento das células. Entretanto, para a produção do gás hidrogênio e consumo dos ácidos orgânicos o meio FANG mostrou-se mais favorável, o que pode ser devido ao mesmo motivo.

A concentração inicial e final dos substratos em meio FANG, porcentagem consumida e desvio-padrão estão apresentados na Tabela 5.11.

Tabela 5.11: Variação das concentrações dos substratos nos ensaios com meio FANG

Substratos	Valor inicial (mg/L)*	Valor final (mg/L)*	Consumo (mg/L e %)*	
Ácido Acético	1814±62	1309±44	775	43
Ácido Butírico	1518±21	955±127	563	37
Ácido Cítrico	2094±17	<LD**	2094	100
Ácido Lático	2088±0	1071±61	1017	59
Ácido Málico	1939±64	<LD**	1939	100

* Média das duplicatas

** Limite de detecção

Para o meio de cultivo descrito por Fang *et al.* (2005), suplementado com ácido cítrico (2.094 mg/L – 10,9 mmols/L) ocorreu consumo total após 4 dias de operação. A quantidade de ácido acético gerada alcançou 1 g/L e após 25 dias de operação, restaram apenas 600 mg/L (consumo 40 %). O perfil do ácido acético apresentou o mesmo comportamento do ensaio

realizado com o meio RCVB, pois o valor máximo de ácido produzido coincidiu com o momento em que não havia mais ácido cítrico disponível. Após o consumo do substrato, o ácido acético gerado foi consumido pelo consórcio microbiano. O valor de SSV inicial foi de 0,13 g/L e alcançou 0,56 g/L após 21 dias de operação (Figura 5.17).

Em ambos os ensaios (RCVB e FANG) ácido acético produzido pôde ser utilizado, tanto para a produção de gás hidrogênio como para o crescimento, uma vez que o ácido cítrico já havia sido consumido, enquanto continuaram o crescimento celular e produção do gás hidrogênio.

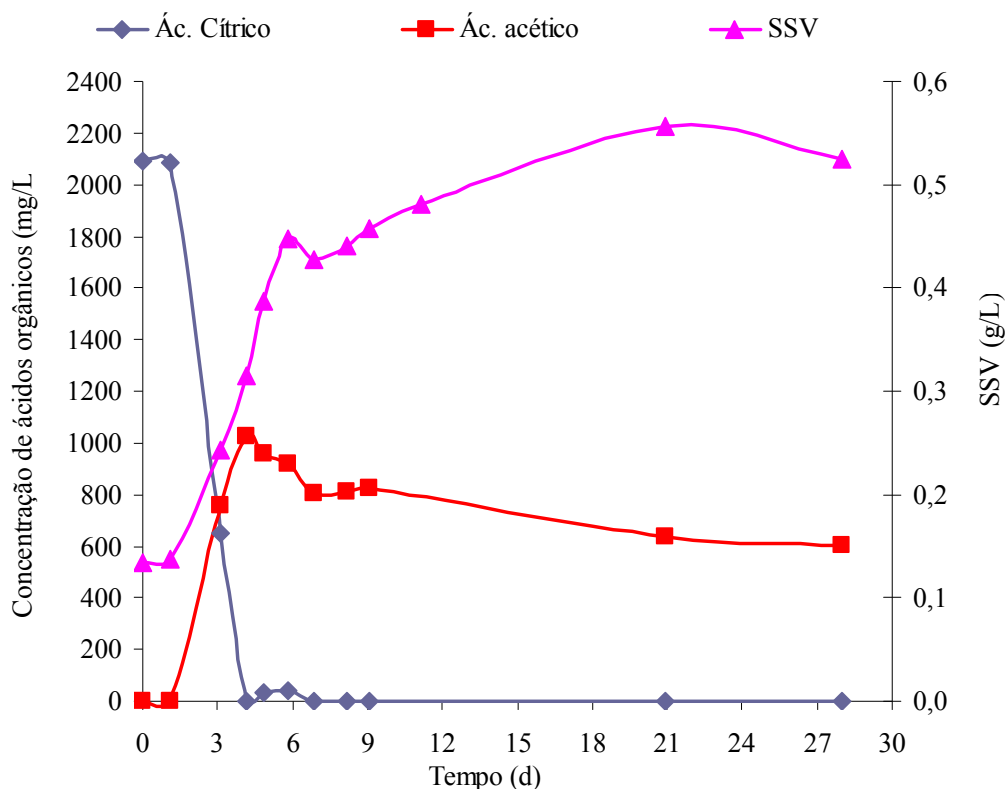


Figura 5.17: Variação temporal do crescimento do consórcio fototrófico, consumo de ácido cítrico e produção de ácido acético em meio FANG

Ácido málico (1.939 mg/L – 14,5 mmols/L) foi consumido em sua totalidade após 21 dias de operação, enquanto, ácido acético (195 mg/L), ácido propiônico (389 mg/L) e

ácido succínico (362 mg/L) foram gerados (Figura 5.18). Entretanto, tais ácidos também foram consumidos, e os valores finais para cada um deles foram de 135 mg/L, 310 mg/L e 204 mg/L, respectivamente. O valor máximo de SSV foi de 0,46 g/L observado após 28 dias de operação, sendo o valor inicial de 0,17 g/L.

A presença de clones com seqüências semelhantes à *Propionicimonas*, pode explicar a geração dos ácidos acético, succínico e propiônico, neste ensaio; uma vez que, tais células podem gerar os ácidos citados na presença de cianocobalamina (vitamina B₁₂) adicionada ao meio de cultivo FANG.

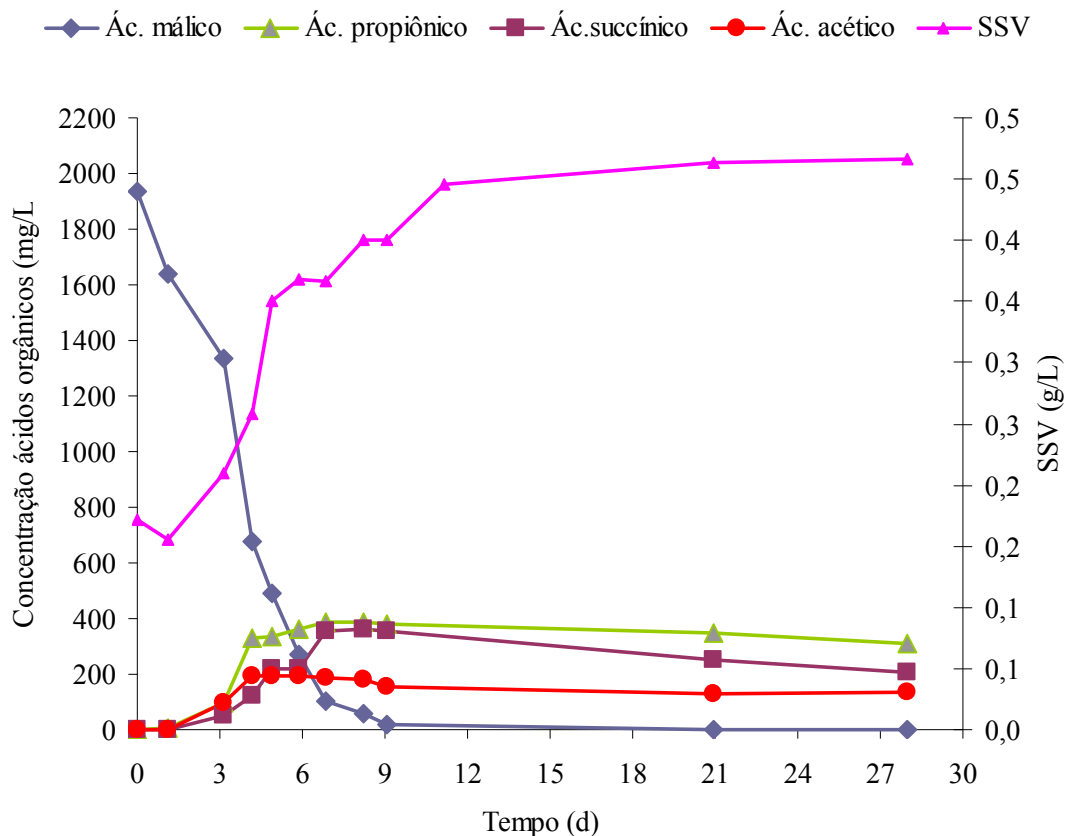


Figura 5.18: Variação temporal do crescimento do consórcio fototrófico, consumo de ácido málico e produção dos ácidos acético e succínico em meio FANG

A concentração inicial de ácido butírico foi de 1518 mg/L (17 mmols/L), e a final foi de 955 mg/L. Assim, a porcentagem do substrato consumido foi 37 %, no ensaio realizado

com meio de cultivo FANG (Tabela 5.11). O consumo foi acompanhado da produção de ácido acético, que alcançou valor máximo de 232 mg/L em 28 dias de operação. O valor inicial e máximo de SSV foram, respectivamente 0,18 g/L e 1,1 g/L após 28 dias de operação (Figura 5.19).

Fang *et al.* (2005) avaliaram o consumo de ácido butírico em diferentes concentrações (1.000 – 5.100 mg/L). As porcentagens de consumo foram 67,6 a 76,4 %. Tais valores são maiores do que aqueles obtidos neste trabalho (37 %). Entretanto, cabe ressaltar que o trabalho citado foi realizado por cultura pura de *Rhodobacter capsulatus*.

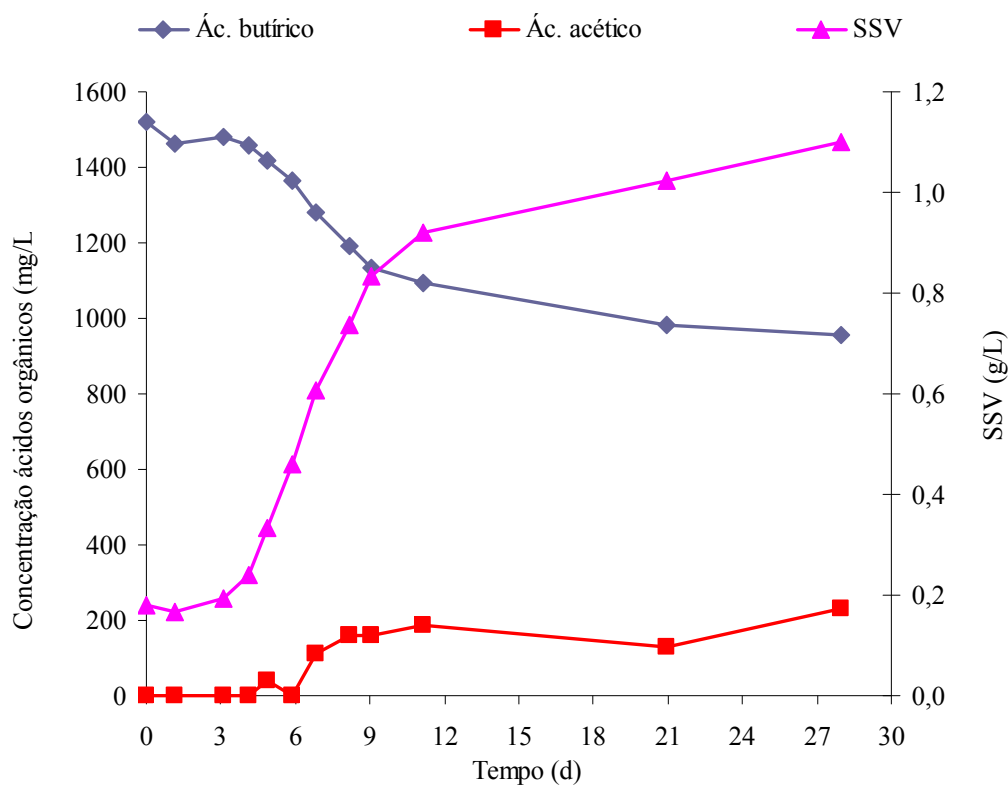


Figura 5.19: Variação temporal do crescimento do consórcio fototrófico, consumo de ácido butírico e produção de ácido acético em meio FANG

O consumo de ácido láctico atingiu 48,7 %, em 28 dias de operação (Tabela 5.11), concomitante com a produção crescente de ácido acético, que era de 47,15 mg/L em 6 dias e

alcançou valor de 214,26 mg/L em 28 dias (Figura 5.20). O valor de SSV inicial e máximo foram de 0,14 g/L e 0,74 g/L, respectivamente, após 11 dias de operação (Tabela 5.9).

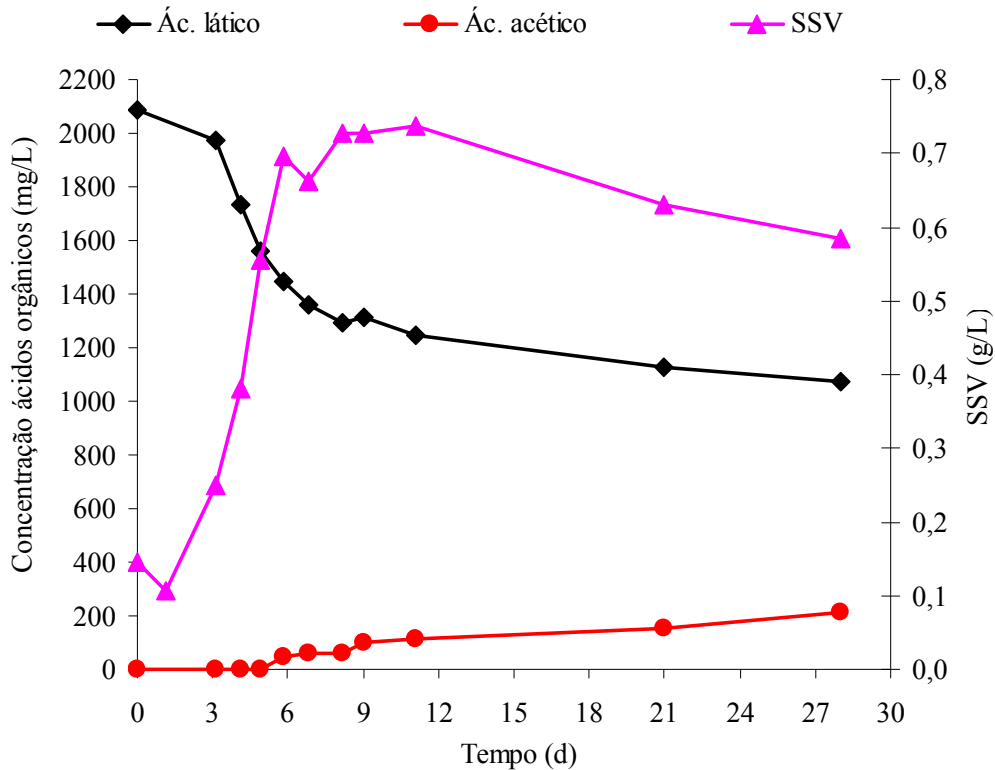


Figura 5.20: Variação temporal do crescimento do consórcio fototrófico, consumo de ácido láctico e produção de ácido acético em meio FANG

O crescimento da biomassa nos ensaios realizados em meio de cultivo FANG utilizando como substrato o ácido acético foi de 0,09 a 0,94 g SSV/L em 28 dias (Tabela 5.9). A parcela de ácido acético consumido foi de 44 %, para concentração inicial de 2500 mg/L em meio FANG (Tabela 5.11), enquanto o consumo para o meio RCVB foi de 25 % (Tabela 5.8). A variação do consumo e produção dos ácidos estão apresentadas na Figura 5.21.

Fang *et al.* (2005) utilizaram cultura fototrófica de *Rhodobacter capsulatus* e observaram que para concentrações variando de 800 a 1700 mg/L de ácido acético, o substrato foi totalmente consumido, todavia, não ocorreu degradação completa do mesmo

para concentrações iniciais de 2500, 3200 e 4000 mg/L, da mesma forma que observamos no presente trabalho.

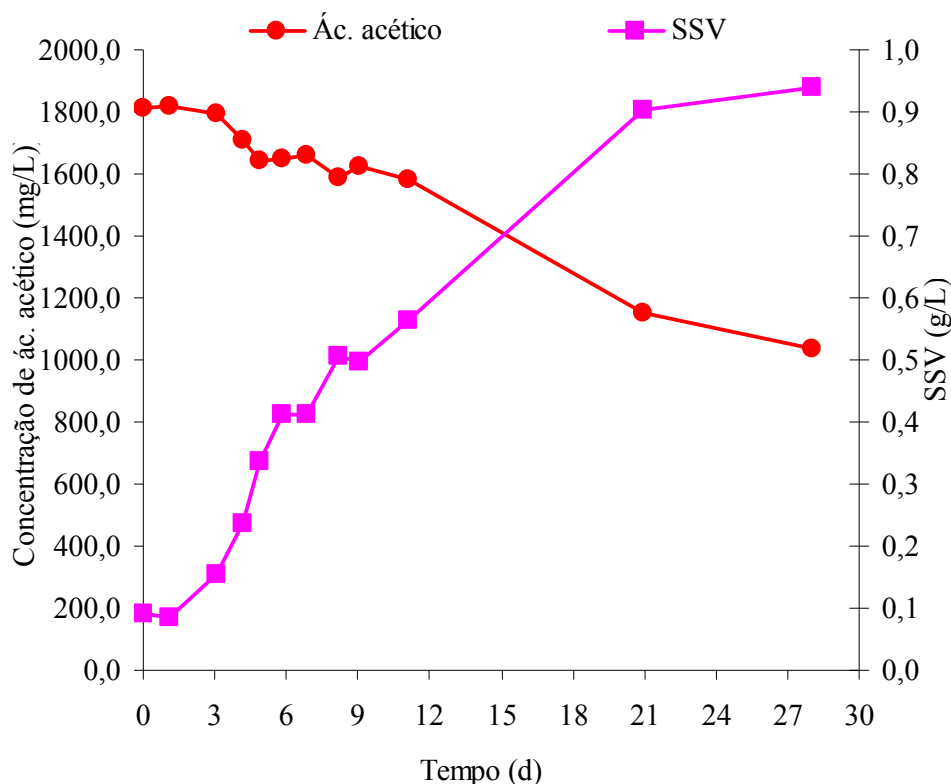


Figura 5.21: Variação temporal do crescimento do consórcio fototrófico e consumo de ácido acético em meio FANG

A porcentagem de consumo dos ácidos orgânicos observadas nos ensaios realizados com meio RCVB e FANG foram similares; ou seja, variou de 25 %, para ácido acético em meio RCVB, até o consumo total de ácido cítrico em meio RCVB e FANG. O maior consumo foi observado para o ácido cítrico (100 %) nos dois meios de cultura. O menor consumo foi observado para o ácido acético, que foi consumido em menor porcentagem (25 %) no meio RCVB e 44 % em meio FANG. O consumo de ácido málico foi aproximadamente 100 %, entretanto, o período necessário para tal consumo foi maior do que o observado para o ácido cítrico, o que pode ser explicado pelo fato do ácido cítrico ser o primeiro intermediário do ciclo de Krebs, responsável pelo metabolismo de tais ácidos.

O perfil do consumo do glutamato de sódio não pôde ser observado, pois o método empregado para a análise dos substratos, não detectou tal substância. Li e Fang (2008) utilizaram o mesmo substrato, porém, também não conseguiram quantificá-lo por cromatografia.

5.5 Produção do gás hidrogênio

Li e Fang (2008) utilizaram cultura pura de *Rubrivivax gelatinosus* em experimentos com diferentes substratos, dentre eles glicose, sacarose, amido, lactato e malato, que foram utilizados no metabolismo microbiano e possibilitaram a produção de hidrogênio. Todavia, quando acetato, propionato, butirato, succinato e glutamato foram adicionados ao meio, não ocorreu produção do gás.

No presente trabalho a produção do gás hidrogênio foi detectada nos reatores alimentados com todos os substratos citados. Exceto, para o glutamato de sódio, que possibilitou o crescimento celular, todavia, a produção do gás não foi observada. Como trata-se de um consórcio, provavelmente, os diferentes substratos utilizados para a produção do gás hidrogênio foram utilizados para crescimento das diferentes espécies

Segundo a equação teórica descrita abaixo (Equação 5.1) o número de mols de gás hidrogênio gerado, será dependente do substrato empregado no processo (KOKU *et al.*, 2002). Para tanto, descreveu-se as equações de conversão para cada substrato usado nesse trabalho (Tabela 5.12).

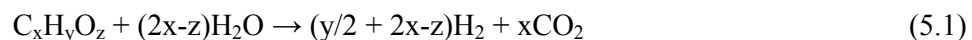


Tabela 5.12: Equações teóricas da conversão dos ácidos orgânicos em hidrogênio e gás carbônico propostas a partir de equação hipotética

Substrato	Equação teórica	
Ácido acético	$C_2H_4O_2 + 2H_2O \rightarrow 4H_2 + 2CO_2$	(5.3)
Ácido butírico	$C_4H_8O_2 + 6H_2O \rightarrow 10H_2 + 4CO_2$	(5.4)
Ácido cítrico	$C_6H_8O_7 + 5H_2O \rightarrow 9H_2 + 6CO_2$	(5.5)
Ácido láctico	$C_3H_6O_3 + 3H_2O \rightarrow 6H_2 + 3CO_2$	(5.6)
Ácido málico	$C_4H_6O_5 + 3H_2O \rightarrow 6H_2 + 4CO_2$	(5.7)

Fonte: Koku *et al.* (2002)

O gás hidrogênio foi quantificado em todos os reatores, alimentados com meio RCVB e FANG. Nos primeiros testes, utilizando meio RCVB, as concentrações foram as seguintes: 1,7 mmol H₂/L para ácido acético; 3,1 mmol H₂/L para ácido butírico; 3,5 mmol H₂/L para ácido málico; 3,9 mmol H₂/L para ácido láctico; e 12,57 mmol H₂/L para o ácido cítrico.

Nesses experimentos, o gás pode ser detectado no *headspace* após três dias de operação e a produção observada em até 20 dias aproximadamente, quando estagnou e posteriormente foi também consumido. As eficiências de conversão dos substratos em gás H₂ não foram calculadas para os ensaios com o meio de cultivo RCVB, pois a produção do gás não foi estável.

Para os ensaios realizados utilizando-se o meio de cultivo FANG, a produção do gás hidrogênio começou após dois dias de incubação e atingiu a estabilização após, aproximadamente, 25 dias. Os valores máximos de gás hidrogênio foram os seguintes: 11,6 mmol/L para ácido acético; 13,8 mmol/L para ácido butírico; 12,6 mmol/L para ácido cítrico; 8,5 mmol/L para ácido láctico e 21, 8 mmol/L para ácido málico (Figura 5.22).

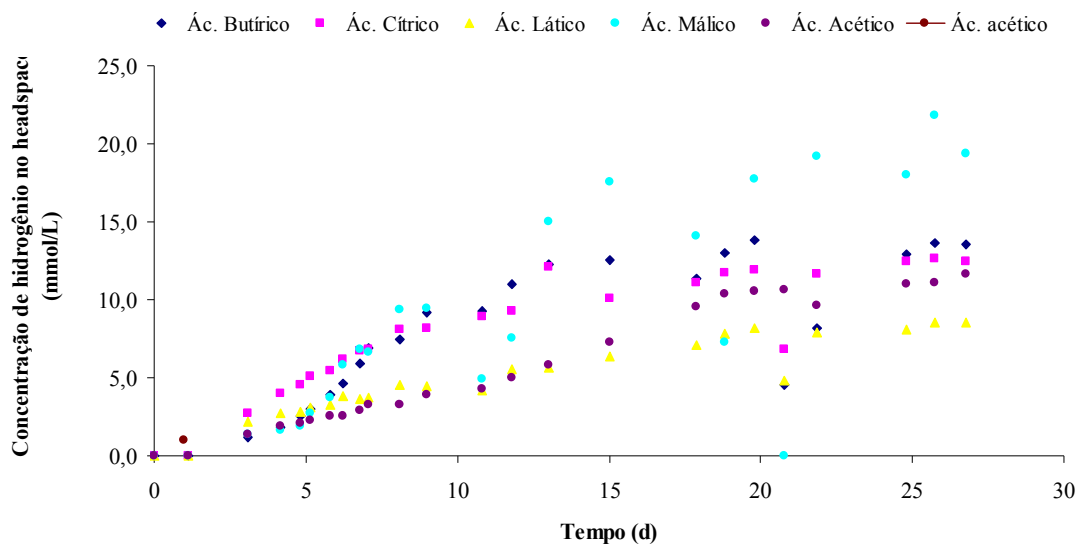


Figura 5.22: Produção do gás hidrogênio para os diferentes substratos em meio FANG

Os valores de gás hidrogênio, em mmol, quantificados nesses ensaios (FANG) foram maiores do que os observados nos ensaios com o meio de cultura RCVB. Esse fato que pode ser explicado, pela presença de citrato de ferro na composição do meio FANG e sua ausência na composição do meio de cultivo RCVB. Segundo, Zhu *et al.* (2007) a produção de hidrogênio por *Rhodobacter sphaeroides* é significativamente suprimida quando a concentração de Fe^{2+} é limitante. Isso é justificado porque muitos dos carregadores de elétrons, incluindo os citocromos e ferredoxina, que participam do metabolismo fototrófico, possuem esse elemento na sua estrutura. O gênero *Rhodobacter* foi encontrado nas análises moleculares do presente trabalho.

A comparação entre os valores de produção do gás H_2 entre os trabalhos publicados se torna difícil uma vez que não há consenso nas unidades utilizadas. Entretanto, na sua totalidade, os valores das concentrações de gás hidrogênio no *headspace* observadas no presente estudo foram menores do que os valores apresentados na literatura. A constatação da produção de hidrogênio, em menores proporções em relação às observadas na literatura,

também foi observada por Andrade (2007), após a obtenção de cultura purificada de *Rhodopseudomonas palustris*, utilizando como substratos ácido acético e glutamato de sódio.

Nos reatores alimentados com ácido cítrico, a produção do gás hidrogênio foi menor do que a teórica. De acordo com a quantidade de substrato disponível (21 mmols) a produção teórica máxima seria 189 mmol H₂, se todo o substrato fosse convertido a gás carbônico e hidrogênio. Entretanto, observou-se geração de diversos ácidos intermediários, dentre eles, ácido acético (1.303 mg/L – 22 mmols/L), ácido butírico, málico, ácido propiônico e ácido succínico, que são responsáveis pela redução da geração do gás hidrogênio.

Nos reatores alimentados com ácido cítrico houve oscilação da produção de hidrogênio, que pode ser explicada pelo consumo do gás pelos microrganismos presentes no consórcio. Segundo Kelley *et al.* (1977), *Rhodobacter capsulatus* utilizou, após o consumo do lactato, o hidrogênio previamente produzido.

Além disso, o fato de existirem outros microrganismos presentes no consórcio pode explicar a variação na produção do gás hidrogênio. Microrganismos identificados como pertencentes ao gênero *Sulfurospirillum*, podem consumir o hidrogênio. Segundo Finster *et al.* (1997), *Sulfurospirillum arcachonense*, pode utilizar para seu crescimento muitos doadores de elétrons, entre eles, hidrogênio, acetato, lactato, glutamato, fumarato, succinato, malato, citrato. No presente trabalho, foi identificada bactéria semelhante a *Sulfurospirillum*. A presença de tais microrganismos pode ter sido responsável pela oscilação na produção do gás H₂ ou pelo consumo dos substratos.

O consumo do substrato nos reatores alimentados com ácido acético não foi total. Caso todo o substrato fosse totalmente consumido (30,24 mmol/L), a produção teórica de gás hidrogênio seria 121 mmol/L. Todavia, o consumo de ácido acético foi de apenas 775,3 mg/L, que corresponde a 12,9 mmol/L. De acordo com a Equação 5.3, a produção teórica de H₂

esperada é de 51,6 mmol/L, ou seja, cada mol de ácido acético gera 4 mols de H₂. Contudo, o valor observado foi de 11,6 mmol/L de H₂, que corresponde a 22,5 % da conversão teórica.

Segundo Stainer *et al.* (1959) o carbono do acetato é preferencialmente assimilado e armazenado na forma de polímero, poli-beta-hidroxibutirato pelas bactérias fototróficas púrpuras não-sulfurosas do que convertido a H₂ e CO₂, o que pode explicar a reduzida produção de gás na presença deste substrato.

Kars *et al.* (2009) estudaram células de *Rhodobacter sphaeroides* O.U. 001 com acetato (30 mM) e observaram eficiência de conversão do substrato em hidrogênio de 4,6 %. Segundo os autores, esse substrato pode servir como fonte de carbono para o crescimento celular de *Rhodobacter sphaeroides*, enquanto outros substratos são mais apropriados para a produção de gás H₂ por tais células.

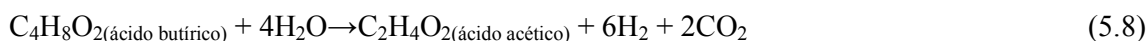
A possível explicação para obtenção de maior eficiência de conversão de ácido acético em H₂, em relação ao trabalho de Kars *et al.* (2009), pode residir no fato que o ácido acético pode ser metabolizado por meio de diferentes rotas metabólicas pelas bactérias fototróficas púrpuras. Por exemplo, *Rhodobacter sphaeroides*, não metaboliza o ácido acético via ciclo do glioxalato, como muitas espécies o fazem, uma vez que, não possuem o gene que codifica duas enzimas chaves deste ciclo, isocitrato liase e malato sintase.

É proposto que tal espécie metaboliza ácido acético via etilmalonil coenzima A, rota que possui algumas desvantagens em relação à via glioxalato. No consórcio utilizado no presente trabalho, várias espécies de bactérias fototróficas estavam presentes e podem ter metabolizado tal substrato, via ciclo do glioxalato, justificando a maior eficiência de conversão (KARS *et al.*, 2009).

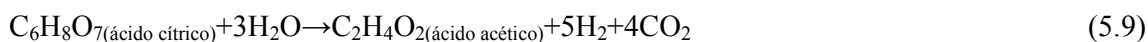
A concentração inicial de ácido butírico foi 1.518 mg/L (17,25 mmol/L) e se ocorresse consumo total, o valor de hidrogênio produzido, seria 172,5 mmol de H₂/L (Equação 5.4). Entretanto, somente 562,6 mg/L (6,4 mmol/L) foram utilizados pelos microrganismos. Assim,

de acordo com a parcela de substrato consumida a concentração de gás hidrogênio teórica esperada, se o substrato fosse completamente mineralizado, era de 64 mmol/L, contudo deve-se considerar a geração de ácido acético (3,9 mmol/L) (Equação 5.8).

Pode-se observar que de acordo com a equação teórica, 1 mol de ácido butírico consumido gera 10 mols de gás hidrogênio, entretanto, quando algum intermediário é produzido, este valor é menor, e no caso da geração do ácido acético o valor fica reduzido para 6 mols de H₂ (Equação 5.8). Assim, a concentração esperada é menor (48,4 mmol/L). O valor observado foi de 13,84 mmol/L, que corresponde a 28,6 % da conversão teórica quando observa-se a geração do ácido acético. Além da produção do intermediário (ácido acético), o consumo do substrato para o crescimento celular também é responsável pela redução da geração do gás hidrogênio.

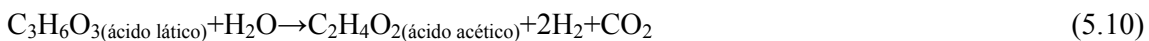


A produção do gás hidrogênio dos reatores alimentados com ácido cítrico foi menor do que a produção teórica, o que pode ser explicado pela produção de ácido acético (10 mmol/L). Pode-se observar que de acordo com a equação teórica, 1 mol de ácido cítrico consumido gera 9 mols de gás hidrogênio (Equação 5.5). Entretanto, quando algum intermediário é produzido, este valor é menor, e no caso da geração do ácido acético o valor fica reduzido para 5 mols de H₂, uma vez que se deve descontar a parcela de hidrogênio que seria produzida se tal intermediário fosse transformado em H₂ e CO₂ (Equação 5.9):



A concentração inicial do ácido cítrico foi 10,91 mmol/L e se ocorresse mineralização completa o valor de gás hidrogênio produzido, seria 98,19 mmol/L. Entretanto, se considerarmos a geração de ácido acético, o valor diminui para 54,55 mmol/L. Contudo, a concentração observada foi de 12,65 mmol/L, que corresponde a 23,2 % do esperado, fato que pode ser explicado pelo consumo do substrato para o crescimento dos microrganismos, fossem as bactérias fototróficas púrpuras não-sulfurosas ou outros presentes no consórcio.

A produção do gás hidrogênio dos reatores alimentados com ácido láctico também foi menor do que a produção teórica, o que pode ser explicado pela produção do intermediário, ácido acético (214,3 mg/L ou 3,6 mmol/L). A concentração inicial de ácido láctico foi de 2088,5 mg/L (23,2 mmol/L). Caso todo o substrato fosse consumido, a concentração teórica de gás hidrogênio esperada seria 139 mmol/L de H₂ (Equação 5.6). Contudo, somente 1.017 mg/L (11,3 mmol/L) foram consumidos. Assim, a produção esperada, se o substrato fosse levado a gás hidrogênio e gás carbônico, seriam 67,9 mmol de H₂. Entretanto, deve-se considerar que a geração do ácido acético diminui a relação 1:6 (mol de ácido láctico: mol de gás hidrogênio) para 1:2, e assim o valor de H₂ esperado seria de 53,4 mmol/L (Equação 5.10), considerando a parcela de substrato que não foi totalmente mineralizada. A produção de H₂ observada foi de 8,54 mmol/L, representando 16 % da conversão teórica considerando a produção de intermediário (Equação 5.10).



Segundo Uyar *et al.* (2008) *Rhodobacter sphaeroides* alimentadas com lactato (20 mM) apresentaram eficiência de conversão de substrato de 31 %. Este valor foi maior do que o observado no presente trabalho (16%), fato que pode ser justificado pelo consumo do substrato pelos microrganismos presentes no consórcio ou mesmo pelo consumo do H₂

produzido, uma vez que o trabalho de Uyar *et al.* (2008) era com cultura pura e o presente estudo com consórcio enriquecido.

A produção do gás hidrogênio dos reatores alimentados com ácido málico foi menor do que a produção teórica, o que pode ser explicado pela geração de ácidos intermediários: ácido acético (134,7 mg/L - 2,25 mmol/L), ácido propiônico (310 mg/L - 4,2 mmol/L) e ácido succínico (203,8 mg/L - 1,7 mmol/L).

Conforme a equação teórica apresentada, cada mol de ácido málico gera 6 mols de gás hidrogênio. Assim, se a concentração inicial utilizada foi de 1938,7 mg/L (14,5 mmol/L) de ácido málico, a concentração esperada do gás era de 87 mmol/L. Entretanto, o valor observado foi de 21,8 mmol/L, que corresponde 25 % da conversão teórica.

Deve-se considerar que o valor da concentração do gás foi inferior ao esperado, uma vez que se observou a geração de intermediários, que diminuem a relação 1:6 mmol (Equação 5.6), como os ácidos acético e propiônico, e ainda a formação de ácido succínico, responsável pelo consumo de hidrogênio do sistema. Além disso, não se pode afirmar que todo o substrato consumido foi utilizado pelas bactérias que realizam o processo fotossintético de produção do gás hidrogênio, pois o consórcio microbiano era composto por outros grupos microbianos, que podem ter utilizado o substrato e até o próprio hidrogênio produzido. Ainda, há que se considerar a parcela de substrato utilizada para o crescimento celular.

A eficiência de conversão do substrato obtida por Kars *et al.*(2009) para cultura de *Rhodobacter sphaeroides* em meio contendo ácido málico (15 mM) foi 58 %. No trabalho de Uyar *et al.*, (2008) a eficiência de conversão de substrato para células de *Rhodobacter sphaeroides* O.U. 001 em meio contendo ácido málico (15 mM), foi de 50 %, valor semelhante ao trabalho de Kars *et al.*(2009). Estas eficiências foram o dobro da observada no presente trabalho (25 %). A justificativa para isso pode ser devido a presença de outros microrganismos, além das bactérias fototróficas púrpuras, como por exemplo,

Magnetospirillum e *Propionivibrio*, que consumiram o substrato, entretanto, não realizaram a produção do gás H₂.

6 Conclusões

O método cromatográfico (CLAE) desenvolvido com a finalidade de determinar os onze ácidos orgânicos de cadeia curta foi adequado para as análises das amostras retiradas dos reatores, podendo ser utilizado também para análises de amostras de outros reatores com precisão.

Em relação a obtenção do consórcio fototrófico, a partir da mistura dos dois inóculos, pode-se dizer que a mistura foi eficaz visto que dentre as seqüências analisadas várias foram semelhantes a bactérias fototróficas púrpuras não-sulfurosas.

As análises de Biologia molecular confirmaram que as condições escolhidas para enriquecimento do consórcio microbiano, como, por exemplo, a fonte de carbono (ácido málico) e meio de cultivo (RCVB) foram adequadas, pois espécies de bactérias fototróficas púrpuras não-sulfurosas foram identificadas com alto grau de similaridade (acima de 97%) com àquelas indicadas na literatura como produtoras do gás hidrogênio.

O crescimento da biomassa foi maior nos ensaios realizados com meio RCVB, exceto para o ácido acético, que não se observou significativa variação. As velocidades específicas de crescimento também foram maiores para o meio RCVB, exceto para os reatores alimentados com ácido láctico. Contudo, a produção do gás hidrogênio, por sua vez, foi maior nos reatores com meio de cultivo FANG de todos os substratos analisados. O consumo dos ácidos cítrico e málico foram os maiores conseguidos (meio RCVB e FANG) independente da concentração inicial de substrato e da biomassa utilizada. O ácido acético apresentou menor consumo (25 %), em meio RCVB, mas esse valor aumentou quando o meio de cultivo utilizado foi FANG (44 %). A média do consumo obtido nos ensaios com os dois meios de cultivo foi menor para os reatores alimentados com ácido butírico (34 % - RCVB e 37 % - FANG).

A produção do gás hidrogênio foi constatada na presença de diversos substratos orgânicos tanto no meio de cultivo RCVB como no FANG, entretanto, maiores valores foram observados para os ensaios com meio FANG, o que pode ser explicado pelo fato deste meio de cultivo ter em sua composição citrato de ferro, que conforme descrito na literatura pode influenciar a produção do gás. Desta maneira, podemos destacar a vantagem do segundo meio de cultivo em relação ao primeiro.

O consórcio fototrófico obtido demonstrou potencial para consumir ácidos orgânicos de cadeia curta, podendo ser empregados com êxito no tratamento de efluente de reator anaeróbio utilizado na produção do gás hidrogênio. Entretanto, estudos são necessários, uma vez que a maioria dos trabalhos utiliza cultura pura no processo fotossintético, e poucos trabalhos são descritos usando consórcio fototrófico, fato que pode prejudicar a produção do gás, pois os microrganismos presentes na cultura mista podem competir pelo substrato com os microrganismos produtores do gás hidrogênio, ou consumir o gás produzido.

7 Referências Bibliográficas

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

AKASAKA, H.; UEKI, A.; HANADA, S.; KAMAGATA, Y. (2003) *Propionicimonas paludicola* gen. nov., sp. nov., a novel facultatively anaerobic, Gram-positive, propionate-producing bacterium isolated from plant residue in irrigated rice-field soil. *Int. Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.53, p.1991–1998.

ANDRADE, A.C.F.F. (2007) Avaliação da produção de hidrogênio por bactéria fototrófica púrpura não-sulfurosa em reator em batelada. 87p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

APHA-AWWA-WPCF (2005) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21th Ed. American Public Health Association/American Water Works Association / Water Environment Federation, Washington DC, USA.

BARBOSA, M.J.; ROCHA, J.M.S.; TRAMPER, J.; WIJFFELS, R.H. (2001) Acetate as a carbon source for hydrogen production by photosynthetic bacteria. *Journal of Biotechnology*, v. 85, p. 25-33.

BENEMANN, J.R. (1997) Feasibility analysis of photobiological hydrogen production. *Int. Journal of Hydrogen Energy*, v.22, p.979-987.

CARLOZZI, P. & SACCHI, A. (2001) Biomass production and studies on *Rhodospseudomonas palustris* grown in an outdoor, temperature controlled, underwater tubular photobioreactor. *Journal of biotechnology*, v.88, p.239-249.

CARLOZZI, P. & PUSHPARAJ, B. (2006) Growth characteristics of *Rhodospseudomonas palustris* culture outdoors, in an underwater tubular photobioreactor, and investigation on photosynthetic efficiency. *Appl. Microbiol Biotechnol*, v.73, p.789-795.

CHUN, J. (1995) Computer assisted classification and identification of Actinomycetes. Ph.D. Thesis, University of Newcastle upon Tyne, Newcastle upon Tyne, UK

COOK,D.M.; DECRESCENZO HENRIKSEN,E.; UPCHURCH,R.; PETERSON,J.B. (2007) Isolation of polymer-degrading bacteria and characterization of the hindgut bacterial community from the detritus-feeding larvae of *Tipula abdominalis* (Diptera: Tipulidae) *Appl. Environ. Microbiol.* v.73,p.5683-5686.

DAMASCENO, L.H.S.; ADORNO, M.A.T.; HIRASAWA, J.S.; VARESCHE, M.B.A.; ZAIAT, M. (2008) Development and validation of a HPLC method for the determination of aldicarb, aldicarb sulfoxide and aldicarb sulfone in liquid samples from anaerobic reactors. *Journal of Brazilian Chemical Society*, 19(6):1158-64.

DAS, D & VEZIROĞLU, T.N. (2001) Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. *Int. Journal of Hydrogen Energy*, v.26, p.13-28.

DUARTE, I.C.S.; OLIVEIRA, L.L.; BUZZINI, A.P.; ADORNO, M.A.T.; VARESCHE, M.B.A. (2006) Development of a method by HPLC to determine LAS and its application in anaerobic reactors. *Journal of Brazilian Chemical Society*, v.17 (7), p.1360-1367.

DUHAMEL,M. & EDWARDS,E.A. (2006) Microbial composition of chlorinated ethene-degrading cultures dominated by Dehalococcoides. *FEMS Microbiol. Ecol.* v.58,p.538-549.

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

EROGLU, E.; GÜNDÜZ, U.; YÜCEL, M.; TÜRKER, L.; EROGLU, I. (2004) Photobiological hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* using olive mill wastewater as a sole carbon substrate source. *Int. Journal of Hydrogen Energy*, v.29, p.163-171.

FANG, H.H.P.; LIU, H.; ZHANG, T. (2005) Phototrophic hydrogen production from acetate and butyrate in wastewater. *Int. Journal of Hydrogen Energy*, v.30, p.785-793.

FASCETTI, E.; D'ADDARIO, E.; TODIN, O.; ROBERTIELLO, A. (1998) Photosynthetic hydrogen evolution with volatile organic acids derived from the fermentation of source selected municipal solid wastes. *Int. Journal of Hydrogen Energy*, v.23, p.753-760.

FISSLER, J.; SCHIRRA, C.; KOHRING, GW.; GIFFHORN, F. (1994) Hydrogen production from aromatic acids by *Rhodopseudomonas palustris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v.41, p.395-399.

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

HELSEL, L.O.; HOLLIS, D.; STEIGERWALT, A.G.; MOREY, R.E.; JORDAN, J.; AYE, T.; RADOSEVIC, J.; JANNAT-KHAH, D.; THIRY, D.; LONSWAY, D.R.; PATEL, J.B.; DANESHVAR, M.I.; LEVETT, P.N. (2007) Identification of '*Haematobacter*,' a New Genus of Aerobic Gram-Negative Rods Isolated from Clinical Specimens, and Reclassification of *Rhodobacter massiliensis* as '*Haematobacter massiliensis* comb. nov.' *J. Clin. Microbiol.* v.45, p.1238-1243.

HILL, A. C. (1992) *Acholeplasma cavigenitalium* sp. nov., isolated from the vagina of guinea pigs *Int. Journal of Systematic Bacteriology*, v.42, p.589-592.

HIRAISHI, A. & UEDA, Y. (1995) Isolation and characterization of *Rhodovulum strictum* sp. nov. and some other purple nonsulfur bacteria from colored blooms in tidal and seawater pools. *Int. J. Syst. Bacteriol.* v.45, p.319-326.

IMHOFF, J.F. (2006) The Phototrophic Alpha-Proteobacteria. *The Prokaryotes*, v.5, p.41-64. DOI:10.1007/0-387-30745-1_2.

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

KIMURA, M. (1980) A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, v.16, p.111-120.

KISHIMOTO, N.; KOSAKO, Y.; WAKAO, N.; TANO, T.; HIRAISHI, A. (1995) Transfer of *Acidiphilium facilis* and *Acidiphilium aminolytica* to the genus *Acidocella* gen. nov., and emendation of the genus *Acidiphilium* *Syst. Appl. Microbiol.* v.18, p.85-91.

KODAMA, Y.; HA LE, T.; WATANABE, K. (2007) *Sulfurospirillum cavolei* sp. nov., a facultatively anaerobic sulfur-reducing bacterium isolated from an underground crude oil storage cavity. *Int. Journal of Syst. Evol. Microbiol.* v.57, p.827-831.

KOKU, H.; EROGLU, I.; GÜNDÜZ, U.; YÜCEL, M.; TÜRKER, L. (2002) Aspects of the metabolism of hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides*. *Int. Journal of Hydrogen Energy*, v.27, p.1331-1338.

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

KUMAR, S.; TAMURA, K.; JAKOBSEN, I. B.; NEI, M. (2001) MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software, Arizona State University, Tempe, Arizona, USA.

LANE, D.J (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E, Goodfellow M (eds) *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Academic, Chichester, UK, p.115–175

LAZARO, C. Z.; HIRASAWA, J. S.; VARESCHE, M. B. A.; ADORNO, M. A. T. (2008) Development of an HPLC method for the analysis of eleven short chain organic acids in bioproduction of hydrogen, XII COLACRO (Congresso Latino-Americano de Cromatografia e Técnicas Relacionadas), Florianópolis, SC.

LIU, B.; ZHANG, F.; FENG, X.; LIU, Y.; YAN, X.; ZHANG, X.; WANG, L.; ZHAO, L. (2006) *Thauera* and *Azoarcus* as functionally important genera in a denitrifying quinoline-removal bioreactor as revealed by microbial community structure comparison *FEMS Microbiol. Ecol.* v.55, p.274-286.

MACLER, B.A.; PELROY, R.A.; BASSHAM, J.A. (1979) Hydrogen formation in nearly stoichiometric amounts from glucose by *Rhodopseudomonas sphaeroides* mutant. *Journal of Bacteriology*, v.138, p.446-452.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. (2004) *Microbiologia de Brock*. 10ed. São Paulo: Prentice Hall.

MANISH, S.; BANERJEE, R. (2008) Comparison of biohydrogen production processes. *Int. Journal of Hydrogen Energy*, v.33, p.279-286.

- NEDER, R.N. (1992). Microbiologia: Manual de Laboratório. ISBN 85-213-0715-2. CDD. 576.028. São Paulo – SP. Editora Nobel.
- NIELSEN, A.T.; LIU, W.T.; FILIPE, C.; GRADY, L.; MOLIN, S.; STAHL, D.A. (1999) Identification of a novel group of bacteria in sludge from a deteriorated biological phosphorus removal reactor. *Appl and Environmental Microbiology*, v.65, n.3, p.1251-1258.
- OH, Y-K.; SEOL, E-H.; KIM, M-S.; PARK, S. (2004) Photoproduction of hydrogen from acetate by a chemoheterotrophic bacterium *Rhodospseudomonas palustris* P4. *Int. Journal of Hydrogen Energy*, v.29, p.1115-1121.
- OKAMURA, K.; Hisada,T.; HIRAISHI,A. (2007) Characterization of thermotolerant purple nonsulfur bacteria isolated from hot-spring *Chloroflexus* mats and the reclassification of '*Rhodospseudomonas cryptolactis*' Stadtwald-Demchick et al.1990 as *Rhodoplanes cryptolactis* nom. rev., comb. nov. *Journal Gen. Appl. Microbiol.* v.53,p.357-361.
- PFENNING, N. (1967) Photosynthetic bacteria. *Ann Rev Microbiol.*, v.21, p.285-324.
- REDWOOD, M.D.; MACASKIE, L.E. (2006) A two-stage, two organism process for biohydrogen from glucose. *Int. Journal of Hydrogen Energy*, v.31,p.1514-1521.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. (2004) Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos, *Química Nova*, 27(5):771-780.
- RUPPRECHT, J; HANKAMER, B; MUSSGNUM, J.H. (2006) Perspectives and advances of biological H₂ production in microorganisms. *Appl.Microbiol Biotechnol*, v.72, p.442-449.
- SAAVEDRA, N.K.; SAKAMOTO, I.K.; VARESCHE, M.B.A. (2005) Avaliação da diversidade de bactérias fototróficas anoxigênicas em lagoa de estabilização anaeróbia. In: TALLER Y SIMPOSIO LATINOAMERICANO SOBRE DIGESTION ANAEROBIA, 7., 2005, Punta del este, Uruguay.
- SASIKALA, K.; RAMANA, CH.V.; RAO, P.R; SUBRAHMANYAM, M. (1990) Effect of gas phase on the photoproduction of hydrogen and substrate conversion efficiency in the photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* O.U. 001. *Int. Journal of Hydrogen Energy*, v.15, p.795-797.

SASIKALA, K.; RAMANA, CH.V.; RAO, P.R. (1991) Environmental regulation for optimal biomass yield and photoproduction of hydrogen by *Rhodobacter sphaeroides* O.U. 001 *Int. Journal of Hydrogen Energy*, v.16, p.597-601.

SASIKALA, K.; RAMANA, CH.V.; RAO, P.R. (1995) Regulation of simultaneous hydrogen photoproduction during growth by pH and glutamate in *Rhodobacter sphaeroides* O.U. 001 *Int. Journal of Hydrogen Energy*, v.20, p.123-126.

SCHNEIDER, A.; GERBI, V.; REDOGLIA, M. (1987) A rapid HPLC method for separation and determination of major organic acids in grape musts and wines, *Am. J. Enoh Vitic.*, 38(2):151-55.

SINGH, S.P.; SRIVASTAVA, S.C.; PANDEY, K.D. (1994) Hydrogen production by *Rhodospseudomonas* at the expense of vegetable starch, sugarcane juice and whey. *Int. Journal of Hydrogen Energy*, v.19, n°5, p.437-440.

TAO, Y.; CHEN, Y.; WU, Y.; HE, Y., ZHOU, Z. (2007) High hydrogen yield from a two-step process of dark- and photo-fermentation of sucrose. *Int. Journal of Hydrogen Energy*, v.32, p.200-206.

TAO, Y.; HE, Y.; WU, Y.; LIU, F.; LI, X.; ZONG, W.; ZHOU, Z. (2008) Characteristics of a new photosynthetic bacterial strain for hydrogen production and its application in wastewater treatment. *Int. Journal of Hydrogen Energy*, v.33, p.963-973.

THANGARAJ, A. & KULANDAIVELU, G. (1994) Biological hydrogen photoproduction using dairy and sugarcane waste waters. *Biosource Technology*, v.48, p. 9-12.

WEAVER, P.F; WALL, J.D; GEST, H. (1975) Characterization of *Rhodospseudomonas capsulata*. *Arch. Microbiol.*, v.105, p.207-216.

YETIS, M.; GÜNDÜZ, U.; EROGLU, I.; YÜCEL, M.; TÜRKER, L. (2000) Photoproduction of hydrogen from sugar refinery wastewater by *Rhodobacter sphaeroides* immobilized in agar gels. *Int. Journal of Hydrogen Energy*, v.25, p.1035-1041.

Apêndice 1 - Valores de SSV (g/L) e absorvância (660 nm) utilizados para a construção da curva-padrão de crescimento da biomassa

Tabela A1.1: Valores de SSV e absorvância do reator fototrófico utilizado no ensaio para a construção da curva-padrão de crescimento. Ensaios realizados em duplicata, com 10 % de inóculo (v/v) em meio RCVB, ácido málico como fonte de carbono

Tempo de Ensaio (h)	SSV (g/L)Reator 1	SSV (g/L) Reator 2	Média SSV (g/L)	A₆₆₀ Reator 1	A₆₆₀ Reator 2	Média A₆₆₀
0	0,178	0,111	0,144	0,136	0,147	0,141
21	0,229	0,286	0,257	0,178	0,177	0,177
48	0,249	0,302	0,276	0,267	0,234	0,250
69	0,388	0,336	0,362	0,407	0,384	0,395
84	0,492	0,588	0,540	0,469	0,473	0,471
93	0,830	0,333	0,581	0,566	0,485	0,525
143,66	0,833	0,737	0,785	0,752	0,729	0,7405
157,66	0,756	0,770	0,763	0,726	0,741	0,733
168,5	0,841	0,870	0,856	0,755	0,797	0,776
183	0,848	0,941	0,894	0,750	0,837	0,793

Apêndice 2 - Crescimento do consórcio fototrófico para os diferentes substratos em meio de cultivo RCVB e FANG

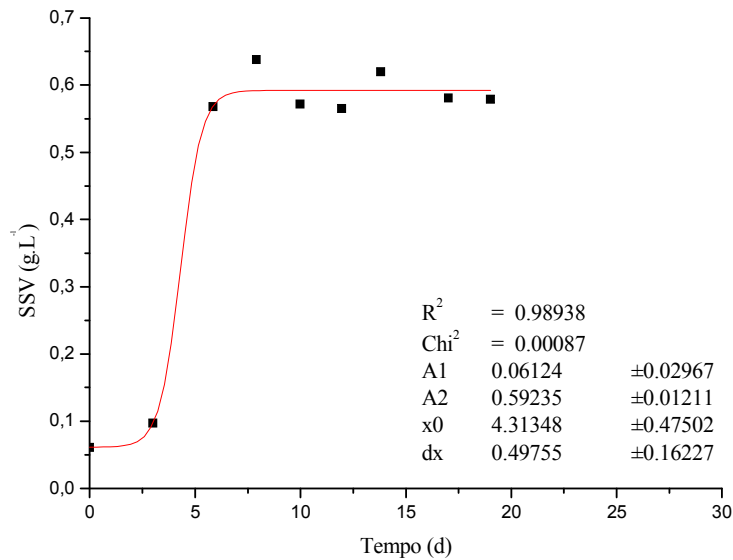


Figura A2.1: Crescimento celular em reator fototrófico com ácido acético e meio RCVB

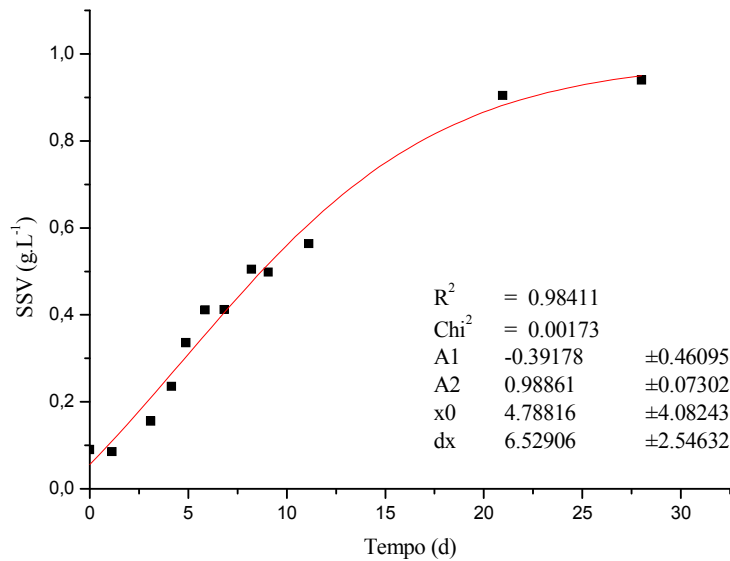


Figura A2.2: Crescimento celular em reator fototrófico com ácido acético e meio FANG

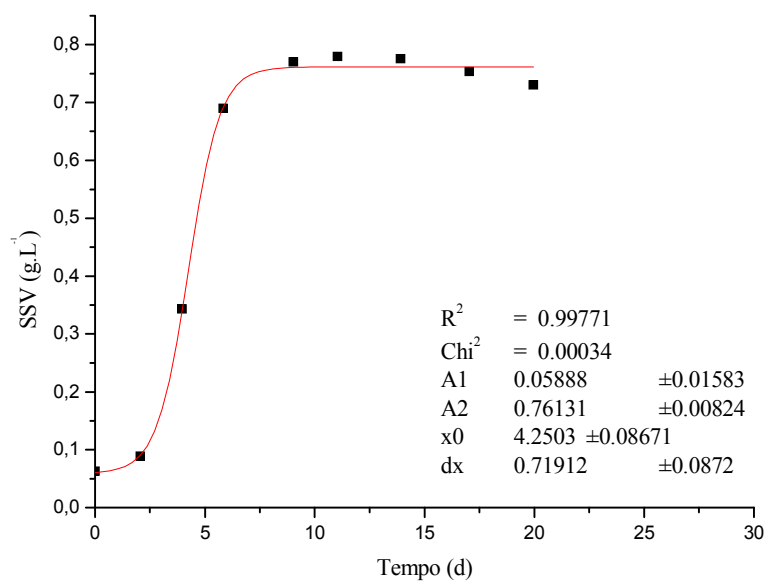


Figura A2.3: Crescimento celular em reator fototrófico com ácido butírico e meio RCVB

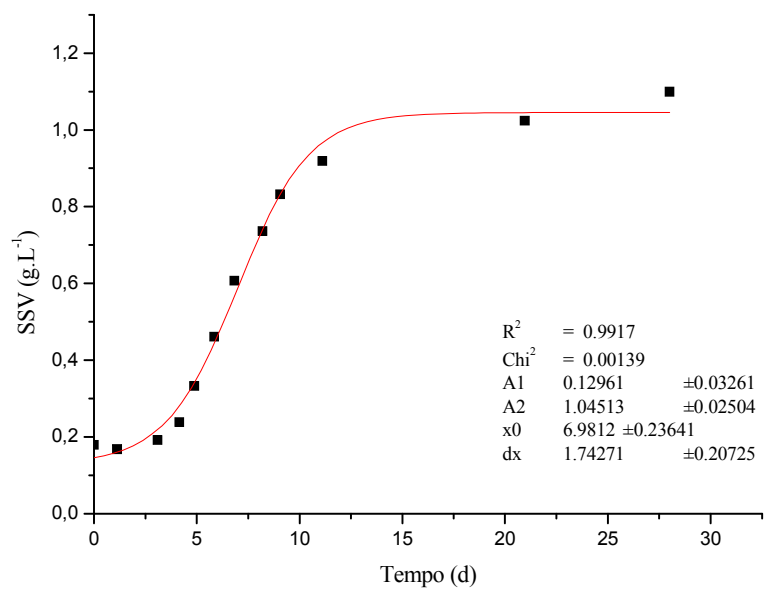


Figura A2.4: Crescimento celular em reator fototrófico com ácido butírico e meio FANG

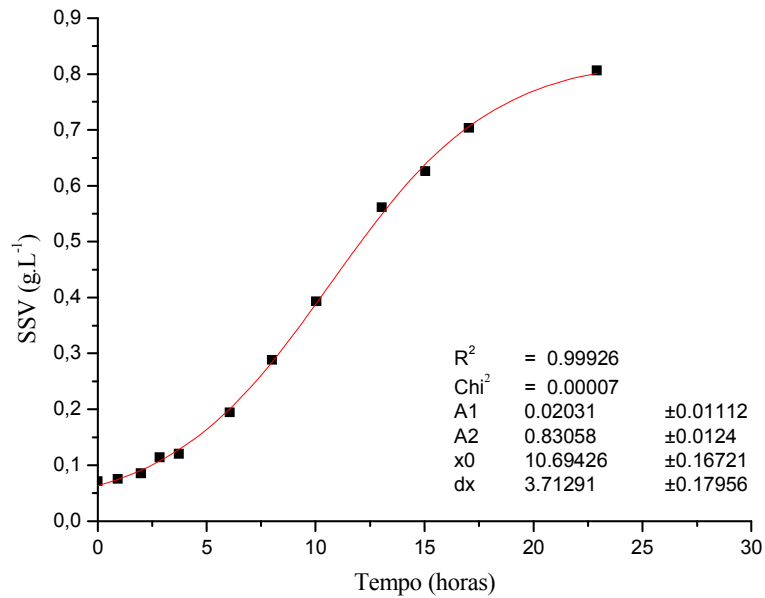


Figura A2.5: Crescimento celular em reator fototrófico com ácido cítrico e meio RCVB

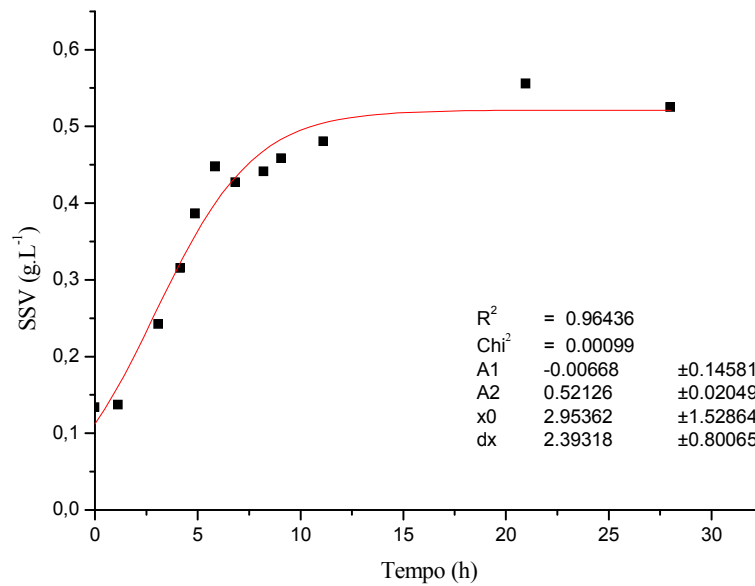


Figura A2.6: Crescimento celular em reator fototrófico com ácido cítrico e meio FANG

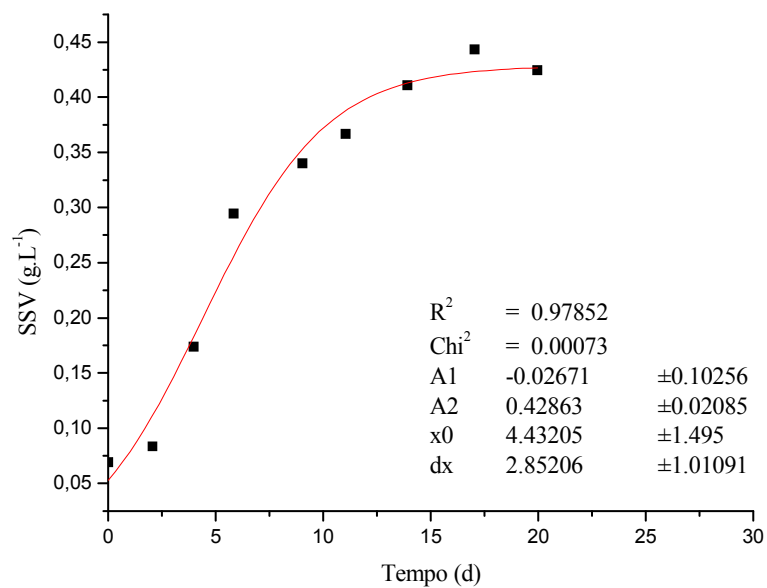


Figura A2.7: Crescimento celular em reator fototrófico com glutamato de sódio e meio RCVB

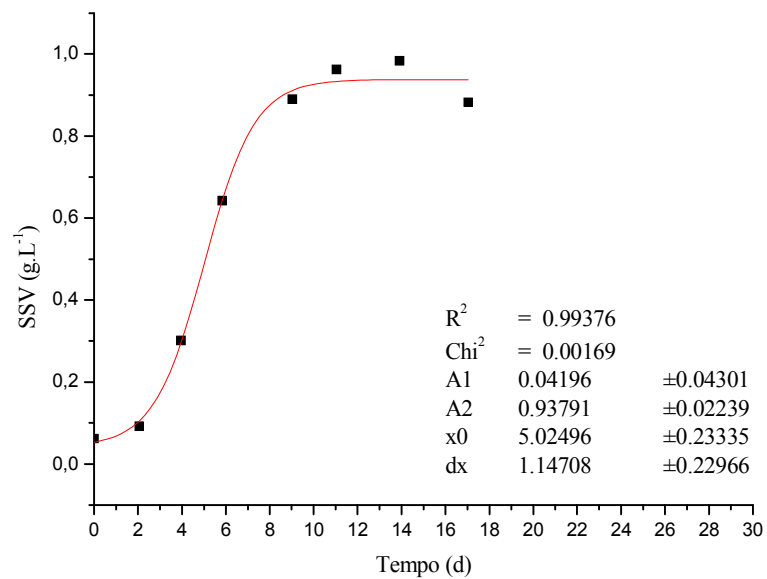


Figura A2.8: Crescimento celular em reator fototrófico com ácido láctico e meio RCVB

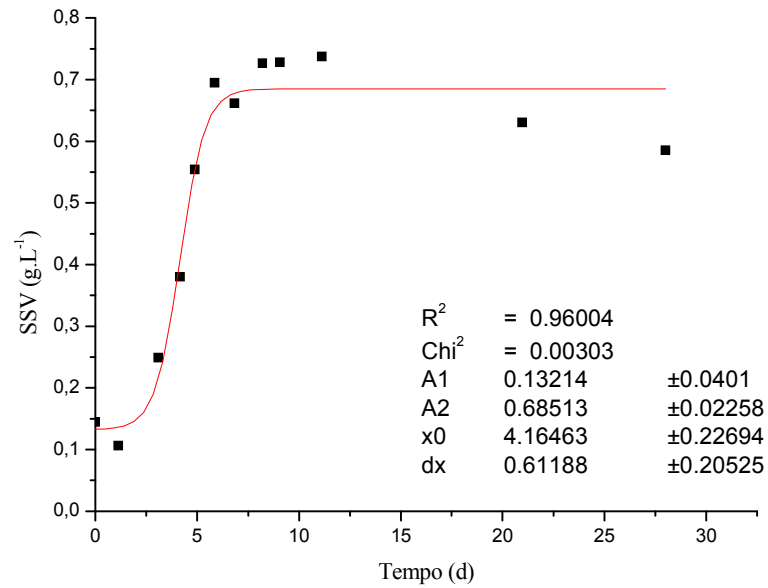


Figura A2.9: Crescimento celular em reator fototrófico com ácido láctico e meio FANG

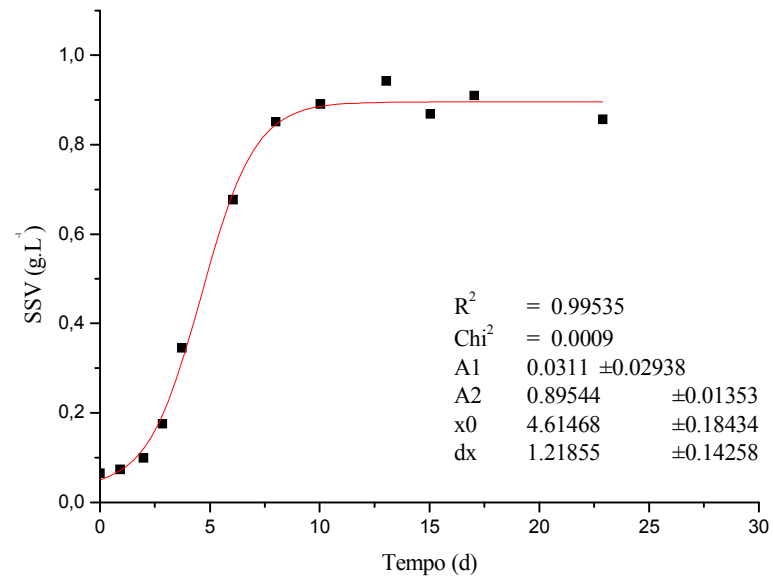


Figura A2.10: Crescimento celular em reator fototrófico com ácido málico e meio RCVB

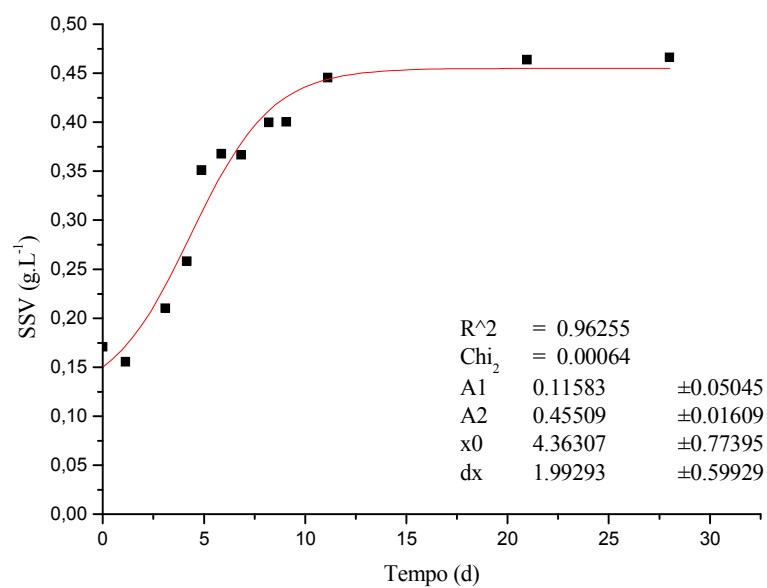


Figura A2.11: Crescimento celular em reator fototrófico com ácido málico e meio FANG

Apêndice 3 - Velocidade específica de crescimento para os diferentes substratos utilizados nos ensaios em meio de cultivo RCVB

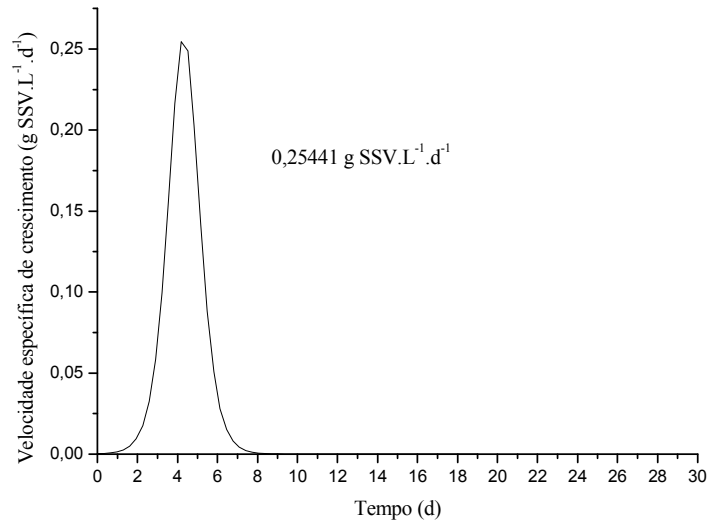


Figura A3.1: Velocidade específica de crescimento no reator fototrófico com ácido acético e meio RCVB

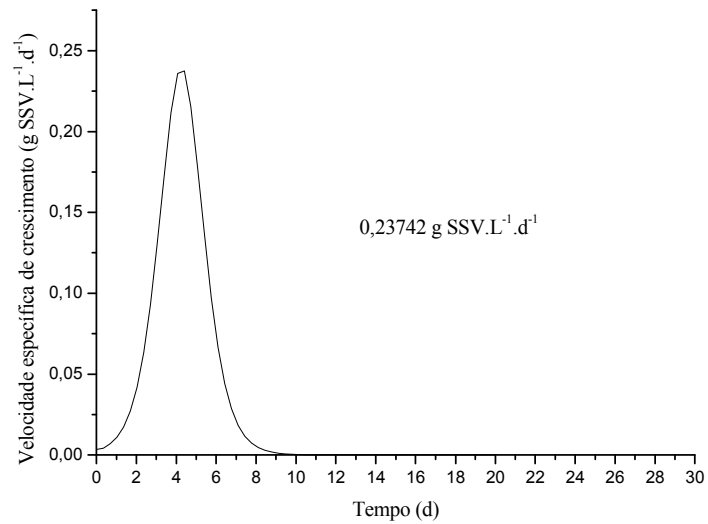


Figura A3.2: Velocidade específica de crescimento no reator fototrófico com ácido butírico e meio RCVB

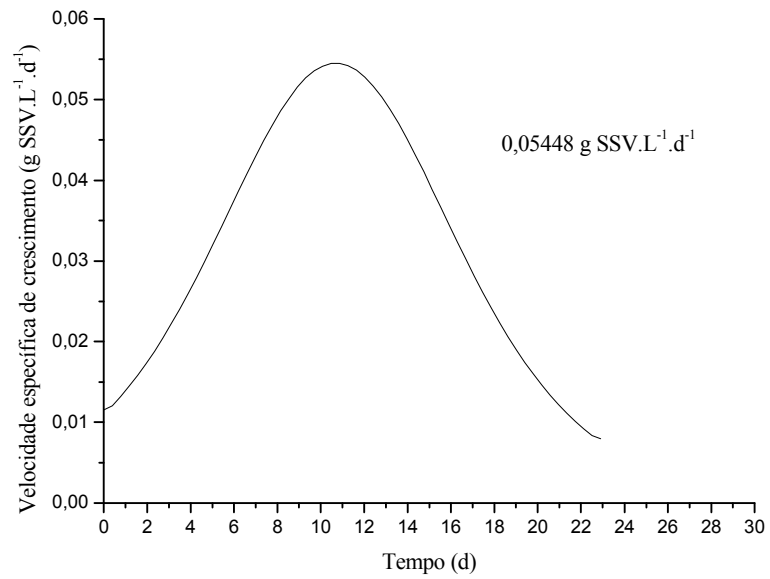


Figura A3.3: Velocidade específica de crescimento no reator fototrófico com ácido cítrico e meio RCVB

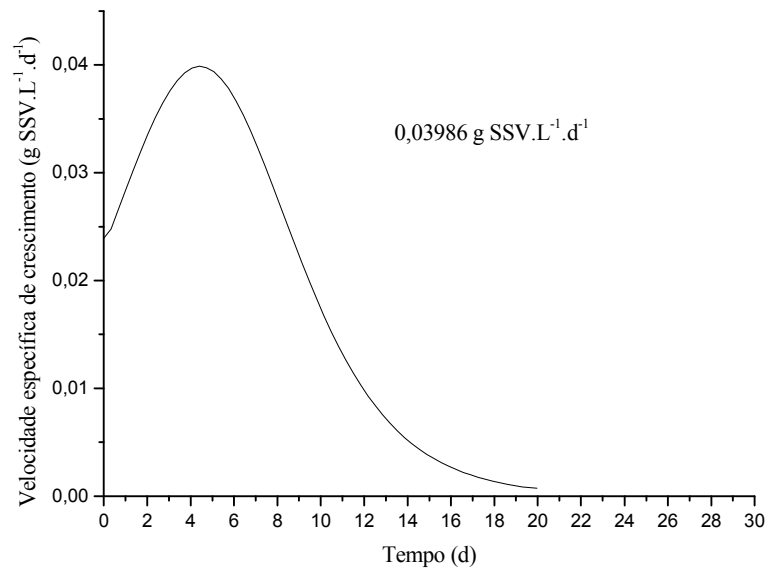


Figura A3.4: Velocidade específica de crescimento no reator fototrófico com glutamato de sódio e meio RCVB

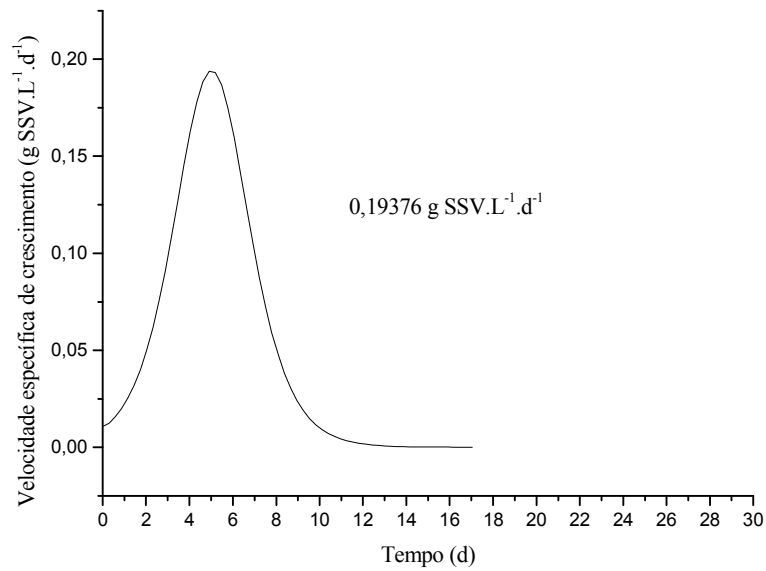


Figura A3.5: Velocidade específica de crescimento no reator fototrófico com ácido láctico e meio RCVB

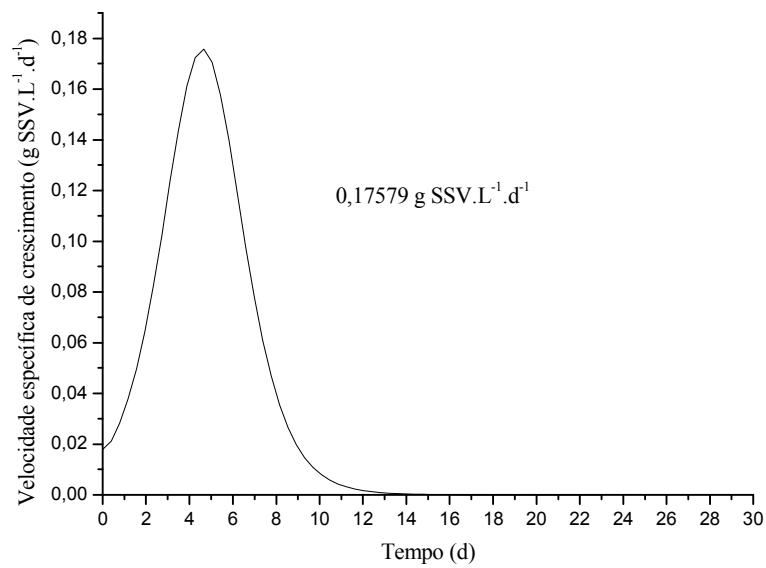


Figura A3.6: Velocidade específica de crescimento no reator com ácido málico e meio RCVB

Apêndice 4 - Velocidade específica de crescimento para os diferentes substratos utilizados nos ensaios em meio de cultivo descrito por Fang *et al.* (2005)

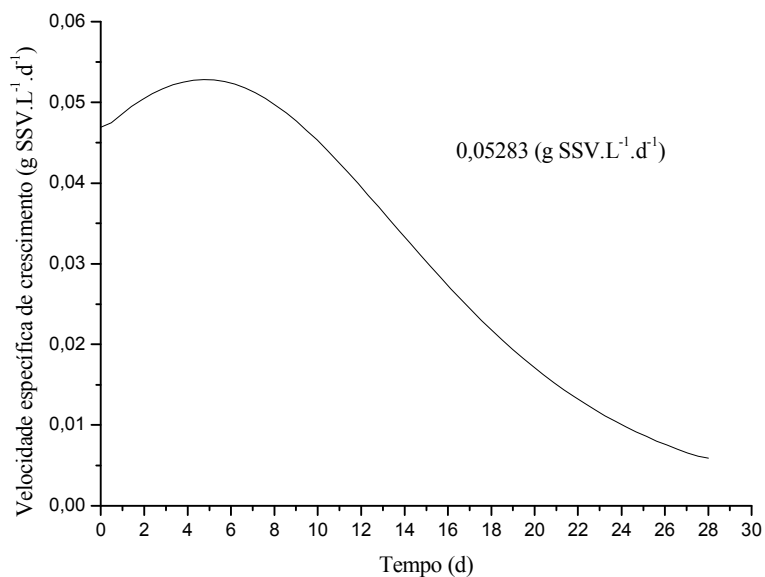


Figura A4.1: Velocidade específica de crescimento no reator fototrófico com ácido acético e meio FANG

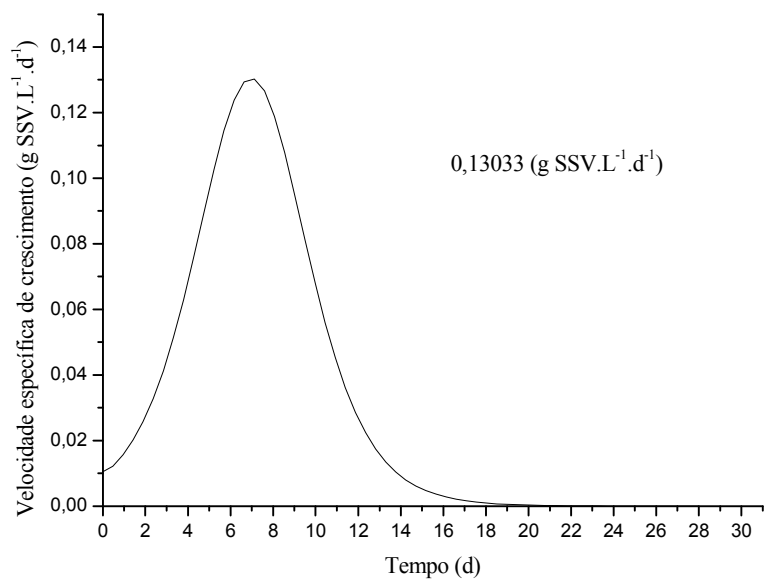


Figura A4.2: Velocidade específica de crescimento no reator fototrófico com ácido butírico e meio FANG

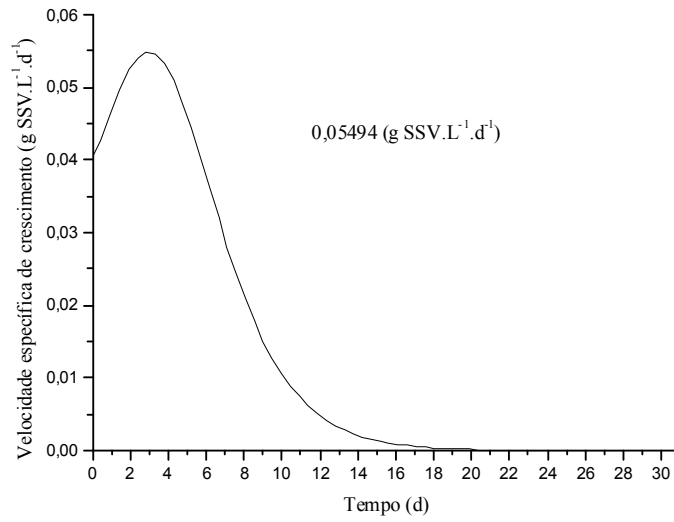


Figura A4.3: Velocidade específica de crescimento no reator fototrófico com ácido cítrico e meio FANG

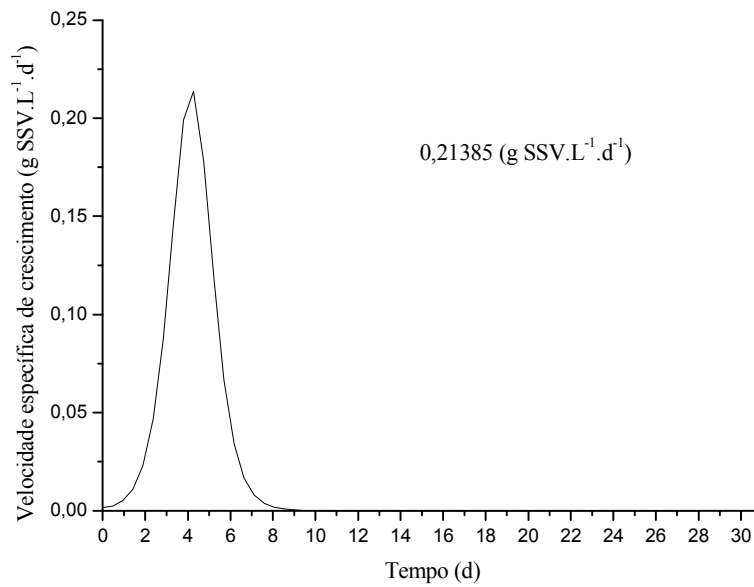


Figura A4.4: Velocidade específica de crescimento no reator fototrófico com ácido láctico e meio FANG

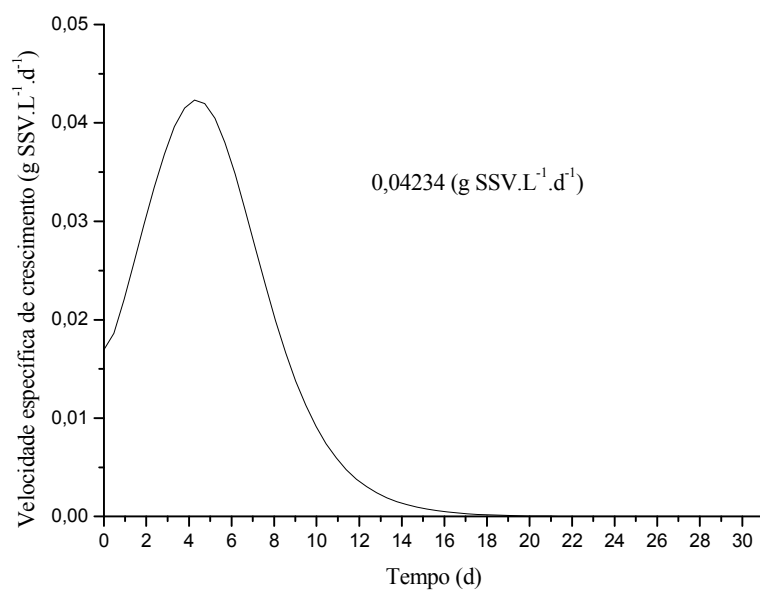


Figura A4.5: Velocidade específica de crescimento no reator fototrófico com ácido málico e meio FANG