

CAROLINA ZAMPOL LAZARO

Influência da concentração de substrato e da temperatura na produção de hidrogênio a partir de vinhaça de cana-de-açúcar

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos

2012

CAROLINA ZAMPOL LAZARO

Influência da concentração de substrato e da temperatura na produção de hidrogênio a partir de vinhaça de cana-de-açúcar

Tese apresentada ao Departamento de Hidráulica e Saneamento da Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

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

São Carlos

2012

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

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Atendimentos ao Usuário do Serviço de Biblioteca –
EESC/USP

L431i Lazaro, Carolina Zampol
Influência da concentração de substrato e da temperatura na produção de hidrogênio a partir de vinhaça de cana-de-açúcar / Carolina Zampol Lazaro; Orientador Maria Bernadete A. Varesche. -- São Carlos, 2012.

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

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Bacharel **CAROLINA ZAMPOL LÁZARO**.

Título da tese: "Influência da concentração de substrato e da temperatura na produção de hidrogênio a partir de vinhaça da cana-de-açúcar".

Data da defesa: 29/06/2012

Comissão Julgadora:

Resultado:

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

Aprovada

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

Aprovada

Prof^ª. Dr^ª. **Silvana de Queiroz Silva**
(Universidade Federal de Ouro Preto/UFOP)

Aprovada

Dr^ª. **Viridiana Santana Ferreira Leitão**
(Instituto Nacional de Tecnologia/INT)

Aprovada

Prof^ª. Dr^ª. **Regina Vasconcellos Antonio**
(Universidade Federal de Santa Catarina/UFSC)

Aprovada

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

Prof. Titular **Edson Cezar Wendland**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:

Prof. Titular **Denis Vinicius Coury**

*Dedico este trabalho à minha madrinha e amiga Regina
Maria Amado Zampol Davani (in memoriam).*

Muito obrigada por tudo!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus pela vida e pelas boas oportunidades que ele sempre colocou no meu caminho.

A minha família por estarem sempre presentes na minha vida. Principalmente, meus pais, Heloisa e Walter, que são os responsáveis pela minha existência e pela minha formação.

Aos meus padrinhos, Regina (*in memoriam*) e Sérgio, que sempre honraram com os votos que fizeram perante Deus e que cuidam de mim assim como meus pais.

Ao meu irmão, Felipe, aos meus primos, Gustavo, Paulo, Sérgio, Fernando, Sônia e Fátima e às minhas tias, Cinira, Jandira e Margarida. Sem dúvida, sem o apoio de todos vocês durante a minha vida esse momento não seria possível. Além desses, quero deixar registrado um agradecimento especial aos meus “tios” Paula e Adriano pelo incentivo para seguir a carreira acadêmica.

À minha “irmã” Ana Paula Sueitt por esses 10 anos de companheirismo, sem dúvida minha passagem por São Carlos teria sido muito mais difícil sem você.

Além da minha família, gostaria de agradecer a minha orientadora Prof. Dra. Maria Bernadete A. Varesche por todas as oportunidades, pela orientação, pela confiança, pelo carinho, pela atenção e pela preocupação.

Agradeço também à Prof. Dra. Claudia Etchebere pela oportunidade do estágio na Universidad de la Republica -UDELAR-Uruguai- e pelos valiosos ensinamentos.

Aos professores Eugênio Foresti e Sandra I. Maintinguer pelas contribuições no exame de qualificação e por todos os momentos vividos no laboratório durante o período do doutorado.

Aos membros da comissão julgadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria Bernadete A. Varesche, prof. Dr. Marcelo Zaiat, prof^ª. Dr^ª. Silvana de Queiroz Silva, prof^ª. Dr^ª. Regina Vasconcellos Antonio e Dr^ª. Viridiana Santana Ferreira Leitão.

Aos demais professores do Laboratório de Processos Biológico: Marcelo Zaiat, Márcia Helena Rissato Zamariolli Damianovic e Wiclef Dymurgo Marra Junior pelos momentos compartilhados.

Às técnicas do Laboratório de Processos Biológicos, Isabel Sakamoto, Maria Angela Adorno (Janja), Inês e Eloisa Pozzi, pelo auxílio durante a realização dos experimentos.

Aos meus colegas de laboratório: Adis, Adriana, Ari, Bruna M., Dagoberto, Débora F., Djalma, Eduardo P., Fabiana M., Fabrício, Filipe, Flávia Saia, Gustavo, Jorge Wenzel, Juliana K., Lorena, Mara Rúbia, Moacir, Pilar, Priscila, Regiane C., Regiane R., Rogério, Theo, Tiagão, Tiago e Verónica Perna. Em especial, gostaria de agradecer à Livia e ao Rafael pela valiosa ajuda em todos os momentos.

Agradeço também ao ex-colega de laboratório e companheiro, Daniel M. F. L. pelos ótimos momentos, pela paciência e pelo apoio durante esse último ano.

Aos funcionários do Departamento de Hidráulica e Saneamento: Juliana, Silvana, Fernando, Edson, André, Sá, Pavi, Rose, Flávia e Fernanda.

Sem dúvida, no LPB tive a oportunidade de trabalhar com profissionais de altíssima qualidade, os quais se revelaram pessoas excelentes. Com certeza, teria sido um período difícil se não fosse pela paciência, sabedoria e coleguismo de todos.

E, por último, mas não menos importante, gostaria de agradecer à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - PROCESSO NR 2009/00135-8) pela bolsa concedida.

*“O Senhor é o meu pastor, nada me faltará.
Em verdes prados ele me faz repousar.
Conduz-me junto às águas refrescantes, restaura as forças de minha alma.
Pelos caminhos retos ele me leva, por amor do seu nome.
Ainda que eu atravessasse o vale escuro, nada temerei, pois estais comigo.
Vosso bordão e vosso báculo são meu amparo.
Preparais para mim a mesa à vista de meus inimigos.
Derramais o perfume sobre minha cabeça, e transborda minha taça.
A vossa bondade e misericórdia não de seguir-me por todos os dias da minha vida.
E habitarei na casa do Senhor por longos dias.”*

Salmos 22

RESUMO

LAZARO, C. Z. Influência da concentração de substrato e da temperatura na produção de hidrogênio a partir de vinhaça de cana-de-açúcar. 2012. 157 f. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

O presente estudo teve como principal objetivo avaliar a produção de hidrogênio a partir de diferentes concentrações de vinhaça de cana-de-açúcar a 37 °C e 55 °C. Além disso, os consórcios microbianos mesófilo e termófilo utilizados nos ensaios em reatores em batelada foram caracterizados por meio da técnica de clonagem e sequenciamento do gene RNAr 16S visando conhecer a diversidade de bactérias. Os ensaios de produção de hidrogênio foram realizados após o enriquecimento dos consórcios microbianos a partir de lodo de reator UASB em condição mesófila e termófila utilizando vinhaça como fonte de carbono. Todos os ensaios foram realizados em triplicata de reatores em batelada com aproximadamente 2, 5, 7 e 12 g DQO L⁻¹ de vinhaça, sendo monitorada a produção de hidrogênio, ácidos orgânicos e solventes, além de carboidratos totais solúveis. O potencial de produção de hidrogênio foi maior para concentrações crescentes de vinhaça; ou seja, de 4,3 para 28,4 mmol H₂ nos ensaios a 37 °C. Para os ensaios termófilos esses valores foram bastante similares entre si, variando de 5 a 6,7 mmol H₂. Em relação ao rendimento de produção de H₂, observou-se que não ocorreu variação com aumento da concentração de substrato para os ensaios mesófilos (10 mmol H₂ g⁻¹ carboidratos totais), todavia, para os ensaios termófilos o rendimento diminuiu com o aumento da concentração de vinhaça, ou seja, de 21,7 (2 g DQO L⁻¹) para 3,2 mmol H₂ g⁻¹ carboidratos totais (12 g DQO L⁻¹). Nos ensaios mesófilos, obteve-se degradação acima de 79 % do substrato orgânico, enquanto para os ensaios termófilos esse valor variou de 36 a 61 %. Os metabólitos gerados foram ácido acético e butírico nos ensaios mesófilos e, somente ácido butírico nos ensaios termófilos. Clones provenientes do consórcio mesófilo foram similares a microrganismos das famílias Clostridiaceae (75 %) e Ruminococcaceae (22 %). Em contrapartida, no consórcio termófilo, 96 % dos clones foram filogeneticamente relacionados a *Thermoanaerobacterium*. As cepas microbianas isoladas (CA e C1) apresentaram rendimento de produção de hidrogênio de 10 e 1,1 mmol H₂ g⁻¹ glicose, respectivamente. CA e C1 foram similares (100 %) a *Clostridium acetobutylicum* e *Clostridium carboxidivorans*.

Palavras-chave: água residuária, energia renovável, *Clostridium*, *Thermoanaerobacterium*

ABSTRACT

LAZARO, C. Z. Influence of substrate concentration and temperature on the hydrogen production from sugarcane vinasse. 2012. 157 f. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

The present study aimed to evaluate the production of hydrogen from different concentrations of sugar cane vinasse at 37 °C and 55 °C. Moreover, the mesophilic and thermophilic microbial consortia used in the hydrogen production tests were characterized by cloning and sequencing techniques to know its microbial diversity. Hydrogen production tests were carried out after the microbial enrichment from a UASB granular sludge at a temperature of 37 °C and 55 °C using vinasse as sole carbon source. All assays were performed in triplicate of batch reactors with about 2, 5, 7 and 12 g COD L⁻¹ of vinasse. During the assays H₂, solvents and organic acids production as well as the soluble carbohydrates were measured. Potentials of hydrogen production increased with the increasing concentration of substrate in the mesophilic tests (4.3 to 28.4 mmol H₂). However, for the thermophilic tests, the hydrogen production potentials were very similar among them, ranging from 5 to 6.7 mmol H₂. For the mesophilic tests, the hydrogen yields did not change with increasing the vinasse concentration for the (values around 10 mmol H₂ g⁻¹ carbohydrates), however, for the thermophilic tests the hydrogen yields decreased with the increase of vinasse concentration, the yield ranged from 21.7 (2 g COD L⁻¹) to 3.2 mmol H₂ g⁻¹ carbohydrate (12 g COD L⁻¹). The efficiency of substrate degradation was higher for mesophilic tests, and its minor value was 79 %. For the thermophilic tests, the substrate consumption was lower, and the values ranged from 36 to 61 %. The metabolites generated were acetic and butyric acids for tests at 37 °C and butyric acids for the tests at 55 °C. The mesophilic clones were similar to the family Clostridiaceae (75 %) and Ruminococcaceae (22 %). In contrast, the thermophilic consortium presented 96 % of clones related to *Thermoanaerobacterium*. Isolated bacterial strains (CA and C1) showed hydrogen yields of 10 and 1.1 mmol H₂ g⁻¹ glucose, respectively. CA and C1 were similar to *Clostridium acetobutylicum* (100 %) and *Clostridium carboxidivorans* (100 %).

Keywords: wastewater, renewable energy, *Clostridium*, *Thermoanaerobacterium*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 3.1: Via metabólica de produção de hidrogênio: microrganismos anaeróbios (lado esquerdo) microrganismos facultativos (lado direito). Fonte: Hallenbeck e Gosh (2012)	36
Figura 4.1: Fluxograma experimental.....	56
Figura 4.2: Reatores anaeróbios em batelada utilizados nos ensaios de produção de hidrogênio	62
Figura 4.3: Fluxograma experimental da etapa de isolamento de microrganismos mesófilos e termófilos.....	63
Figura 4.4: <i>Roll-tube</i> para isolamento de microrganismos anaeróbios. A seta amarela indica as bolhas formadas devido à produção do gás. A seta vermelha indica uma colônia microbiana	65
Figura 5.1: Microscopia óptica de contrastes de fase de biomassa mesófila (A) e termófila (B) após adaptação à vinhaça. As setas indicam endósporos	78
Figura 5.2: Dendrograma de DGGE. A seta indica a banda que foi recortada para sequenciamento de fragmentos do RNAr 16S.....	78
Figura 5.3: Relação entre potencial de produção de hidrogênio (P) e concentração inicial de vinhaça a 37 °C.....	81
Figura 5.4: Relação entre produção específica de hidrogênio e concentração inicial de vinhaça a 37 °C.....	81
Figura 5.5: Relação entre o rendimento de produção de hidrogênio e concentração inicial de vinhaça a 37 °C.....	82
Figura 5.6: Relação entre porcentagem de consumo de substrato e concentração inicial de vinhaça a 37 °C.....	87
Figura 5.7: Relação entre crescimento da biomassa e concentração inicial de substrato a 37 °C	88
Figura 5.8: Produção acumulada de hidrogênio (●) e consumo de carboidratos (■) para os ensaios mesófilos. (A) – ensaio M2, (B) – ensaio M5, (C) – ensaios M7 e (D) ensaio M12 ..	89
Figura 5.9: Composição dos ácidos orgânicos e etanol para o ensaio M2. (■) Etanol, (■) Ácido acético, (■) Ácido butírico, (■) Ácido propiônico	91
Figura 5.10: Composição dos ácidos orgânicos e etanol para o ensaio M5. (■) Etanol, (■) Ácido acético, (■) Ácido butírico, (■) Ácido propiônico	92

Figura 5.11: Composição dos ácidos orgânicos e etanol para o ensaio M7. (■) Etanol, (■) Ácido acético, (■) Ácido butírico, (■) Ácido propiônico	93
Figura 5.12: Composição dos ácidos orgânicos e etanol para o ensaio M12. (■) Etanol, (■) Ácido acético, (■) Ácido butírico, (■) n-butanol.....	95
Figura 5.13: Relação entre potencial de produção de hidrogênio (<i>P</i>) e concentração inicial de vinhaça a 55 °C.....	96
Figura 5.14: Relação entre crescimento da biomassa e concentração inicial de vinhaça a 55 °C	97
Figura 5.15: Relação entre produção específica de hidrogênio e concentração inicial de vinhaça a 55 °C.....	98
Figura 5.16: Relação entre rendimento de produção de hidrogênio e concentração inicial de vinhaça a 55 °C.....	100
Figura 5.17: Relação entre concentração de carboidratos totais solúveis e sólidos suspensos voláteis nos ensaios a 37 °C (●) e 55 °C (■).....	101
Figura 5.18: Relação entre a porcentagem de consumo de substrato e concentração inicial de vinhaça a 55 °C.....	102
Figura 5.19: Produção acumulada de hidrogênio (●) e consumo de carboidratos (■)para os ensaios termófilos. (A) – ensaio T2, (B) – ensaio T5, (C) – ensaio T7 e (D) ensaio T12	104
Figura 5.20: Composição dos ácidos orgânicos e etanol para o ensaio T2. (■) Etanol, (■) Ácido acético, (■) Ácido butírico	106
Figura 5.21: Composição dos ácidos orgânicos e etanol para o ensaio T5. (■) Etanol, (■) Ácido acético, (■) Ácido butírico	107
Figura 5.22: Composição dos ácidos orgânicos e etanol para o ensaio T7. (■) Etanol, (■) Ácido acético, (■) Ácido butírico; (■) Ácido propiônico	107
Figura 5.23: Composição dos ácidos orgânicos e etanol para o ensaio T12. (■) Etanol, (■) Ácido acético, (■) Ácido butírico	108
Figura 5.24:Relação entre o potencial de produção de hidrogênio (<i>P</i>) e concentração de substrato nos ensaios a 37 °C (●) e 55 °C (■).....	109
Figura 5.25: Relação entre o rendimento de produção de hidrogênio e concentração de substrato nos ensaios a 37 °C (●) e 55 °C (■).....	109
Figura 5.26: Relação entre a porcentagem de consumo de substrato e concentração de substrato nos ensaios a 37 °C (●) e 55 °C (■).....	110
Figura 5.27: Dendrograma construído com todas as amostras utilizando o coeficiente de DICE	116

Figura 5.28: Relação entre o número de cópias de Hyd A e a quantidade de DNA nos ensaios mesófilos	118
Figura 5.29: Classificação dos clones dentro do Domínio Bacteria	120
Figura 5.30: Classificação dos clones dentro do Filo Firmicutes	120
Figura 5.31: Árvore filogenética construída a partir de distâncias evolutivas inferidas usando o método Neighbor-Joining (Saitou and Nei 1987). A porcentagem de réplicas da árvore está apresentada perto dos ramos e foi calculada com base em teste de <i>bootstrap</i> com 1000 réplicas (Felsenstein 1985), valores inferiores a 50 % não foram apresentados. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método de Jukes-Cantor (Jukes e Cantor, 1969). A análise foi realizada com base em 36 sequências de nucleotídeos. A análise evolutiva foi realizada utilizando o <i>software</i> MEGA5 (Tamura et al. 2011). Out-group: <i>E.coli</i>	125
Figura 5.32: Classificação dos clones termófilos dentro do Filo Firmicutes	126
Figura 5.33: Árvore filogenética construída a partir de distâncias evolutivas inferidas usando o método Neighbor-Joining (Saitou and Nei 1987). A porcentagem de réplicas da árvore está apresentada perto dos ramos e foi calculada com base em teste de <i>bootstrap</i> com 1000 réplicas (Felsenstein 1985), valores inferiores a 50 % não foram apresentados. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método de Jukes-Cantor (Jukes e Cantor, 1969). A análise foi realizada com base em 15 sequências de nucleotídeos. A análise evolutiva foi realizada utilizando o <i>software</i> MEGA5 (Tamura et al. 2011). Out-group: <i>E. coli</i>	131
Figura 5.34: Produção acumulada de hidrogênio (●) e consumo de substrato (■) do ensaio com a cepa CA.....	133
Figura 5.35: Ácidos orgânicos do ensaio com a cepa CA: (■) Ácido acético, (■) Ácido butírico	133
Figura 5.36: Efeito da pressão parcial de H ₂ na produção biológica do referido gás. Os números indicam: (1) metabolismo da glicose pela via da glicólise; (2) a descarboxilação oxidativa do piruvato pela ação da piruvato-ferredoxina oxidoreductase; (3) a formação de H ₂ pela ação da hidrogenase e (4) formação de ácido butírico. Fonte: Angenent et al. (2004) ..	134
Figura 5.37: Ácidos orgânicos do ensaio com a cepa C1 (■) Ácido acético, (■) Ácido butírico	136
Figura 5.38: Produção acumulada de hidrogênio (●) e consumo de substrato (■) do ensaio com a cepa C1.....	136

Figura 5.39: Produção acumulada de hidrogênio (●) e consumo de substrato (■) do ensaio com a cepa C5.....	137
Figura 5.40: Ácidos orgânicos do ensaio com a cepa C5: (■)Ácido acético, (■) Ácido butírico	137
Figura 5.41: Árvore filogenética construída a partir de distâncias evolutivas inferidas usando o método Neighbor-Joining (Saitou and Nei 1987). A porcentagem de réplicas da árvore está apresentada perto dos ramos e foi calculada com base em teste de <i>bootstrap</i> com 1000 réplicas (Felsenstein 1985), valores inferiores a 50 % não foram apresentados. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método de Jukes-Cantor (Jukes e Cantor, 1969). A análise foi realizada com base em 19 sequências de nucleotídeos. A análise evolutiva foi realizada utilizando o <i>software</i> MEGA5 (Tamura et al. 2011). Out-group: <i>E. coli</i>	140

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Produção de hidrogênio por microrganismos facultativos.....	37
Tabela 3.2: Produção de hidrogênio por microrganismos anaeróbios.....	38
Tabela 3.3: Comparação dos rendimentos de produção de hidrogênio a partir de variadas fontes de inóculo e substrato em temperaturas mesófilas e termófilas	53
Tabela 3.4 (continuação): Comparação dos rendimentos de produção de hidrogênio a partir de variadas fontes de inóculo e substrato em temperaturas mesófilas e termófilas	54
Tabela 4.1: Siglas adotadas para cada ensaio realizado.....	55
Tabela 4.2: Composição do meio de cultivo dos reatores anaeróbios em batelada com 2 g DQO L ⁻¹ (vinhaça)**	57
Tabela 4.3: Meio de cultivo PYG (<i>Peptone, Yeast extract, Glucose</i>) para isolamento dos microrganismos.....	64
Tabela 5.1: Caracterização dos dois lotes de vinhaça de cana-de-açúcar	76
Tabela 5.2: Produção de hidrogênio por microrganismos em culturas puras e consórcios microbianos	86
Tabela 5.3: Ensaio de produção de hidrogênio a 37 °C	90
Tabela 5.4: Ensaio de produção de hidrogênio a 55 °C	103
Tabela 5.5: DQO inicial e final, e eficiência de remoção de DQO para os ensaios mesófilos e termófilos.....	112
Tabela 5.6: DQO _{teórica} , DQO quantificada e relação DQO _t /DQO para os ensaios mesófilos	114
Tabela 5.7: DQO _{teórica} , DQO quantificada e relação DQO _t /DQO para os ensaios termófilos	115
Tabela 5.8: UTOs, número de clones, aproximação filogenética, porcentagem de similaridade, número de acesso e referência	124
Tabela 5.9: UTOs, número de clones, aproximação filogenética, porcentagem de similaridade, número de acesso e referência	130
Tabela 5.10: Denominação da cepa, classificação, aproximação filogenética, porcentagem de similaridade, número de acesso e referência	139

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Acetil-CoA – Acetil coenzima A

ADP – adenosina difosfato

AnSBR – Anaerobic Sequencing Batch Reactor

ATP – adenosina trifosfato

CG – bases nitrogenadas citosina e guanina

CH₄ – gás metano

CO₂ – gás carbônico

COD – *chemical oxygen demand*

CNTP – condição normal de temperatura e pressão

CoA – coenzima A

CSTR – *continuous stirred tank reactor*

DBO – demanda biológica de oxigênio

DGGE – *denaturing gradient gel electrophoresis*

DNA – *deoxyribonucleic acid*

DQO – demanda química de oxigênio

F – *forward*

Fd(ox) – ferredoxina oxidada

Fd(red) – ferredoxina reduzida

H₂ – gás hidrogênio

H₂ase – enzima hidrogenase

I – inóculo (lodo granular de UASB)

M12 – ensaio de produção de hidrogênio com 12g DQO L⁻¹ a 37 °C

M2 – ensaio de produção de hidrogênio com 2g DQO L⁻¹ a 37 °C

M5 – ensaio de produção de hidrogênio com 5g DQO L⁻¹ a 37 °C

M7 – ensaio de produção de hidrogênio com 7g DQO L⁻¹ a 37 °C

N₂ – gás nitrogênio

NAD – coenzima nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada

NADH – coenzima nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida

P – potencial de produção de hidrogênio (modelo modificado de Gompertz)

pb – pares de bases

PCR – polymerase chain reaction

PFL – enzima piruvato formiato liase

PFOR – enzima piruvato ferredoxina oxidoreductase

pH – potencial hidrogeniônico

PYG – Peptone, Yeast extract, Glucose

R – reverse

R_m – velocidade máxima de produção de hidrogênio

RNA_r – ácido ribonucléico ribossomal

SST – sólidos suspensos totais

SSV – sólidos suspensos voláteis

STV – sólidos totais voláteis

T12 – ensaio de produção de hidrogênio com 12g DQO L⁻¹ a 55 °C

T2 – ensaio de produção de hidrogênio com 2g DQO L⁻¹ a 55 °C

T5 – ensaio de produção de hidrogênio com 5g DQO L⁻¹ a 55 °C

T7 – ensaio de produção de hidrogênio com 7g DQO L⁻¹ a 55 °C

UASB – upflow anaerobic sludge blanket

UTO – unidade taxonômica operacional

UV – ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

°C – grau Celsius

atm – atmosfera

d – dia

g – grama

h – hora

Kg – kilograma

L – litro

mg – miligrama

MJ – megajoule

mL – mililitro

mmol – milimol

mol – mol

min – minuto

nm – nanômetro

Pa - Pascal

rpm – rotações por minuto

V – Volts

v – volume

μL - microlitro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	27
2. OBJETIVOS DO TRABALHO	30
3. REVISÃO DA LITERATURA	31
4. MATERIAL E MÉTODOS	55
4.1. Inóculo.....	56
4.2. Meio de cultivo	57
4.3. Fonte de carbono.....	58
4.3.1. Caracterização da vinhaça de cana-de-açúcar	58
4.4. Adaptação da biomassa à temperatura	59
4.5. Tratamento do inóculo	59
4.6. Adaptação da biomassa à fonte de carbono.....	60
4.7. Enriquecimento e manutenção de biomassa.....	60
4.8. Ensaios de produção de hidrogênio	61
4.9. Isolamento de microrganismos	62
4.9.1. Diluições seriadas	63
4.9.2. Isolamento por estriamento direto em placa	64
4.9.3. Isolamento em <i>roll-tube</i>	64
4.10. Ensaios de produção de hidrogênio com microrganismos isolados	66
4.11. Análises cromatográficas	66
4.11.1. Determinação da composição do biogás	66
4.11.2. Determinação dos metabólitos.....	66
4.12. Determinação de carboidratos totais solúveis	67

4.13. Análises microbiológicas	67
4.13.1. Exames microscópicos	67
4.13.2. Biologia molecular	68
4.13.2.1. Extração de DNA	68
4.13.2.2. Eletroforese em gel com gradiente desnaturante	68
4.13.2.3. Clonagem e sequenciamento.....	69
4.13.2.4. Quantificação de FeFe-hidrogenase por PCR em tempo real.....	70
4.13.2.5. Sequenciamento do DNA das cepas dos microrganismos isolados	70
4.14. Ajuste dos dados experimentais	71
4.15. Balanço de carbono.....	72
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
5.1. Caracterização da vinhaça de cana-de-açúcar	74
5.2. Adaptação do inóculo à temperatura	77
5.3. Adaptação do inóculo à fonte de carbono	77
5.4. Produção de hidrogênio e geração de metabólitos	80
5.4.1. Ensaio em temperatura mesófila	80
5.4.2. Ensaio em temperatura termófila	95
5.4.3. Análise comparativa da produção de hidrogênio em condição mesófila e termófila.....	108
5.5. Caracterização microbiana	116
5.5.1. Eletroforese em gel com gradiente desnaturante	116
5.5.2. PCR em tempo real	117

5.5.3.	Caracterização filogenética dos consórcios microbianos	119
5.5.3.1.	Caracterização filogenética do consórcio microbiano mesófilo.....	119
5.5.3.2.	Caracterização filogenética do consórcio microbiano termófilo.....	126
5.6.	Ensaio de produção de hidrogênio com os microrganismos mesófilos isolados ...	132
5.	CONCLUSÕES	141
6.	SUGESTÕES.....	143
	REFERÊNCIAS.....	144
	APÊNDICES	157

1. INTRODUÇÃO

A comunidade internacional tem expressado grande interesse em pesquisas acerca de fontes alternativas de energia e atenção especial tem sido colocada na produção e utilização de hidrogênio (H_2). Esse gás pode ser produzido a partir de combustíveis fósseis, da água e de biomassa. Contudo, para que essa tecnologia seja sustentável, a sua produção deve ser realizada a partir de fontes renováveis. Assim, a produção biológica de hidrogênio a partir de águas residuárias ou resíduos sólidos, além de ser considerada uma perspectiva interessante em relação à outros métodos, também pode ser econômica e ambientalmente favorável (Bartacek et al. 2007).

A produção biológica pode ser dividida em dois grupos: os processos dependentes de energia luminosa (biofotólise direta e indireta e a foto-fermentação) e a fermentação, a qual compreende as etapas de hidrólise e acidogênese da digestão anaeróbia (Bartacek et al. 2007).

A sustentabilidade do processo de produção biológica de hidrogênio depende muito das características quantitativas e qualitativas do substrato utilizado, porque, embora a maioria das pesquisas seja realizada com substratos puros (glicose, sacarose, amido e celulose), a produção em escala real requer a utilização de substratos mais complexos e de baixo custo (Bartacek et al. 2007).

O Brasil está entre um dos maiores produtores mundiais de etanol. O estímulo para produção de álcool como combustível foi iniciado pelo Programa Nacional do Álcool (1975) criado pelo governo federal. Entretanto, aumento significativo nos investimentos e subsídios nessa área só ocorreu após a segunda crise do petróleo, a partir de 1979. Desde então, a produção de álcool no país vem aumentando, juntamente com a geração da vinhaça, que é o principal resíduo líquido dessa produção (Silva et al. 2007).

Dentre os efluentes líquidos produzidos pelo setor sucroalcooleiro, a vinhaça é o que possui o maior potencial poluidor, cujos valores de demanda biológica e química de oxigênio

(DBO e DQO) estão entre 20 e 35 g L⁻¹. Dependendo das condições tecnológicas da destilaria e da matéria-prima utilizada podem ser gerados até 20 litros desse resíduo por litro de álcool produzido (Rossetto, 1987; Wilkie et al. 2000).

Devido aos avanços no tratamento biológico de águas residuárias, o problema da disposição final dos efluentes pode ser visto como uma oportunidade de geração de energia, por meio da produção dos gases metano e hidrogênio, utilizando a vinhaça como substrato para as bactérias que realizam tal processo (Espinosa-Escalante et al., 2008). Muitas espécies microbianas, pertencentes aos gêneros *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Caloramator* e *Thermoanaerobacterium*, entre outros, podem ser obtidas de amostras ambientais e purificadas em laboratório. Esses microrganismos têm potencial para realizar a produção biológica do gás hidrogênio por meio da utilização da matéria orgânica presente na vinhaça (Kotay e Das, 2008).

O uso desse efluente *in natura* pode ser potencialmente prejudicial para a produção biológica de hidrogênio já que os microrganismos podem ser suscetíveis às elevadas cargas orgânicas aplicadas (Kraemer e Bagley, 2007). Assim, ainda que o uso de resíduos com o mínimo de manipulação seja o ideal do ponto de vista prático, é importante avaliar o efeito da concentração dessa água residuária para o processo.

Mesmo que o aumento da concentração inicial de substrato tenha influência positiva no potencial de produção de hidrogênio, o rendimento do processo é outro parâmetro que deve ser levado em consideração, porque maiores rendimentos de hidrogênio tornam o processo mais interessante do ponto de vista econômico (Vrije et al. 2007).

Além da concentração inicial de substrato, a temperatura é outro fator que influencia a produção biológica de hidrogênio, sendo que a reação de produção do referido gás pode se tornar mais favorável com o aumento da temperatura (Hallenbeck, 2005).

Desse modo, a produção de hidrogênio a partir da vinhaça em temperatura termófila pode ser um processo mais atrativo do que em temperatura mesófila, considerando que esse resíduo é produzido em elevadas temperaturas (107° C) (Salomon e Lora, 2009).

A partir do cenário descrito, o principal objetivo do presente estudo foi avaliar a produção biológica de hidrogênio em diferentes concentrações de vinhaça de cana-de-açúcar utilizada como única fonte de carbono em temperatura mesófila e termófila. E, além disso,

caracterizar filogeneticamente o consórcio microbiano mesófilo e termófilo visando conhecer a diversidade de microrganismos responsáveis pelo processo.

2. OBJETIVOS DO TRABALHO

Avaliar a influência da concentração de substrato e da temperatura na produção biológica de hidrogênio a partir de vinhaça de cana-de-açúcar como única fonte de carbono em reatores em batelada.

2.1. Objetivos específicos

- Obter a partir de lodo granulado de reator UASB consórcios microbianos produtores de hidrogênio utilizando vinhaça de cana-de-açúcar como substrato em condição mesófila e termófila;
- Avaliar a influência da concentração de substrato no potencial e rendimento da produção de hidrogênio pelo consórcio microbiano mesófilo;
- Avaliar a influência da concentração de substrato no potencial e rendimento da produção de hidrogênio pelo consórcio microbiano termófilo;
- Avaliar a produção de ácidos orgânicos e solventes nos ensaios de produção de hidrogênio em condição mesófila e termófila;
- Caracterizar filogeneticamente para o Domínio *Bacteria* os consórcios microbianos mesófilo e termófilo para maior concentração de vinhaça aplicada;
- Isolar microrganismo mesófilo e termófilo produtor de hidrogênio;
- Avaliar o potencial e o rendimento de produção de hidrogênio em ensaios utilizando os microrganismos isolados como inóculo.

3. REVISÃO DA LITERATURA

A construção de uma sociedade sustentável exigirá, tanto, a redução da dependência do uso de combustíveis fósseis, quanto, da quantidade de resíduos que é gerada. Nesse sentido, o tratamento de água residuária e a cogeração de energia é uma alternativa tecnológica, na qual, esses dois objetivos podem ser atingidos simultaneamente. Recentemente, tem sido observada mudança de paradigma, de forma que a preocupação deixou de ser a problemática da disposição correta de resíduos no ambiente e passou a ser a busca pela melhor maneira de aproveitar os resíduos gerados (Angenent et al. 2004).

A fermentação para a produção de hidrogênio e a digestão anaeróbia completa com a produção de CH₄ estão entre as alternativas tecnológicas, baseadas em processos biológicos, que visam à geração de energia e de compostos de interesse comercial, ao mesmo tempo, em que é tratada água residuária agrícola e industrial. Contudo, para que essas tecnologias sejam aplicadas em escala real, muitas barreiras científicas e tecnológicas devem ser vencidas (Angenent et al. 2004).

Entre os candidatos à energia alternativa para o futuro, o hidrogênio tem recebido considerável atenção, uma vez que, é fonte de energia mais valiosa para as células a combustível (Kawagoshi et al. 2005).

Nas últimas décadas, estudos têm sido realizados no sentido de avaliar a produção de hidrogênio a partir de resíduos industriais e esgoto doméstico (Roychowdhury e Levandowsky, 1988; Thangaraj e Kulandaivelu, 1994; Tanisho e Ishiwata, 1994; Shin et al., 2004; Chen et al., 2006; Fernandes et al., 2010) visando à otimização e estabilidade do processo para que, de fato, no futuro, hidrogênio possa ser produzido em larga escala, de maneira viável, e possa ser amplamente utilizado como fonte de energia.

3.1. Hidrogênio

Hidrogênio é o elemento mais abundante no Universo, compondo 75 % da matéria em massa e o terceiro elemento mais abundante na superfície da Terra. Devido a sua elevada reatividade, o hidrogênio é quase sempre encontrado na natureza combinado com outros elementos. É um gás leve, invisível, atóxico e altamente inflamável, que não contribui diretamente com o efeito estufa (durante o processo de produção de energia) e que possui elevado calor de combustão (122 kJ g^{-1}) em comparação com outros combustíveis, como metano ($50,1 \text{ kJ g}^{-1}$) e etanol ($26,5 \text{ kJ g}^{-1}$) (Bartacek et al. 2007; Armaroli e Balzani, 2011).

Este gás pode ser utilizado diretamente em motores a combustão ou em células a combustível para a produção de eletricidade. Além disso, a combustão desse gás libera como único produto vapor de água, tornando-o fonte alternativa de energia ideal; ou seja, sem a liberação de compostos tóxicos no ambiente e gases do efeito estufa (Guo et al. 2010).

Entre outros usos, o hidrogênio pode ser utilizado como reagente em processo de hidrogenação, no qual ele é utilizado para saturar determinada molécula ou clivá-la removendo átomos heterogêneos como, por exemplo, átomos de enxofre e nitrogênio. Neste processo, a reação depende da pressão parcial do referido gás e, conseqüentemente, elevado grau de pureza e pressão são empregados. A maioria do hidrogênio é utilizada na indústria química e petroquímica. Entre seus principais usos, calcula-se que 50 % seja destinado para a produção de amônia, 37 % para o processamento de petróleo e 8 % na produção de metanol (Ramachandran e Menon, 1998).

3.2. Produção de hidrogênio

O hidrogênio pode ser produzido a partir de combustíveis fósseis, de biomassa e da água. Os métodos de produção de hidrogênio a partir de combustíveis fósseis são os seguintes: reforma a vapor do gás natural, craqueamento térmico do gás natural, oxidação parcial de hidrocarbonetos mais pesados do que nafta e gaseificação do carvão (Das e Veziroglu 2001).

A produção de hidrogênio a partir da biomassa pode ser realizada por meio da pirólise ou da gaseificação da biomassa, que gera uma mistura de gases composta por H_2 , CH_4 , CO_2 ,

CO e N₂. Os métodos de produção de hidrogênio a partir da água são os seguintes: eletrólise, fotólise, processos termoquímicos, decomposição térmica direta ou termólise e produção biológica (Das e Veziroglu 2001).

Dentre os métodos de produção de hidrogênio listados acima, a reforma do gás natural é responsável por aproximadamente 90 % da produção. A gaseificação do carvão e a eletrólise da água, também, são métodos aplicados industrialmente para a produção de hidrogênio. Contudo, esses métodos consomem, principalmente, combustíveis fósseis como fonte de energia e, às vezes, também a hidroeletricidade. Dessa maneira, a produção de hidrogênio por via termoquímica e eletroquímica não é considerada ambientalmente correta. Por outro lado, os processos biológicos de produção de hidrogênio podem ser mais vantajosos, uma vez que em sua maioria, são realizados em temperatura e pressão ambientes. Além de serem considerados, do ponto de vista ambiental, mais corretos, os processos de produção biológica podem abrir um novo caminho para a utilização de recursos energéticos renováveis, os resíduos, os quais são inesgotáveis (Das e Veziroglu 2001).

Microrganismos produzem hidrogênio por meio de duas vias principais: a fotossíntese e a fermentação. Os processos fotossintéticos, que são dependentes de energia luminosa, incluem a biofotólise direta e indireta e a foto-fermentação. Os microrganismos responsáveis por esses processos incluem algas, cianobactérias e bactérias fotossintéticas. Já o processo fermentativo, é conduzido por microrganismos anaeróbios estritos, facultativos ou aeróbios, como *Clostridium*, *Escherichia* e *Bacillus*, respectivamente (Nandi e Sengupta, 1998; Vardar-Schara et al. 2008).

A produção de hidrogênio por meio da biofotólise da água foi avaliada em algas verdes (*Clamdomonas reinhardtii*) (Hemschemeier et al. 2008) e cianobactérias (*Anabaena variabilis*) (Borodin et al. 2000). Esse processo pode ser considerado econômico e sustentável já que a água é um recurso renovável e o CO₂, um importante poluente atmosférico. Porém, a primeira desvantagem refere-se a inibição da atividade da hidrogenase devido a geração de oxigênio proveniente da hidrólise da água durante o processo fotossintético. Além disso, o baixo potencial de produção de hidrogênio e a impossibilidade do uso de resíduos, como substrato, são outras desvantagens desse processo metabólico. Assim, os processos fermentativos, tanto a foto-fermentação, como a fermentação no escuro, são considerados

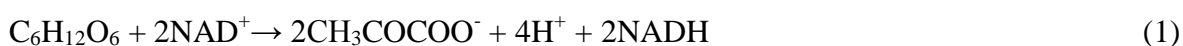
métodos mais vantajosos do que a biofotólise, no sentido de que é possível promover o tratamento de resíduos conjuntamente com a produção de hidrogênio (Kapdan e Kargi, 2006).

Outro processo biológico de produção de hidrogênio dependente de energia luminosa é a foto-fermentação, no qual ocorre a degradação de compostos orgânicos (resíduos) por meio do metabolismo de bactérias fototróficas anoxigênicas na presença de luz e ausência de oxigênio (Barbosa et al. 2001; Kapdan e Kargi, 2006).

Em contrapartida, a fermentação conhecida na literatura como *dark fermentation*, é mais vantajosa para a produção biológica de hidrogênio, quando comparada à foto-fermentação, por ser um processo que não depende da disponibilidade de luz. Além disso, ampla variedade de compostos orgânicos, entre eles, resíduos líquidos e materiais celulósicos insolúveis, pode ser utilizada como substrato. Destaca-se também que por meio dessa possibilidade metabólica é possível obter maiores rendimentos de hidrogênio, além de ser processo muito mais estável e simples de ser controlado (Nandi e Sengupta, 1998).

3.2.1. Fermentação

A produção fermentativa de hidrogênio ocorre por meio do metabolismo de microrganismos anaeróbios ou facultativos, que podem utilizar carboidratos, proteínas e lipídeos como substrato. Ainda que variedade de compostos orgânicos possa ser utilizada para a produção de hidrogênio, o passo metabólico comum a todos envolve a formação de piruvato a partir da glicose (1):



Nesse passo metabólico, além da formação do piruvato, são formados ATPs e também ocorre a redução de NAD^+ a NADH , os quais devem ser reoxidados. A oxidação dos NADH s é atingida pela formação de diversos compostos reduzidos. Nos microrganismos facultativos,

tem-se a formação de etanol e, em condições de pH ácido ($\text{pH} < 6$) pode ocorrer também a formação de lactato. Nos microrganismos anaeróbios estritos, a oxidação dos NADHs, acarreta a formação de compostos como, por exemplo, etanol, butirato, butanol e acetona (Hallenbeck e Gosh, 2012).

O passo seguinte é a formação de acetil-CoA, que pode ser gerada por meio da ação catalítica da piruvato formiato liase (PFL) (2) ou piruvato ferredoxina oxidoreductase (PFOR) (3) dependendo do microrganismo capaz de realizar tais vias metabólicas (Hallenbeck, 2005).



Assim, no primeiro caso (2) o hidrogênio é formado a partir do formiato por meio da do complexo FLH, o qual possui Ni-Fe hidrogenases. No caso dos anaeróbios estritos, a ferredoxina reduzida impulsiona a produção de hidrogênio pela Fe-Fe hidrogenase (3).

3.2.1.1. Microrganismos anaeróbios facultativos

A produção de hidrogênio por enterobactérias como, por exemplo, *Enterobacter aerogenes* e *Escherichia coli*, é derivada do formiato, o qual é quebrado em H_2 e CO_2 pela ação catalítica da enzima formiato hidrogênio liase (FHL). Condições de pH ácido e elevadas concentrações de formiato são necessárias para que ocorra a ativação da transcrição da enzima FHL (Figura 3.1). Assim, na maioria das condições, a FHL não é transcrita e a degradação do formiato é incompleta, portanto, reduzindo a produção de hidrogênio. Além disso, outro fato que leva à redução no rendimento é a indução da enzima lactato desidrogenase, que também

ocorre em condição ácida, por conseguinte, com formação de lactato a partir do piruvato, fazendo com que o potencial redutor presente no piruvato seja perdido com a formação de lactato ao invés da formação de formiato (Hallenbeck, 2005).

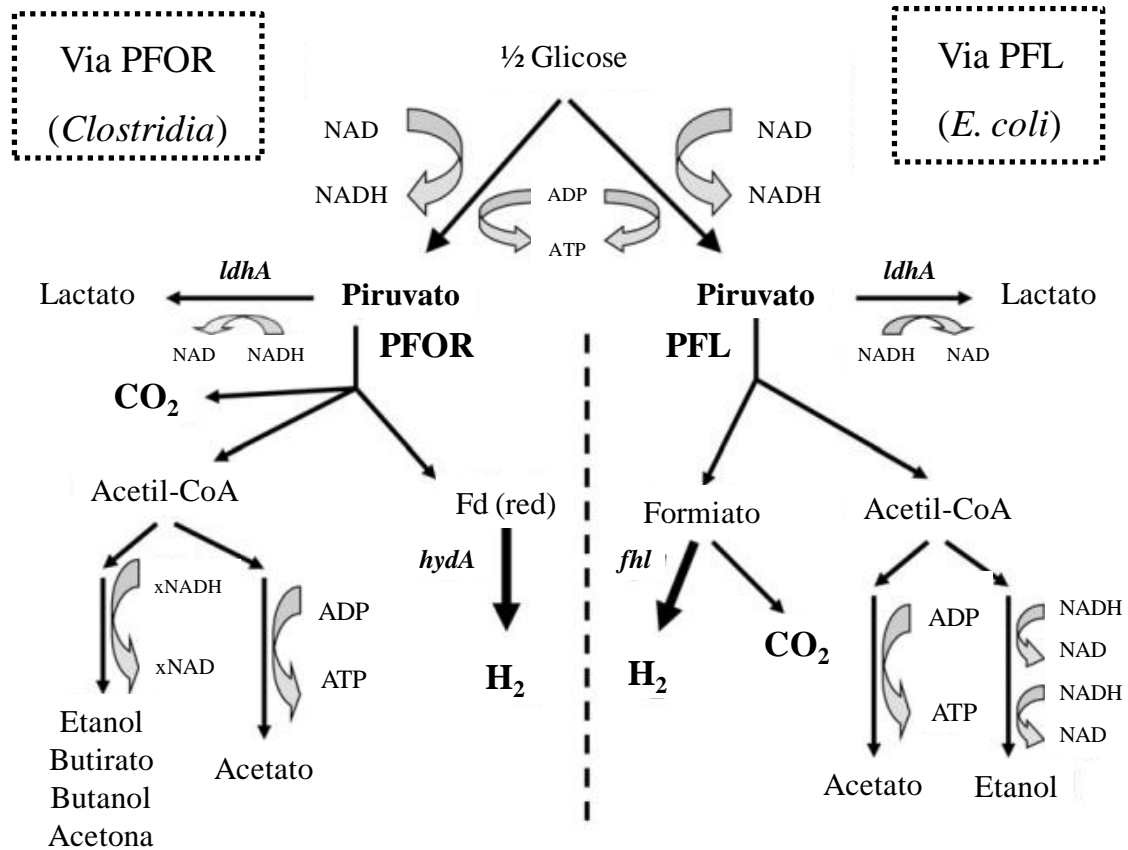


Figura 3.1: Via metabólica de produção de hidrogênio: microrganismos anaeróbios (lado esquerdo) microrganismos facultativos (lado direito). Fonte: Hallenbeck e Gosh (2012)

Dessa maneira, a fermentação mista de bactérias entéricas culmina com a geração de diversos metabólitos, tais como, etanol, butanodiol, lactato, acetato, H₂ e CO₂. A proporção relativa desses metabólitos depende do estado de oxidação do substrato, que controla a quantidade de produtos reduzidos necessários para balancear a fermentação por meio da regeneração de NAD⁺, os quais serão utilizados na glicólise. O rendimento teórico máximo que pode ser atingido por essas bactérias por meio da fermentação da glicose é de 2 mol H₂ mol⁻¹ glicose, contudo, na prática, é observada somente metade dessa quantidade (Hallenbeck, 2005). Entre os microrganismos utilizados em estudos de produção de

hidrogênio que exibem esse tipo de metabolismo estão incluídos os gêneros *Enterobacter*, *Escherichia* e *Citrobacter* (Tabela 3.1).

Tabela 3.1: Produção de hidrogênio por microrganismos facultativos

Microrganismo	Substrato	Rendimento (mol H ₂ mol ⁻¹ glicose)	Referência
<i>Citrobacter</i> sp CMC-1	glicose	1,82	Mangayil et al.(2011)
<i>Enterobacter asburiae</i> SNU-1	glicose	0,54	Shin et al. (2007)
<i>Escherichia coli</i>	glicose	1,45	Seppälä et al. (2011)

3.2.1.2. Microrganismos anaeróbios estritos

Entre as bactérias anaeróbias estritas, como, por exemplo, *Clostridium*, a fermentação ocorre por meio da hidrólise do piruvato pela ação da piruvato ferredoxina oxidorreductase (PFOR) com a produção de ferredoxina reduzida – Fd(red) e de acetil-CoA. A hidrogenase utiliza os elétrons provenientes da ferredoxina reduzida para produzir H₂ e Fd oxidada – Fd(oxi). A partir do acetil-CoA vários produtos podem ser gerados, por exemplo, acetato e ATP (Figura 3.1). Contudo, variedade de produtos reduzidos também pode ser produzida para regenerar NADH (reduzido) a NAD⁺ (oxidado). Dessa maneira, dependendo da espécie microbiana e da condição ambiental (pH) podem ser gerados, além de acetato, etanol, butirato, butanol e acetona. Todavia, a produção desses solventes pode reduzir ou inviabilizar a produção de hidrogênio. Portanto, as condições ambientais devem ser controladas de forma a evitar a solvetogênese, quando, o intuito é a produção de hidrogênio (Hallenbeck, 2005).

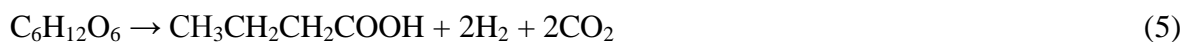
Microrganismos anaeróbios do gênero *Clostridium* são, sem dúvida, os mais utilizados em estudos de produção de hidrogênio em cultura pura. Em temperatura termófila, tem sido reportado o uso de *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*. O rendimento de hidrogênio obtido em estudos com estes microrganismos é bem variável. Na Tabela 3.2 é possível observar os valores de rendimentos reportados em alguns estudos.

Tabela 3.2: Produção de hidrogênio por microrganismos anaeróbios

Microrganismo	Substrato	Rendimento (mol H ₂ mol ⁻¹ substrato)	Referência
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	glicose	2	Chin et al (2003)
<i>Clostridium pasteurianum</i>	sacarose	*2,07	Lo et al. (2008)
<i>Clostridium butyricum</i> CGS2	xilose	0,73	
<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> KU001	glicose	2,4	Ueno et al. (2001a)
<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> PSU-2	sacarose	*2,53	O-Thong et al. (2008)

* mol H₂ mol⁻¹ hexose

O rendimento máximo de hidrogênio obtido a partir da fermentação da glicose por microrganismos anaeróbios estritos é de 4 mol H₂ mol⁻¹ glicose com formação exclusiva de ácido acético (4). Quando ocorre a formação de ácido butírico, esse rendimento é menor; ou seja, 2 mol H₂ mol⁻¹ glicose (5):



Entretanto, o acúmulo de ácido acético no meio não implica necessariamente em maior produção de hidrogênio, uma vez que, várias espécies microbianas, como, por exemplo, *Clostridium acetium* (Hawkes et al. 2007), podem converter dióxido de carbono e hidrogênio em ácido acético (6):



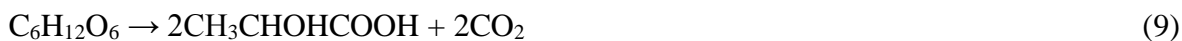
Na maioria dos casos é observada produção de uma mistura de ácido butírico e acético (7):



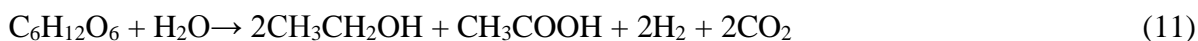
Porém, outros metabólitos podem ser gerados e, nesses casos a produção de hidrogênio pode não ser observada. A geração de ácido propiônico, por exemplo, culmina com o consumo de hidrogênio (8):



No caso da geração de ácido láctico, a produção de hidrogênio não é observada (9):



Quando ocorre a geração de etanol tem-se duas possibilidades: (a) não há produção de hidrogênio (10) e, portanto, isso seria uma rota indesejável; (b) geração de etanol, ácido acético e hidrogênio (11):



As reações apresentadas na maioria das vezes consideram a geração de único produto, mas sabe-se que a proporção molar dos ácidos, solventes e hidrogênio nos experimentos é bastante variável e depende das rotas metabólicas que estão ocorrendo em diferentes valores de pH (Zhu et al. 2009).

3.3. Culturas de microrganismos

Como detalhado nos itens anteriores, a produção fermentativa de hidrogênio pode ser realizada por vários microrganismos, os quais apresentam diversas necessidades nutricionais, preferência por tipo de substrato, pH e temperatura (Wang e Wan, 2009). Esses parâmetros não somente determinam o crescimento dos microrganismos, mas também determinam o tipo de metabolismo que irão exibir, fato que afeta fortemente o processo (Ntaikou et al. 2010).

Culturas mistas de microrganismos, obtidas a partir de amostras ambientais, tais como solo, sedimento e fontes termais e, também, aquelas provenientes de lodo de reator anaeróbio, sistema de lodos ativados (Baghchehsaraee et al. 2010), lodo de composteira (Ueno et al. 2001b), fluido ruminal (Chang et al. 2010), lixiviado (Liu et al. 2011), auto-fermentação (Fontes Lima e Zaiat, 2012), ou ainda culturas puras de microrganismos podem ser utilizadas como inóculo na produção de hidrogênio (Pan et al. 2008; Chong et al. 2009; Ngo et al. 2012). Além disso, esses microrganismos podem ser mesófilos (20-45°C), termófilos (40-65 °C) ou até hipertermófilos (65-80 °C) (Ntaikou et al. 2010).

3.3.1. Culturas puras

Diversas culturas puras são usadas na produção biológica de hidrogênio. Segundo Hallenbeck (2009), em alguns casos a intenção do uso de culturas puras é determinar as características de crescimento, produtos da fermentação e rendimentos de hidrogênio; ao invés de estudar, de fato, a produção de hidrogênio.

Uma das vantagens do uso de cultura pura refere-se a possibilidade de manipulação do metabolismo microbiano, por meio do controle das condições de cultivo, por conseguinte, a redução na geração de produtos indesejáveis, tais como, ácido propiônico e etanol, e o alcance de maior rendimento de hidrogênio. Por outro lado, culturas puras são muito sensíveis a contaminações e seu uso demanda, na maioria dos casos, a aplicação de condições de assepsia, que significam aumento significativo do custo do processo (Ntaikou et al. 2010).

Levin et al. (2006) avaliaram a produção de hidrogênio por *Clostridium thermocellum* 27405 a partir de substratos lignocelulósicos. Nath et al. (2006) utilizaram cepa *Enterobacter cloacae* DM11 para a produção de hidrogênio a partir de glicose. Xu et al. (2010) estudaram a produção de hidrogênio por *Ethanoligenens harbiense* B49 a partir de palha de milho pré-tratada; enquanto, Kotay e Das (2007) utilizaram *Bacillus coagulans* IIT-BT-S1 para a produção de hidrogênio a partir de diversas fontes de substratos.

3.3.2. Co-culturas

Outra possibilidade de obtenção de hidrogênio é por meio da utilização de co-culturas como inóculo para os reatores biológicos. Alguns trabalhos empregaram culturas que misturaram microrganismos anaeróbios estritos e facultativos (Qian et al. 2011; Beckers et al. 2010). Outros realizaram estudos empregando, somente, microrganismos anaeróbios estritos, como *Clostridium* (Hsiao et al. 2009; Geng et al. 2010).

O uso de inóculo composto por microrganismos facultativos e anaeróbios estritos pode ser uma vantagem em relação ao uso de culturas puras de bactérias anaeróbias, por exemplo. No caso desses co-cultivos, os microrganismos facultativos são responsáveis por consumir rapidamente o oxigênio presente e, dessa maneira, criar ambiente favorável para o crescimento das bactérias anaeróbias estritas (Qian et al. 2011).

Qian et al. (2011) estudaram o uso de co-cultura de microrganismo facultativo (bactéria E) e bactérias anaeróbias estritas (bactéria P e bactéria B) na produção biológica de

hidrogênio a partir de glicose. Nos ensaios com as culturas puras, o rendimento e taxa de produção de hidrogênio foram $1,1 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1}$ glicose e $118,3 \text{ mL H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$; $1,3 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1}$ glicose e $42,1 \text{ mL H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$; $1,2 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1}$ glicose e $70 \text{ mL H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, respectivamente para as bactérias E, P e B. Por outro lado, o uso do consórcio de bactérias (E, P e B) favoreceu maior rendimento ($1,88 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1}$ glicose) e taxa de produção de hidrogênio ($212 \text{ mL H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) em comparação com aqueles experimentos nos quais culturas puras foram utilizadas como inóculo.

Hsiao et al. (2009) estudaram a produção de hidrogênio por co-cultura de *Clostridium* (*C. tyrobutyricum* [T], *C. pasteurianum* [P] e *C. sporosphaeroides* [S]). Os autores obtiveram os seguintes valores para taxa e produção de hidrogênio em culturas puras: $1,9 \text{ mL H}_2 \text{ h}^{-1}$ e $36,8 \text{ mL H}_2$; $5,6 \text{ mL H}_2 \text{ h}^{-1}$ e $55,4 \text{ mL H}_2$; $1 \text{ mL H}_2 \text{ h}^{-1}$ e $41,3 \text{ mL H}_2$, respectivamente para T, P e S. Quando foram realizados ensaios com as culturas P e S juntas, os valores obtidos foram maiores; ou seja, $6,2 \text{ mL h}^{-1}$ e $93,3 \text{ mL H}_2$, respectivamente, para taxa e produção de hidrogênio. Por outro lado, para a combinação das culturas T e S, os valores obtidos foram inferiores; ou seja, $0,7 \text{ mL H}_2 \text{ h}^{-1}$ e 30 mL H_2 , respectivamente.

Segundo os autores (Op. cit.) a combinação entre *C. pasteurianum* e *C. sporosphaeroides* foi a mais adequada, uma vez que foi obtida maior produção de hidrogênio. Provavelmente, a primeira espécie foi responsável pela produção de hidrogênio, enquanto, a segunda exerceu papel importante na degradação do substrato. Portanto, pode-se concluir que embora todos os microrganismos utilizados sejam reconhecidamente produtores de hidrogênio, a combinação entre eles nem sempre favorece o processo de produção deste gás.

3.3.3. Consórcios microbianos

Em geral, para aplicação em larga escala, o uso de culturas mistas é considerado favorável e adequado, pelo menos, do ponto de vista da engenharia, já que a operação do processo é facilitada quando não há necessidade de esterilizar o meio de cultivo. Além disso, a aplicação de culturas mistas permite que ampla faixa de resíduos complexos seja utilizada como substrato (Hallenbeck e Ghosh 2009).

Por exemplo, Massanet-Nicolau et al. (2008) utilizaram consórcio microbiano e lodo de esgoto para a produção de hidrogênio. Os autores concluíram que três critérios são essenciais para a produção de H₂: (1) inativação de microrganismos metanogênicos, (2) maior disponibilidade de carboidratos para os microrganismos produtores de H₂ e (3) controle do pH. Quando esses critérios foram estabelecidos, os autores obtiveram rendimento de 0,37 mol H₂ mol⁻¹ hexose (18,14 L H₂ kg⁻¹ sólidos).

As culturas mistas são provenientes de inóculos naturais ou artificiais, os quais apresentam elevada diversidade microbiana, compreendendo, tanto, microrganismos produtores de hidrogênio, quanto, consumidores desse gás, como, por exemplo, arqueias metanogênicas, bactérias homoacetogênicas e bactérias redutoras de sulfato (Valdez-Vazquez e Poggi-Varaldo 2009; Hung et al. 2011).

Por isso, pré-tratamentos aplicados aos inóculos, como, por exemplo, choque térmico (Kim et al, 2006), choque ácido ou básico (Wang et al. 2008) são frequentemente utilizados com a finalidade de inativar os microrganismos metanogênicos e selecionar aqueles formadores de endósporos, tais como, *Clostridium*, *Bacillus* e *Thermoanaerobacterium*. Embora, a intenção principal da aplicação do tratamento térmico seja prevenir a metanogênese, esse tipo de tratamento não seleciona somente os microrganismos produtores de hidrogênio. Isso porque a produção de hidrogênio não está associada à capacidade dos microrganismos de esporular. Por exemplo, microrganismos não formadores de endósporos, tais como, *Enterobacter* e *Citrobacter*, podem produzir hidrogênio. Enquanto, outros microrganismos formadores de endósporos, tais como, *Acetobacterium*, alguns *Clostridium*, *Sporomusa* (homoacetogênicos), *Propionibacterium*, *Sporolactobacillus* (produtores de ácido propiônico e láctico, respectivamente) e *Desulfotomaculum* (redutores de sulfato) podem consumir hidrogênio (Kraemer e Bagley, 2007).

Poucos estudos foram realizados com a finalidade de comparar a produção de hidrogênio por inóculos submetidos ou não ao tratamento térmico (Oh et al. 2003; Kawagoshi et al. 2005). Kraemer e Bagley (2007) afirmaram que o tratamento térmico pode ser prejudicial ao invés de favorecer a produção de hidrogênio por selecionar somente microrganismos formadores de endósporos. De qualquer maneira, esse pré-tratamento foi empregado em diversos estudos de produção de hidrogênio (Lee et al. 2008; Wang e Wan

2008a; Lin et al. 2008; Maintinguer et al. 2008; Baghchehsaraee et al. 2008; Shida et al. 2009; Baghchehsaraee et al. 2010; Barros et al. 2011; Maintinguer et al. 2011).

Além dos pré-tratamentos, condições operacionais aplicadas aos reatores, tais como, manutenção do pH reduzido ($\text{pH} < 5,0$) e aplicação de curto tempo de detenção hidráulica (TDH) podem ser utilizados como estratégia para eliminar dos reatores microrganismos metanogênicos (Valdez-Vazquez e Poggi-Varaldo, 2009).

Com o uso de culturas mistas na produção biológica de hidrogênio, métodos de biologia molecular tornaram-se ferramentas importantes na análise e caracterização das comunidades microbianas envolvidas no processo. No entanto, ainda que estejamos vivendo na era das rápidas ferramentas moleculares, ainda existe demanda por técnicas tradicionais de microbiologia, como cultivo e enriquecimento microrganismos. Existem numerosos métodos moleculares utilizados para a caracterização de comunidades microbianas complexas como, clonagem e sequenciamento de fragmentos do RNAr 16S, T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism), FISH (Fluorescence In Situ Hybridization), qPCR (quantitative Polymerase Chain Reaction), e a PCR/DGGE (Polymerase Chain Reaction/Denaturing Gel Gradient Electrophoresis) (Briones e Raskin, 2003; Tolvanen e Karp, 2011).

Ainda, com relação ao tipo de inóculo que pode ser utilizado para a produção de H_2 , há trabalhos que lançam mão da técnica de bioaugmentação, que se refere à adição de microrganismos para melhorar determinados processos biológicos. No caso da produção biológica de hidrogênio, essa técnica foi utilizada, por exemplo, por Mohan et al. (2007) e Abreu et al. (2010) visando aumentar a produção do referido gás. Em ambos os estudos, foi verificado que a técnica de bioaugmentação aumentou a produção de hidrogênio. No estudo de Abreu et al. (2010), o lodo bioaugmentado apresentou taxa máxima de produção de hidrogênio no estado estacionário de $2,7 \text{ L H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$, enquanto que o outro lodo (não bioaugmentado) apresentou produção instável, sendo observados dois picos de produção, nos quais a taxa máxima de produção foi de $0,8 \text{ L H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ e $1,5 \text{ L H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$.

3.4. Substratos

Teoricamente, qualquer tipo de composto orgânico rico em carboidratos, gorduras ou proteínas pode ser utilizado como substrato para a produção de biohidrogênio (Ntaikou et al., 2010). Contudo, Lay et al. (2003) verificaram que a produção de hidrogênio por lodo anaeróbio tratado termicamente foi aproximadamente 20 vezes maior para substrato rico em carboidrato, em relação àqueles ricos em gorduras e proteínas.

A sustentabilidade da produção biológica de hidrogênio depende da matéria-prima utilizada; ou seja, a eficiência global do processo está diretamente relacionada com as propriedades físico-químicas dos substratos (Bartacek et al. 2007). O substrato considerado ideal para a produção sustentável de hidrogênio é aquele que possui elevado conteúdo de carboidratos, requer pré-tratamento mínimo, seja um recurso renovável, como os resíduos, e apresente baixo custo (Bartacek et al. 2007).

Sem dúvida, os compostos mais usados para a produção de hidrogênio são açúcares puros e simples, como, por exemplo, glicose, sacarose e xilose (Kumar e Das, 2000; Lin et al., 2004; Maintinguer et al. 2008; Maintinguer et al. 2011). Outros substratos mais complexos, todavia puros, tais como, celulose e amido, também têm sido empregados (Lay 2001; Liu e Shen, 2004).

De maneira a tornar o processo economicamente e ambientalmente mais vantajoso, alguns resíduos foram utilizados como substrato para a produção biológica de hidrogênio, ao invés de fontes puras de açúcares (Bartacek et al. 2007). Por exemplo, resíduos alimentícios (Shin et al. 2004), melaço (Tanisho e Ishiwata, 1994), vinhaça de cana-de-açúcar e esgoto sanitário (Fernandes et al. 2010) amido de batata (Yokoi et al. 2001), soro de queijo (Ferchichi et al. 2005; Castelló et al. 2009), entre outros.

3.4.1. Vinhaça de cana-de-açúcar

No Brasil, a produção de álcool como combustível em substituição à gasolina acarretou em aumento da geração de certos resíduos, como o bagaço de cana, a torta de filtro

e o vinhoto, o qual recebe diversas denominações dependendo da região do país, sendo elas vinhaça, vinhote, caldas, restilo, tiborna, caxixi ou garapão (Prada et al. 1997).

A vinhaça é um líquido de cor marrom escura com reduzido pH (3,0-4,0) e elevada carga orgânica (30 a 40 g DBO L⁻¹), o que a torna um resíduo aproximadamente 100 vezes mais poluente do que o esgoto doméstico. A composição química desse resíduo varia dependendo da característica do solo, da variedade da cana-de-açúcar, da estação do ano em que é feita a colheita e do processo industrial usado para a produção de etanol (Salomon e Lora, 2009).

A cada litro de álcool produzido são gerados aproximadamente 13 litros de vinhaça. Considerando que a produção de etanol na safra de 2008/2009 foi de 27,5 milhões de litros (União da Indústria de Cana-de-açúcar) a geração aproximada de vinhaça foi em torno de 357,5 milhões de litros. Com base nesses números e na perspectiva de que essa produção aumente a cada ano, cresce a preocupação com a destinação ambientalmente correta para tanto resíduo.

No Brasil, a vinhaça é utilizada na fertirrigação das plantações de cana-de-açúcar, pois é rica em potássio. Todavia, devido ao elevado teor de nutrientes deste resíduo as agências ambientais estão limitando a quantidade de vinhaça aplicada ao solo. Além disso, a grande desvantagem do uso da vinhaça como fertilizante reside nos elevados custos de transporte para levar este resíduo às plantações (Salomon e Lora, 2009). Por esses motivos, diversos estudos estão sendo realizados com o objetivo de descobrir novas formas de tratamento e disposição para a vinhaça. A biodigestão desse resíduo concomitante com a produção energia foi estudada por Siles et al. (2011) para a produção do gás metano; enquanto, Buitron e Carvajal (2010) estudaram a geração do gás hidrogênio. Por outro lado, Espinoza-Escalante et al. (2009) avaliaram a digestão anaeróbia da vinhaça visando a geração de ambos os gases, hidrogênio e metano.

Além desses autores, Fernanades et al. (2010) avaliaram o potencial de produção de H₂ a partir de esgoto sanitário, vinhaça e glicerol em reatores em batelada. Segundo os autores, dentre os substratos utilizados, a vinhaça foi o que apresentou o maior potencial (17 mmol H₂ g⁻¹ SSV), maior taxa (3,1 mmol H₂ g⁻¹ SSV h⁻¹) e maior rendimento de produção de H₂ (25 mmol H₂ g⁻¹ DQO).

3.4.2. Concentração de substrato

Resíduos como a vinhaça, que apresentam elevada concentração de matéria orgânica, presença de metais pesados, entre outros compostos, podem inibir o processo de produção biológica de hidrogênio se utilizada sem diluição devido à toxicidade. Tem sido demonstrado por diversos autores que dentro de certa faixa, o aumento na concentração do substrato pode aumentar o potencial, a taxa e o rendimento de produção de hidrogênio. Porém, em concentrações muito elevadas o processo pode ser desfavorecido culminando em menores rendimentos. Ademais, não existe consenso acerca da concentração ótima de determinado substrato que aumente o potencial de produção e, principalmente, o rendimento do processo (Wang e Wan 2009).

Liu e Shen (2004) estudaram o efeito das condições de cultivo, tais como, pH inicial (4,0 a 9,0), concentração de ferro (1,2 a 100 mg de $\text{Fe}^{2+} \text{L}^{-1}$), nitrogênio (0,56 a 11,28 g de $\text{NH}_4\text{HCO}_3 \text{L}^{-1}$) e amido (2 a 32 g L^{-1}) na produção biológica de hidrogênio por cultura mista a 35 °C. Após escolhido o pH ótimo (8,0) e as concentrações de ferro (10 mg. L^{-1}) e nitrogênio (5,64 g L^{-1}), os autores avaliaram a influência da concentração inicial de substrato na produção biológica de hidrogênio. A produção aumentou de 31 mL H_2 (2 g L^{-1}) para 240 mL H_2 (32 g L^{-1}) para maiores concentrações de substrato. Já a taxa máxima de produção aumentou de 0,3 mL $\text{H}_2 \text{h}^{-1}$ (2 g L^{-1}) para 4,2 mL $\text{H}_2 \text{h}^{-1}$ (24 g L^{-1}) e diminuiu para 2,9 mL $\text{H}_2 \text{h}^{-1}$ quando foi aplicada maior concentração de substrato (32 g L^{-1}). Todavia, o rendimento teve comportamento contrário ao da produção de hidrogênio, ou seja, reduziu-se com o aumento da concentração de substrato. Por exemplo, para 2 g L^{-1} e 32 g L^{-1} , os autores, obtiveram 194 mL $\text{H}_2 \text{g}^{-1}$ amido e 86 mL $\text{H}_2 \text{g}^{-1}$ amido, respectivamente.

Chen et al. (2006) estudaram a produção de hidrogênio a partir de diferentes substratos e concentrações: sacarose (0,3 a 17,9 g DQO L^{-1}), leite desnatado em pó (2 a 96 g DQO L^{-1}) e resíduo alimentício (0 a 32,3 g DQO L^{-1}), em pH 5,5 a 36 °C, com inóculo proveniente de lodo de digestor anaeróbico. Segundo os autores, em geral, o potencial e a taxa de produção de hidrogênio aumentaram para concentrações crescentes de substrato. Todavia, com relação ao rendimento, foi possível observar que houve aumento até determinada concentração de

substrato e depois diminuição para concentrações mais elevadas. Os rendimentos foram de 234 mL H₂ g⁻¹ DQO (4,5 g sacarose L⁻¹), 119 mL H₂ g⁻¹ DQO (4 g leite em pó L⁻¹) e 101 mL H₂ g⁻¹ DQO (4,6 g resíduo alimentício L⁻¹). Os autores justificaram o maior rendimento para a sacarose devido ao maior conteúdo de carboidratos em relação aos outros dois substratos. Apesar de terem sido estudadas diferentes faixas de concentração de substrato, os maiores rendimentos foram obtidos em concentrações iniciais similares e em torno de 4 g L⁻¹.

Wang e Wan (2008a) estudaram o efeito da concentração de substrato (0 a 300 g L⁻¹) na produção fermentativa de hidrogênio por culturas bacterianas mistas a 35 °C em pH 7,0. A taxa (15,1 mL H₂ h⁻¹) e o potencial de produção de hidrogênio (426,8 mL H₂) foram maiores para concentração inicial de substrato de 25 g L⁻¹. Contudo, o maior rendimento (384,3 mL H₂ g⁻¹ glicose) e a maior porcentagem de consumo de substrato (97,6 %) foram observados para concentração inicial de 2 g L⁻¹.

Ao contrário de outros estudos, Wang e Wan (2008a) observaram que a produção de hidrogênio foi maior com o aumento da concentração de substrato. Esses autores verificaram que a produção aumentou acentuadamente até a concentração inicial de 10 g L⁻¹ atingindo valor aproximado de 400 mL H₂. Para concentração de 25 g glicose L⁻¹ o aumento da produção foi sutil (426,8 mL H₂). Os autores verificaram também que para 300 g glicose L⁻¹ foi observada diminuição da produção de hidrogênio, cujo valor mínimo foi de 25 mL H₂.

Possivelmente, o comportamento de produção de hidrogênio observado por Wang e Wan (2008a) foi diferente daqueles reportados por outros autores devido à faixa de concentração inicial de substrato estudada (0 a 300 g L⁻¹), a qual foi ampla e, além disso, as maiores concentrações (100, 200 e 300 g L⁻¹) foram elevadas se comparadas com aquelas testadas em outros trabalhos.

Ngo et al. (2012) estudaram a produção de hidrogênio por *Thermotoga neapolitana* DSM 4359 em reatores em batelada a 75 °C a partir de diferentes concentrações de xilose (2 g L⁻¹ a 8 g L⁻¹). Segundo os autores a melhor produção foi observada para a concentração inicial de xilose de 5 g L⁻¹ (32 mmol H₂ L⁻¹ cultura), contudo, o maior rendimento foi de 1,7 mol H₂ mol⁻¹ xilose para concentração inicial de substrato de 2 g L⁻¹, enquanto, para 5 g L⁻¹ o rendimento foi 1,1 mol H₂ mol⁻¹ xilose.

3.5. Temperatura

Além do tipo de inóculo, da quantidade e qualidade do substrato, a temperatura é outro importante fator que afeta os processos biológicos de produção de hidrogênio, uma vez que, influencia o metabolismo dos microrganismos produtores de hidrogênio e, por conseguinte, o rendimento do processo e a distribuição dos metabólitos produzidos. Devido à variedade e complexidade dos resíduos utilizados como substrato, das condições operacionais e do tipo de inóculo, não é possível determinar a temperatura ótima a partir dos dados apresentados na literatura. A maioria dos trabalhos é realizada em faixa de temperatura mesófila (26-40 °C) (Lin et al. 2006; Abreu et al. 2011). Porém, a produção de hidrogênio foi avaliada também em temperatura termófila (45-60 °C) (Cheong e Hansen, 20007; Ren et al. 2008) e hipertermófila (> 70 °C) (Kadar et al. 2004; Abreu et al. 2010).

Segundo van Niel et al. (2002), a produção de hidrogênio em elevadas temperaturas apresenta vantagens, tais como, maior taxa de produção de H₂, maior biodisponibilidade dos substratos devido a maior solubilidade dos mesmos, melhor transferência de H₂ da fase líquida para a fase gasosa e menor risco de contaminação por microrganismos mesófilos não produtores de H₂. Todavia, ainda que em condição termófila, o rendimento e a taxa de produção específica sejam maiores do que em condição mesófila, a taxa de produção volumétrica de hidrogênio pode ser inferior, já que culturas termófilas em meio líquido não atingem elevadas densidades celulares (Hallenbeck, 2005).

Além disso, apesar dos indicativos apresentados, de que em condição termófila, a produção de hidrogênio possa ser mais vantajosa, os dados encontrados na literatura nem sempre corroboram com essa afirmação.

Wang e Wan (2008b) estudaram o efeito da temperatura (20 a 55 °C) na produção de hidrogênio por cultura bacteriana mista a partir de glicose em pH 7 em testes em batelada. Os autores verificaram que o aumento da temperatura até 40 °C influenciou positivamente o potencial de produção de hidrogênio (270 mL H₂), o rendimento (275,1 mL H₂ g⁻¹ glicose), bem como, a eficiência de degradação de substrato (98,1 %). Porém, a maior taxa produção de hidrogênio (31,9 mL H₂ h⁻¹) foi observada a 35 °C. Os menores valores de potencial

(~ 100 mL), taxa máxima de produção de hidrogênio (~ 6mL h⁻¹) e porcentagem de degradação de substrato (~ 49 %) foram observados a 55 °C. Portanto, para esse trabalho a faixa de temperatura mesófila foi mais adequada do que a termófila.

Alguns trabalhos são realizados para avaliar exclusivamente a influência da faixa de temperatura na produção biológica de hidrogênio, como, por exemplo, Wang e Wan (2008b), mas, há aqueles que procuram avaliar a influência de mais de um fator, como foi reportado nos trabalhos a seguir.

Fang et al. (2006) avaliaram a influência do pH (4,0 a 7,0), da concentração de substrato (2,7 a 22,1 g carboidratos L⁻¹) e temperatura (37 e 55 °C) na produção biológica de hidrogênio utilizando lodo de digestor anaeróbico como inóculo. Os autores observaram que a produção de hidrogênio aumentou de 115 para 510 mL H₂ com o aumento da concentração de substrato de 2,7 para 22,1 g carboidratos L⁻¹, em testes realizados a 37 °C e pH 4,5. Por outro lado, a taxa máxima de produção e o rendimento de hidrogênio tiveram comportamento diferente da produção de hidrogênio, contudo semelhantes entre si. Os valores máximos foram de 7,3 mL H₂ h⁻¹ e 346 mL H₂ g⁻¹ carboidrato, para a taxa e rendimento, respectivamente, para concentração inicial de substrato de 5,5 g carboidratos L⁻¹. Na mesma condição de concentração inicial de substrato e pH, o rendimento de hidrogênio observado em temperatura termófila foi de 210 mL H₂ g⁻¹ carboidrato, menor do que o apresentado para a condição mesófila (346 mL H₂ g⁻¹ carboidrato).

Shin et al. (2004), estudaram o efeito da temperatura (35 e 55 °C) e da concentração inicial de substrato (3 a 10 g STV L⁻¹) na produção biológica de hidrogênio, utilizando como inóculo consórcios microbianos mesófilo e termófilo e resíduos alimentícios como substrato. Nos primeiro testes, os autores avaliaram o efeito da temperatura e, observaram melhores resultados na condição termófila (40,1 mL H₂) do que na mesófila (2,5 mL H₂). Com base nesses resultados, os ensaios posteriores, foram conduzidos para avaliar a influência da concentração inicial de substrato na produção biológica de hidrogênio, utilizando somente consórcio microbiano termófilo a 55 °C. A produção de hidrogênio foi influenciada positivamente pela concentração inicial de substrato, cujos valores foram os seguintes: 69 mL H₂ (3 g STV L⁻¹), 274 mL H₂ (6 g STV L⁻¹), 297 mL H₂ (8 g STV L⁻¹) e 350 mL H₂ (10 g STV L⁻¹). Todavia, o rendimento de hidrogênio obtido não seguiu a mesma tendência; ou seja, 0,9 mL H₂ mol⁻¹ hexose (3 g STV L⁻¹), 1,8 mL H₂ mol⁻¹ hexose (6 g STV L⁻¹), 1,5 mL H₂ mol⁻¹ hexose (8 g STV L⁻¹) e 1,4 mL H₂ mol⁻¹ hexose (10 g STV L⁻¹).

A maior produção de hidrogênio reportada por Shin et al. (2004) nos ensaios termófilos está, possivelmente, associada aos dois tipos de inóculos utilizados. Fang et al. (2006) reportaram resultados contrários, ou seja, maior produção de hidrogênio nos experimentos realizados a 37 °C do que naqueles a 55 °C. Todavia, esses últimos autores utilizaram somente um tipo de inóculo, tanto, para os ensaios mesófilos, como, para os termófilos, cuja origem foi biomassa de digestor anaeróbio aplicado ao tratamento de esgoto sanitário mantido em temperatura ambiente.

Xing et al. (2008) também avaliaram o efeito da temperatura (25 a 44 °C), pH (3,5 a 9,0) e concentração inicial de substrato (5 a 20 g glicose L⁻¹) no rendimento, na taxa de produção biológica de hidrogênio e na eficiência de degradação do substrato por *Ethanoligenens harbinense* YUAN-3 em testes em batelada. Com base na taxa de produção de hidrogênio, os autores afirmam que, em geral, a condição ótima foi em pH 5, para concentração inicial de 10 g glicose L⁻¹ a 35 °C. Porém, se o rendimento de hidrogênio fosse o parâmetro analisado para definir tais condições a temperatura ótima seria de 37 °C (1,34 mol mol⁻¹ glicose).

Lee et al. (2008) estudaram o efeito da temperatura e da concentração de substrato na produção de hidrogênio a partir de amido de mandioca. Os autores observaram que a produção de hidrogênio, em termos de potencial de produção, foi maior a 37 °C (1.447 mL H₂) do que a 55 °C (241 mL H₂). Todavia, considerando o rendimento de hidrogênio, o maior valor foi observado a 55 °C (1,44 mmol g⁻¹ amido e 1 mmol g⁻¹ amido a 37 °C) (Tabela 3.3). Porém, para os testes do efeito de concentração de substrato, foi escolhida a temperatura mesófila. Nesses ensaios, o potencial de produção e rendimento de produção de hidrogênio aumentou em relação às maiores concentrações de substrato. Esses valores foram de 957, 2.771, 4.128 e 5.964 mL H₂; 1, 8,6, 9,5 e 11,2 mmol H₂ g⁻¹ amido para concentrações de substrato de 8, 16, 24 e 32 g DQO L⁻¹, respectivamente.

O-Thong et al. (2008) isolaram cepa de *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* (PSU-2) e estudaram a influência da temperatura de incubação e da concentração inicial de substrato na produção de hidrogênio a partir de sacarose. A taxa de produção de hidrogênio e o crescimento celular aumentaram para concentrações crescentes de substrato até 20 g L⁻¹. Acima dessa concentração, tanto, a taxa de produção, como, o

crescimento celular diminuíram gradualmente. Ao contrário da tendência observada para os parâmetros citados, os valores de rendimento de hidrogênio decresceram com o aumento da concentração de substrato, sendo que o maior valor foi de $5,45 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1}$ sacarose a 5 g L^{-1} (menor concentração) e o menor foi de $0,87 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1}$ sacarose a 50 g L^{-1} (maior concentração).

Esses autores destacaram que a produção de hidrogênio a partir de concentrações crescentes de substrato deve ser avaliada ponderando-se, tanto, a eficiência técnica, avaliada com base no rendimento de hidrogênio, quanto, a eficiência econômica, mensurada por meio da taxa de produção. Contudo, essa consideração não é feita pela maioria dos autores, os quais elegem somente um parâmetro para avaliar a melhor condição experimental para a produção de hidrogênio.

De acordo com os estudos de Lee et al. (2008) e Ngo et al. (2012), é possível perceber que o potencial de produção de hidrogênio foi o parâmetro levado em consideração para se eleger a melhor condição experimental em detrimento do rendimento. Todavia, sob o ponto de vista da presente autora, esse último parâmetro tem mais importância para a avaliação da viabilidade econômica do processo.

Para finalizar o item 3, estão apresentados na Tabela 3.3 os resultados de trabalhos que avaliaram a influência da temperatura, da concentração inicial de substrato ou de ambos os parâmetros na produção biológica de hidrogênio por diversos tipos de inóculos.

Ainda, a partir dos dados apresentados na Tabela 3.3 é possível concluir que não há consenso sobre qual é a concentração de substrato e temperatura ideais para aumentar a produção. Ademais, já que é sabido que diversas variáveis exercem influência no processo, é possível que algumas combinações, tais como, o uso de certo tipo de inóculo, substrato e temperatura, promovam melhores resultados do que outras. Desse modo, a comparação entre os resultados fica de certa maneira prejudicada.

Tabela 3.3: Comparação dos rendimentos de produção de hidrogênio a partir de variadas fontes de inóculo e substrato em temperaturas mesófilas e termófilas

Inóculo	Substrato	Concentração de substrato (g L ⁻¹)	Reator	Temperatura (°C)	Rendimento	Referência
Lodo anaeróbio	glicose	1	batelada	40 (20-55)	275,1 mL H ₂ g ⁻¹ glicose	Wang e Wan (2008b)
Lodo anaeróbio	glicose	2 (0-300)	batelada	35	384,3 mL H ₂ g ⁻¹ glicose	Wang e Wan (2008a)
<i>Ethanoligenes harbiense</i> YUAN-3	glicose	10	batelada	37 (20-44)	1,34 mol H ₂ mol ⁻¹ glicose	Xing et al. (2008)
		10 (5-20)		35	1,84 mol H ₂ mol ⁻¹ glicose	
Lodo de digestor anaeróbio	lodo de arrozal	5,5(2,7-22,1)	batelada	37	346 mL H ₂ g ⁻¹ carboidrato	Fang et al. (2006)
		5,5		55	210 mL H ₂ g ⁻¹ carboidrato	
<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> PSU-2	sacarose	5 (5-50)	batelada	60	5,4 mmol H ₂ mol ⁻¹ sacarose	O-Thong et al. (2008)
Composto de esterco bovino	sacarose	5 (2-6)	batelada	36	146,5 mL H ₂ g ⁻¹ substrato	Fan et a. (2004)
<i>Thermotoga neapolitana</i> DSM 4359	xilose	2 (2-8)	batelada	75	1,7 mol H ₂ mol ⁻¹ xilose	Ngo et al. (2012)
Consórcio bacteriano	amido	2 (2-32)	batelada	35	194 mL H ₂ g ⁻¹ amido	Liu e Shen (2004)

Tabela 3.4 (continuação): Comparação dos rendimentos de produção de hidrogênio a partir de variadas fontes de inóculo e substrato em temperaturas mesófilas e termófilas

Inóculo	Substrato	Concentração de substrato (g L ⁻¹)	Reator	Temperatura (°C)	Rendimento	Referência
Lodo anaeróbio	amido	4,6	batelada	37	47 mL H ₂ g ⁻¹ amido	Zhang et al. (2003)
				55	78 mL H ₂ g ⁻¹ amido	
				55	67 mL H ₂ g ⁻¹ amido	
Lodo de digestor anaeróbio	amido de mandioca	16 (g DQO L ⁻¹)	batelada	37	1 mmol H ₂ g ⁻¹ amido	Lee et al. (2008)
				55	1,4 mmol H ₂ g ⁻¹ amido	
				37	11,2 mmol H ₂ g ⁻¹ amido	
Lodo de digestor anaeróbio	sacarose	4,5 (0,3-17,9) (g DQO L ⁻¹)	batelada	36	234 mL H ₂ g ⁻¹ DQO	Chen et al. (2006)
	resíduo alimentício	4,6 (0-32,3) (g DQO L ⁻¹)			101 mL H ₂ g ⁻¹ DQO	
	leite desnatado em pó	4 (2-96) (g DQO L ⁻¹)			119 mL H ₂ g ⁻¹ DQO	
Cultura mesófila	resíduo alimentício	2 g STV L ⁻¹	batelada	35	0,05 mol H ₂ mol ⁻¹ hexose	Shin et al. (2004)
Cultura termófila				55	0,8 mol H ₂ mol ⁻¹ hexose	
				6 (3-10) (g STV L ⁻¹)	1,8 mol H ₂ mol ⁻¹ hexose	

4. MATERIAL E MÉTODOS

Nesse item serão apresentados os materiais e métodos utilizados para a realização deste trabalho: origem do inóculo (item 4.1), meio de cultivo (item 4.2), fonte de carbono (item 4.3), etapa de adaptação da biomassa às temperaturas de estudo (item 4.4), procedimento utilizado para o tratamento do inóculo (item 4.5), etapa de adaptação da biomassa à vinhaça (item 4.6), etapa de enriquecimento e manutenção da biomassa microbiana (item 4.7), os ensaios de produção de hidrogênio com os consórcios microbianos enriquecidos (item 4.8), etapa de isolamento de microrganismos (item 4.9), os ensaios de produção de hidrogênio com as cepas microbianas isoladas (item 4.10), as análises cromatográficas (H₂, CO₂, ácidos e alcoóis) (item 4.11), a determinação da concentração do substrato (item 4.12) e as análises microbiológicas (item 4.13). Na Figura 4.1 está apresentado o fluxograma experimental geral do trabalho.

Para facilitar a identificação de cada ensaio realizado e a apresentação dos resultados, as seguintes siglas foram adotadas (Tabela 4.1):

Tabela 4.1: Siglas adotadas para cada ensaio realizado

Ensaio	DQO _{inicial} (g L ⁻¹)	Sigla adotada
Mesófilos	1,8	M2
	5,4	M5
	7,1	M7
	12,6±1	M12
Termófilos	1,8	T2
	4,8	T5
	7,5	T7
	12,6±1	T12

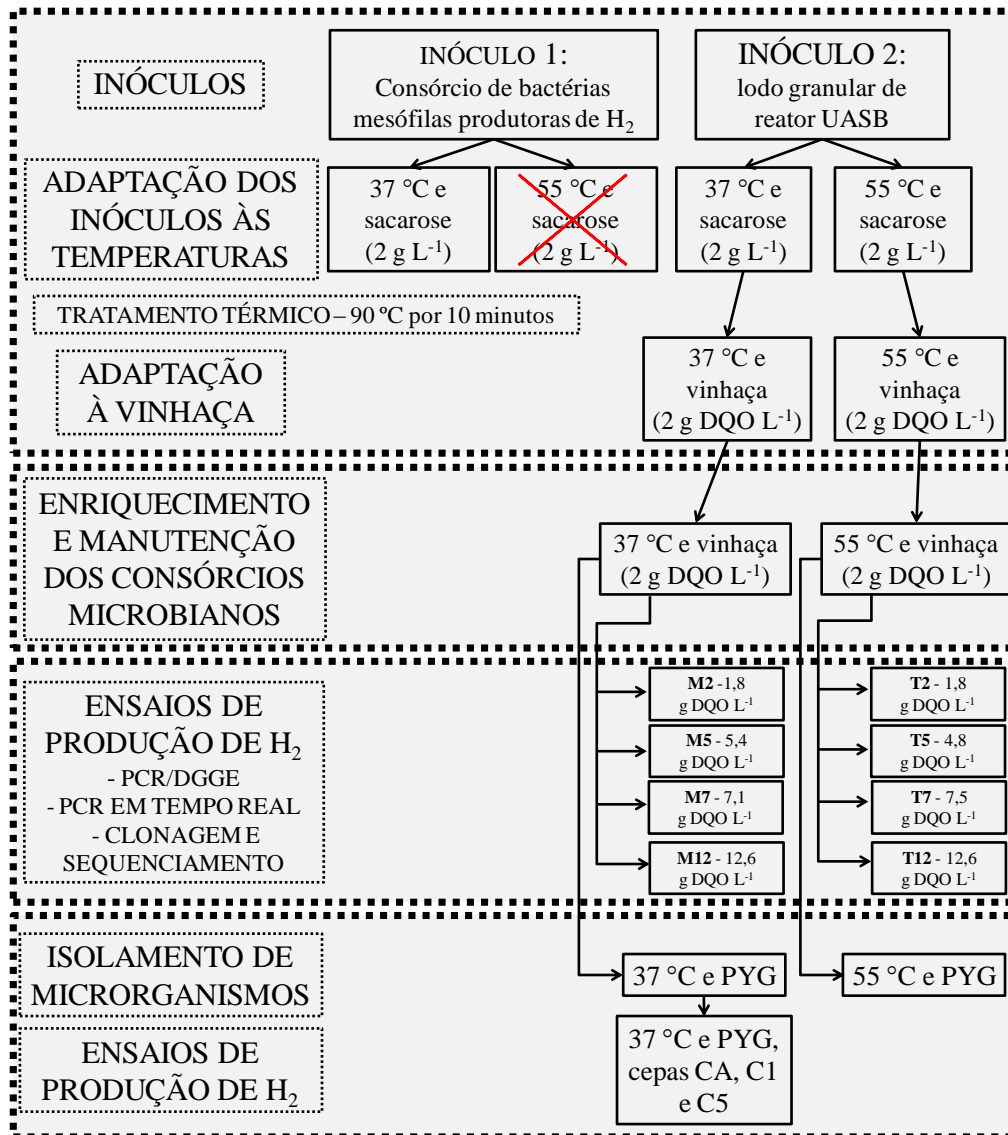


Figura 4.1: Fluxograma experimental

4.1. Inóculo

Os inóculos utilizados foram lodo granulado de reator anaeróbico de fluxo ascendente e manta de lodo utilizado no tratamento de água residuária de avicultura (Avícola Dacar – Tiête – SP) e consórcio de bactérias anaeróbicas mesófilas produtoras de hidrogênio fornecido por Maintinguer (2008).

4.2. Meio de cultivo

O meio de cultivo utilizado em todas as etapas desse trabalho foi modificado de Del Nery (1987) pela adição das soluções de vitaminas e substituição da fonte de carbono original por vinhaça de cana-de-açúcar (Tabela 4.2). O pH inicial do meio de cultivo foi ajustado para 5,5 com lentilhas de NaOH.

Tabela 4.2: Composição do meio de cultivo dos reatores anaeróbios em batelada com 2 g DQO L⁻¹ (vinhaça)**

Composto	Concentração (mL L ⁻¹)
Solução de Vitaminas:	
ácido <i>p</i> -aminobenzóico (0,04 g L ⁻¹)	1
biotina (0,01 g L ⁻¹)	
Solução A:	
NiSO ₄ 6H ₂ O (0,5 g L ⁻¹)	
FeSO ₄ 7H ₂ O (2,5 g L ⁻¹)	4
FeCl ₃ 6H ₂ O (0,25 g L ⁻¹)	
CoCl ₂ 2H ₂ O (0,04 g L ⁻¹)	
Solução B:	
CaCl ₂ 6H ₂ O (2,06 g L ⁻¹)	4
Solução C:	
SeO ₂ (0,144 g L ⁻¹)	4
Solução D:	
KH ₂ PO ₄ (5,36 g L ⁻¹)	
K ₂ HPO ₄ (1,30 g L ⁻¹)	4
Na ₂ HPO ₄ H ₂ O (2,76 g L ⁻¹)	

* Fonte: Modificado de Del Nery (1987)

** para maiores concentrações de vinhaça foram adicionados, proporcionalmente, maiores volumes das soluções de vitaminas e de nutrientes

4.3. Fonte de carbono

A fonte de carbono utilizada foi vinhaça de cana-de-açúcar coletada em destilaria de álcool (Destilaria Nova Era Ltda (Ibaté/São Paulo – Brasil). Dois lotes de vinhaça de cana-de-açúcar foram coletados na mesma destilaria em diferentes períodos do ano: 20 de janeiro e 20 de outubro de 2010.

A vinhaça foi coletada em galões de 5 litros e levada ao laboratório, onde foi transferida e homogeneizada em frascos apropriados de 30 litros. Alíquotas foram transferidas para frascos de plásticos (0,25 L) e mantidos em freezer até o uso. Amostra homogeneizada da vinhaça, antes do congelamento foi usada para caracterização analítica. Antes do uso, tanto na fase de caracterização, como na utilização nos ensaios em reatores em batelada, a vinhaça foi centrifugada a 10.000 rpm a 4 °C por 5 min para retirada dos sólidos grosseiros.

4.3.1. Caracterização da vinhaça de cana-de-açúcar

A caracterização analítica da vinhaça foi realizada por meio de análises físico-químicas. A determinação da demanda química de oxigênio (DQO), série de sólidos, série de nitrogênio, fósforo, potássio, sulfato e metais pesados foram realizados conforme Standard Methods (APHA, 2005). As análises de DQO, pH e série de sólidos foram realizadas em amostras da vinhaça fresca. As outras análises foram realizadas a partir de amostras conservadas em freezer.

Destaca-se que os dois lotes de vinhaça possuíam composição diferente, portanto, utilizou-se a DQO como parâmetro para determinação do volume de vinhaça a ser utilizado nos ensaios de produção de hidrogênio.

4.4. Adaptação da biomassa à temperatura

Para adaptação da biomassa às duas temperaturas propostas, 10 % (v/v) dos dois inóculos citados no item 4.1 foram cultivados separadamente em frascos de 0,5 L com meio de cultivo sintético suplementado com sacarose (2 g L^{-1}) e 0,25 L de *headspace* preenchido com N_2 (100 %) em incubadoras mantidas em temperatura constante de 37 °C e 55 °C. Essa etapa possibilitou a escolha do inóculo que fosse capaz de produzir hidrogênio em temperatura mesófila e termófila. Portanto, foram realizados 4 ensaios de adaptação da biomassa, nominalmente definidos: (1) inóculo do reator UASB incubado em temperatura mesófila (37 °C), (2) inóculo do reator UASB incubado em temperatura termófila (55 °C), (3) consórcio de bactérias anaeróbias mesófilas produtoras de hidrogênio incubado em temperatura mesófila (37 °C), (4) consórcio de bactérias anaeróbias mesófilas produtoras de hidrogênio incubado em temperatura termófila (55 °C).

No ensaio com consórcio de bactérias anaeróbias mesófilas produtoras de hidrogênio (Maintinguer, 2008) não foi verificada produção de H_2 a 55 °C e, por isso, esse inóculo não foi utilizado para os ensaios posteriores. Assim, o lodo granulado foi o inóculo empregado em todos os ensaios posteriores. Todavia, após 1 dia de incubação, foi detectada a presença de CH_4 no biogás, tanto, do frasco incubado a 37 °C, quanto, daquele mantido a 55 °C e, por isso, a biomassa mesófila e termófila foi submetida ao tratamento térmico.

4.5. Tratamento do inóculo

O tratamento térmico consistiu em aquecer a biomassa mesófila e termófila, separadamente a 90 °C por 10 min e, posteriormente, resfriá-las a temperatura ambiente conforme Kim et al. (2006), para selecionar as bactérias formadoras de endósporos e eliminar as arqueias metanogênicas. Para tanto, 0,25 mL de amostras de biomassa mesófila e termófila enriquecidas preliminarmente foram transferidos para almofarizes para que os grânulos

pudessem ser desorganizados por meio da maceração com pistilo. Após este procedimento, todo o volume (0,25 mL) da biomassa mesófila e termófila foi transferido para frascos de vidro (0,5 L) e submetidos ao tratamento térmico por meio do aquecimento dos mesmos em chapa de aquecimento. A temperatura do líquido foi monitorada com auxílio de termômetro de mercúrio durante todo o procedimento. Banho de gelo foi utilizado para o resfriamento das amostras após o aquecimento. Após essa etapa, 10 % (v/v) da biomassa termicamente tratada foi transferida para frascos contendo meio de cultura fresco.

4.6. Adaptação da biomassa à fonte de carbono

Com base nos resultados observados na fase de adaptação da biomassa às duas temperaturas propostas, elegeu-se aquele inóculo com maior potencial de produção de hidrogênio nas duas condições (37 °C e 55 °C). Definido inóculo mais adequado, procedeu-se à fase de adaptação à fonte de carbono; ou seja, vinhaça de cana-de-açúcar. Para isso, a biomassa mesófila e termófila submetida ao tratamento térmico foram cultivadas separadamente em frascos de 0,5 L, com volume reacional de 0,25 L composto por meio de cultivo sintético suplementado com vinhaça de cana-de-açúcar na concentração de 2 g DQO L⁻¹ e 0,25 L de *headspace* preenchido com N₂ (100 %). Os frascos foram mantidos em incubadoras com temperatura constante de 37 °C e 55 °C. Frascos denominados controle foram preparados como descrito anteriormente, porém, sem adição de biomassa.

4.7. Enriquecimento e manutenção de biomassa

Na fase de enriquecimento e manutenção dos consórcios microbianos nas condições de temperatura e substrato, as biomassas mesófila e termófila foram cultivadas separadamente em meio de cultivo supracitado suplementado com vinhaça (2 g DQO L⁻¹), em frascos de 1 L, com volume reacional de 0,9 L e 0,1 L de *headspace* preenchido com N₂ (100 %). Duas vezes por semana, o meio de cultivo foi substituído por meio de cultivo fresco. Para isso, toda a

biomassa mesófila e termófila foi transferida para frascos especiais (50 mL) e submetida a centrifugação (11.000 rpm, 4 °C por 5 min). O *pellet* foi transferido para frascos contendo meio de cultura fresco conforme mencionado anteriormente. Essa etapa do trabalho durou 3 meses e visou aumentar a concentração de biomassa antes de serem realizados os ensaios de produção biológica de hidrogênio.

4.8. Ensaios de produção de hidrogênio

Os ensaios de produção biológica do gás hidrogênio foram realizados em frascos de vidro com volume total de 2 L, volume reacional de 1,2 L consistindo de meio de cultivo (Tabela 4.2) suplementado com vinhaça e biomassa adaptada mesófila e termófila (7 % v/v), separadamente. As biomassas mesófila e termófila separadamente foram centrifugadas (11.000 rpm, 4 °C por 5 min) e ressuspendidas em meio de cultivo fresco antes de cada ensaio. Os frascos foram mantidos em estufa na ausência de luz e sob temperatura controlada de 37 °C e 55 °C durante todo o período experimental. Para garantir as condições de anaerobiose, N₂ (100 %) foi fluxionado no meio líquido (10 min) e no *headspace* (10 min) (Figura 4.2). Todos os ensaios foram realizados em triplicatas. Quando se observou, por meio de cromatografia gasosa a estabilização da produção de hidrogênio encerrou-se o ensaio biológico.



Figura 4.2: Reatores anaeróbios em batelada utilizados nos ensaios de produção de hidrogênio

4.9. Isolamento de microrganismos

Biomassa mesófila e termófila adaptadas à vinhaça foram utilizadas para o isolamento de microrganismos, os quais foram utilizados como fonte de inóculo em ensaios de produção de H_2 com a finalidade de avaliar o potencial, a taxa e o rendimento da produção de hidrogênio, a produção de ácidos orgânicos e alcoóis, além do consumo de substrato puro (glicose) (Figura 4.3).

Os ensaios de isolamento foram realizados Facultad de Química, da Universidad de la República (Udelar, Montevideu, Uruguai). A primeira etapa realizada foi o tratamento térmico da biomassa mesófila e termófila como descrito no item 4.5. O fluxograma mostrado na Figura 4.3 apresenta todas as etapas realizadas para o isolamento de microrganismos.

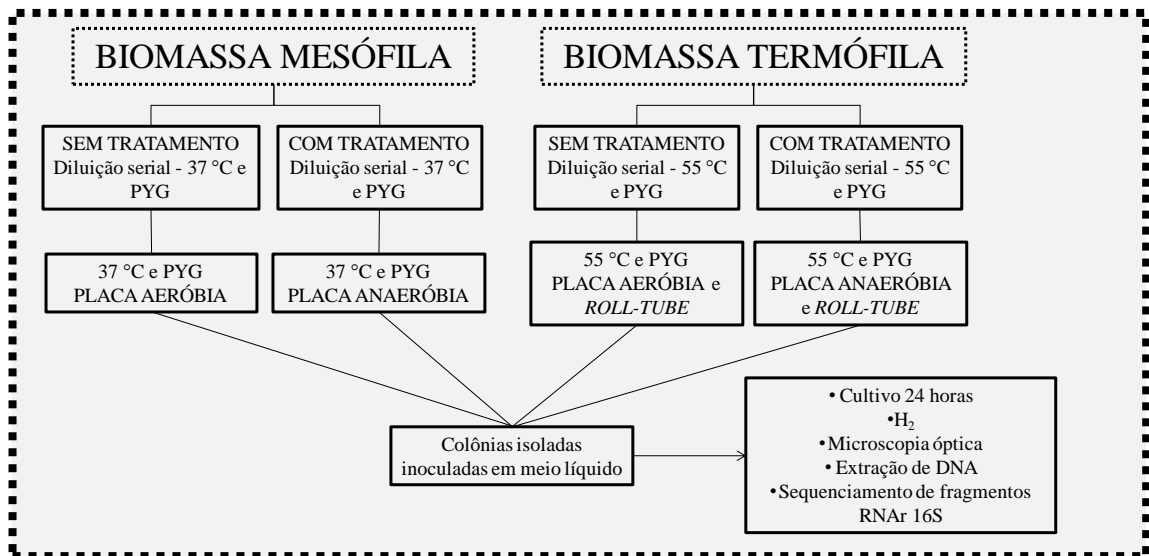


Figura 4.3: Fluxograma experimental da etapa de isolamento de microrganismos mesófilos e termófilos

4.9.1. Diluições seriadas

Após o tratamento térmico, as amostras foram então diluídas (10^{-1} a 10^{-6}) em meio de cultivo líquido, conforme descrito na Tabela 4.3. O meio de cultivo foi preparado pela diluição dos compostos em água deionizada aquecida. Após a preparação, 9,0 mL do meio foram distribuídos em frascos de 20 mL sob fluxo de argônio (100%) por 5 min. Os frascos foram lacrados e esterilizados em autoclave (121 °C, 1 atm por 15 min). A inoculação das amostras foi realizada com seringas (1 mL) estéreis sob condições de assepsia. Os frascos foram incubados a 37 °C e 55 °C por, no mínimo, 24 h, ou até que fosse possível observar o crescimento microbiano pela turvação do meio. Após o crescimento da biomassa, foi realizada análise de geração de H_2 a partir de amostras coletadas do *headspace*. Amostras das maiores diluições (10^{-6}), positivas para produção de H_2 , foram utilizadas para nova diluição. Ao total foram realizadas diluições seriadas até 10^{-6} , por três vezes.

Tabela 4.3: Meio de cultivo PYG (*Peptone*, *Yeast extract*, *Glucose*) para isolamento dos microrganismos

Composto	Concentração (g L ⁻¹)
Glicose	10
Extrato de carne	5
Extrato de levedura	5
Peptona de carne	5

4.9.2. Isolamento por estriamento direto em placa

Amostras da biomassa mesófila e termófila proveniente das diluições seriais foram submetidas ao estriamento direto em placa de Petri contendo meio de cultivo PYG sólido (com adição de 15 g ágar L⁻¹) conforme descrito na Tabela 4.3. O meio de cultivo foi preparado pela diluição dos compostos em água aquecida, transferido para frascos apropriados e esterilizado em autoclave (121 °C, 1 atm por 15 min). Meio de cultura resfriado foi distribuído em placas de Petri (20 mL em cada) em câmara de fluxo laminar.

Após solidificação procedeu-se ao estriamento direto com alça de platina em câmara de fluxo laminar. As placas de Petri foram, então, colocadas em bolsas de anaerobiose (GENBAG Anaer – bioMérieux) e incubadas a 37 °C e 55 °C até que fosse possível observar o aparecimento de colônias. As placas aeróbias foram incubadas em estufa.

Depois de observado crescimento de colônias ou aparecimento de bolhas, que poderia ser devido à produção de gás, foi realizado o repique dessas colônias em meio de cultivo PYG líquido, com o objetivo de observar se eram microrganismos produtores de H₂.

4.9.3. Isolamento em *roll-tube*

Como não foi possível isolar nenhum microrganismo termófilo produtor de H_2 a partir de estriamento direto em placa anaeróbia, realizou-se a técnica de *roll-tube* descrito por Hungate e Macy (1973) indicada para o isolamento de microrganismos anaeróbios.

O meio utilizado foi PYG acrescido de ágar (1,5 %), conforme descrito anteriormente (Tabela 4.3). Aproximadamente 3,0 mL do meio foram distribuídos em frascos de vidro de 20 mL sob fluxo de argônio (100 %). Os frascos contendo o meio de cultura foram esterilizados em autoclave (121 °C, 1 atm por 15 min) e armazenados em temperatura ambiente até a sua utilização. Antes da inoculação, os frascos foram colocados em banho-maria (100 °C), até a liquefação do meio líquido. Após esse procedimento, os frascos foram transferidos para bancada e, quando a temperatura do meio estava aproximadamente em 45 °C, foi realizada a inoculação com 0,1 mL de amostra. Após a inoculação, os frascos foram submersos em recipiente com água gelada e mantidos em movimento giratório até que o meio estivesse solidificado novamente. Os frascos foram incubados invertidos em estufa a 55 °C até o aparecimento de colônias ou bolhas (Figura 4.4).

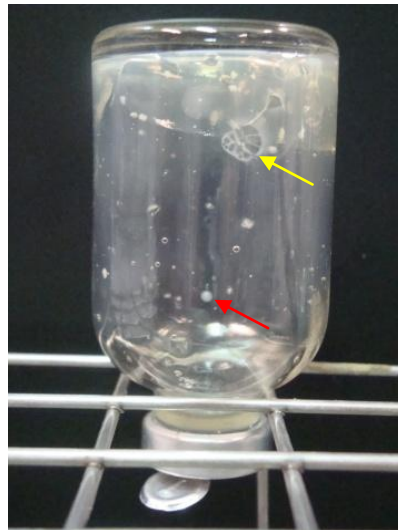


Figura 4.4: *Roll-tube* para isolamento de microrganismos anaeróbios. A seta amarela indica as bolhas formadas devido à produção do gás. A seta vermelha indica uma colônia microbiana

4.10. Ensaios de produção de hidrogênio com microrganismos isolados

Os microrganismos mesófilos isolados (denominados CA, C1 e C5) foram utilizados como inóculo em ensaios de produção de hidrogênio a partir de glicose. Os ensaios foram realizados em frascos de vidro com volume total 0,5 L, volume reacional de 0,2 L consistindo de meio de cultivo PYG e inóculo (1 % v/v) e 0,3 L de *headspace* preenchido com N₂ (100 %).

Os microrganismos termófilos isolados (denominados C6, C7, J3 e J7) não apresentaram crescimento, após período de armazenamento em geladeira e, por isso, não foram realizados ensaios de produção de hidrogênio utilizando essa biomassa.

4.11. Análises cromatográficas

4.11.1. Determinação da composição do biogás

Em todos os ensaios de produção de hidrogênio, a composição do biogás foi analisada por meio da retirada de amostras (0,5 mL) do *headspace* dos reatores. A análise foi realizada em cromatógrafo gasoso (GC 2010, Shimadzu®), equipado com detector de condutividade térmica (TCD – *Thermal Conductivity Detector*) e coluna CarboxenTM 1010 PLOT (30 m x 0,53 mm, Supelco), sendo o gás de arraste o argônio (grau cromatográfico). As temperaturas do injetor e detector foram 220 °C e 230 °C, respectivamente. A temperatura da coluna foi 130 °C com aquecimento de 46 °C min⁻¹ até 135 °C. Os limites de detecção para os gases (H₂, N₂, CH₄ e CO₂) estão apresentados no Apêndice A.

4.11.2. Determinação dos metabólitos

Em todos os ensaios de produção de hidrogênio, a distribuição e quantificação dos ácidos orgânicos e alcoóis foram analisadas em cromatógrafo gasoso (GC 2010, Shimadzu®) equipado com coluna HP-INNOWAX (30 m; 0,25 mm; 0,25 m) e detector de ionização de chama (FID) usando hidrogênio como gás de arraste, além de ar sintético e nitrogênio como gases auxiliares.

4.12. Determinação de carboidratos totais solúveis

A concentração de carboidratos totais de amostras provenientes dos ensaios de produção de hidrogênio com vinhaça foi determinada por meio do método colorimétrico descrito por Dubois et al. (1956) utilizando sacarose como padrão.

Nos ensaios de produção de H₂, nos quais os microrganismos isolados foram utilizados como fonte de inóculo e a glicose como substrato, a quantificação do consumo de substrato também foi realizada segundo método descrito por Dubois et al. (1956), contudo, nesse caso, a glicose foi utilizada como padrão para a construção da curva de calibração.

4.13. Análises microbiológicas

4.13.1. 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 de captura de imagens (Evolution QE, Media Cybernetics Inc., USA) utilizando software Image Pro-Plus 4.5.

4.13.2. Biologia molecular

4.13.2.1. Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada segundo protocolo de Griffiths et al. (2000) modificado, descrito por Maintinguer et al. (2008), com as seguintes amostras: (1) lodo granulado (inóculo original), (2) biomassa mesófila e termófila adaptada a 37 °C e 55 °C com sacarose, (3) biomassa mesófila e termófila adaptada a 37 °C e 55 °C com vinhaça, e (4) biomassa de todos os ensaios de produção de hidrogênio nas duas temperaturas com diferentes concentrações de vinhaça (M2, M5, M7, M12, T2, T5, T7 e T12).

4.13.2.2. Eletroforese em gel com gradiente desnaturante

Para as análises de eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE – *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*), a amplificação dos fragmentos do RNAr 16S foi realizada utilizando-se *primers* específicos para o Domínio Bacteria: 968 FGC (5'-AACGCGAAGAACCTTAC-3') (Nielsen et al., 1999) e 1392 R (5'-AACGGGCGGTGTGTAC-3') (Fang et al., 2002) com GC *clamp* (5'-CGC CCG CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGGG – 3').

O gel foi preparado com gradiente desnaturante nas concentrações de 45 % e 65 %. O sistema utilizado foi DGGE D Code™ – Universal Mutation Detection System (Bio-Rad, Inc., Hercules, Califórnia). As condições durante a eletroforese foram as seguintes: temperatura constante de 60 °C, 75 V por 16 horas. O gel foi corado com solução TAE 1X contendo 1 g mL⁻¹ de brometo de etídeo por 10 min. O aparelho utilizado para leitura do padrão de bandas do gel foi transiluminador UV (Stratagene – Eagle Eye™ III), sob exposição a luz UV (254 nm), acoplado ao computador com o software Eaglesight (Stratagene – versão 3.22). Dendrograma foi construído usando software Bionumerics versão 2.5, com coeficiente de Dice.

Após a obtenção do gel de DGGE, as principais bandas foram recortadas e colocadas separadamente em tubos com água ultrapurificada estéril (50 µL) durante 16 horas a 4 °C para que o DNA presente na banda recortada pudesse migrar para a solução aquosa. Posteriormente, foi realizada nova PCR, utilizando *primers* previamente citados, porém, sem GC *clamp*. O produto da PCR foi purificado utilizando o Illustra GFX 96 PCR Purification Kit (GE Healthcare). Posteriormente, foi realizada reação de sequenciamento, cujos procedimentos foram previamente descritos por Maintinguer (2008) e, posterior, precipitação com etanol. As amostras foram transferidas para tubos específicos para o sequenciamento. A leitura das sequências foi realizada em analisador automático de DNA modelo ABI310 (Applied Biosystems). As seqüências foram averiguadas usando o software DNASTAR-package (Lasergene Sequence Analysis) e, apenas uma delas foi utilizada para aproximação filogenética com o banco de dados eletrônico (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome).

4.13.2.3. Clonagem e sequenciamento

Amostras de biomassa mesófila e termófila obtida nos ensaios de produção de hidrogênio com maior concentração de vinhaça foram utilizadas para caracterização filogenética, por meio da técnica de clonagem e sequenciamento. Para isso, o DNA das amostras dos ensaios de produção de hidrogênio com aproximadamente 12 g DQO L⁻¹, foi extraído de acordo com protocolo de Griffiths et al. (2000) modificado, amplificado com *primers* específicos (27F-1100R) e clonado com pGEM Easy Vector System I, de acordo com as especificações do fabricante. O produto de PCR não purificado foi enviado para Macrogen Inc. (Seul, Coréia, <http://dna.macrogen.com/eng/>), onde foi sequenciado em analisador automático de DNA modelo ABI3730XL (Applied Biosystems). As seqüências obtidas foram averiguadas usando o software DNASTAR-package (Lasergene Sequence Analysis).

Todas as seqüências foram agrupadas em Unidades Taxonômicas Operacionais (UTO) utilizando-se a ferramenta COMPLETE LINKAGE CLUSTERING

(<http://pyro.cme.msu.edu/spring/cluster.spr;jsessionid=4AA2D5910ED29D486AA7CC8AF65880E2.delion>). Posteriormente, usando a ferramenta DEREPLICATE REQUEST (<http://pyro.cme.msu.edu/spring/derep.spr;jsessionid=4AA2D5910ED29D486AA7CC8AF65880E2.delion>) foram determinadas as seqüências representativas de cada UTO, as quais foram comparadas com as seqüências do banco de dados eletrônico por meio da ferramenta SEQMATCH (http://rdp.cme.msu.edu/seqmatch/seqmatch_intro.jsp) para aproximação filogenética.

A árvore filogenética foi construída com auxílio do software MEGA versão 5 (Tamura et al., 2011) usando o método Neighbor-Joining (Saitou e Nei, 1987). As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método Jukes-Cantor (Jukes e Cantor, 1969). A confiabilidade da árvore foi avaliada pelo teste de *bootstrap* para 1000 repetições (Felsenstein, 1985).

4.13.2.4. Quantificação de FeFe-hidrogenase por PCR em tempo real

Foram realizadas análises de PCR em tempo real com amostras de DNA provenientes dos ensaios de produção de hidrogênio a partir de diferentes concentrações de vinhaça de cana-de-açúcar, incubadas a 37 e 55 °C.

O objetivo dessas análises foi quantificar a proporção de bactérias produtoras de hidrogênio em amostras de biomassa, para isso o número de cópias do gene Fe-Fe hidrogenase foi determinado conforme análise descrita previamente por Fang et al. (2006) utilizando os *primers*: HydA-F (5'-TCACCACAACAAATATTTGGT-3') e HydA-R (5'-GCTGCTTCCATAACTCC-3') e o fluorocromo SYBR Green I, em termociclador Rotor-Gene (Qiagen). As reações de PCR em tempo real foram realizadas em duplicata. A concentração de DNA foi quantificada usando fluorímetro (Qubit 2.0, Invitrogen).

4.13.2.5. Sequenciamento do DNA das cepas dos microrganismos isolados

Os microrganismos isolados produtores de H₂ após cultivo por 24 horas, tiveram seu DNA extraído utilizando-se Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega). A PCR foi realizada com *primers* (27F e 1492R - Edwards et al., 1989). O produto de PCR não purificado foi enviado para Macrogen Inc. (Seul, Coréia, <http://dna.macrogen.com/eng/>), onde foi sequenciado em analisador automático de DNA modelo ABI3730XL (Applied Biosystems). As seqüências obtidas dos fragmentos do RNAr 16S foram alinhadas utilizando-se o software DNA Star (SeqMan). A árvore filogenética foi construída com recursos do software MEGA versão 5.0 (Tamura et al. 2007) pelo algoritmo de Neighbor-Joining (Saitou e Nei 1987). Análises de *bootstrap* com 1000 repetições foram realizadas para fornecer suporte aos ramos da árvore filogenética gerada no programa. A título de comparação e análise da árvore, foram incluídas seqüências da mesma região, disponíveis na base de dados do GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank).

4.14. Ajuste dos dados experimentais

Os valores de produção acumulada de hidrogênio (H₂) foram ajustados ao modelo modificado de Gompertz (Zwietering et al. 1990); modelo adequado para descrever a produção de biogás em ensaios em batelada. O *software* Statistica 8.0 foi utilizado para ajustar os dados ao modelo.

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

sendo,

P = potencial de produção de hidrogênio (mmol),

R_m = taxa máxima de produção de hidrogênio (mmol h⁻¹),

λ = período da fase lag (d) e

$e = 2.718281828$.

4.15. Balanço de carbono

Para calcular o balanço de carbono foram utilizados os valores de DQO_{inicial} e DQO_{final} medidos e aqueles de DQO_{inicial} e DQO_{final} teóricos calculados para os ácidos orgânicos voláteis (ácido acético, ácido butírico e ácido propiônico), etanol, carboidratos totais solúveis (utilizando sacarose como padrão). A DQO da biomassa não foi contabilizada para os cálculos, uma vez que, as análises de DQO foram realizadas com amostras filtradas.

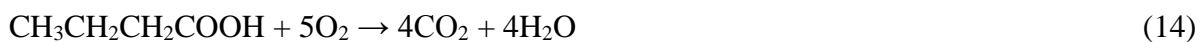
A $DQO_{\text{teórica}}$ foi calculada para os compostos detectados no início e no final de cada ensaio segundo a equação (12):

$$DQO_{\text{teórica}} = DQO_{\text{HAc}} + DQO_{\text{HBu}} + DQO_{\text{HPr}} + DQO_{\text{EtOH}} + DQO_{\text{carboidratos totais}} \quad (12)$$

Para o cálculo da $DQO_{\text{teórica}}$ foram utilizadas as reações a seguir (13-17):



$$DQO = 1,066 \text{ g O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ ácido acético}$$



$$DQO = 1,818 \text{ g O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ ácido butírico}$$



$$DQO = 1,513 \text{ g O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ ácido propiônico}$$



$$\text{DQO} = 1,391 \text{ g O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ etanol}$$



$$\text{DQO} = 1,129 \text{ g O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ sacarose}$$

A porcentagem de $\text{DQO}_{\text{outros}}$ (referente aos compostos não quantificados) foi calculada segundo a equação 18:

$$\text{DQO}_{\text{outros}} (\%) = (\text{DQO}_{\text{medida}} - \text{DQO}_{\text{teórica}} / \text{DQO}_{\text{medida}}) \times 100 \quad (18)$$

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesse item serão apresentados os resultados obtidos durante a execução do presente estudo, os quais abrangem breve caracterização do substrato utilizado (item 5.1), a escolha do inóculo (item 5.2), os ensaios de produção de hidrogênio em temperatura mesófila e termófila (item 5.4), as análises de biologia molecular para caracterização dos consórcios microbianos (item 5.5) e os ensaios de produção de hidrogênio com os microrganismos mesófilos isolados (item 5.6).

5.1. Caracterização da vinhaça de cana-de-açúcar

Na Tabela 4.2 estão apresentados os resultados obtidos da caracterização analítica da vinhaça dos dois lotes coletados (LOTE 1 – 20/01/2010) e (LOTE 2 – 20/10/2010).

A quantidade de matéria orgânica da vinhaça para a primeira coleta foi de 20,7 g DQO_{bruta} L⁻¹ e 15,7 g DQO_{filtrada} L⁻¹, enquanto para a segunda foi de 32 g DQO_{bruta} L⁻¹ e 24,7 g DQO_{filtrada} L⁻¹.

Salomon e Lora (2009) reportaram em estudo sobre a estimativa do potencial de geração de eletricidade a partir de diferentes fontes de biogás no Brasil, por exemplo, a concentração de 15 a 33 g DQO L⁻¹ para vinhaça de caldo de cana-de-açúcar. Buitrón e Carvajal (2010) encontraram valores de concentração de matéria orgânica entre 29,9 g DQO L⁻¹ e 30,5 g DQO L⁻¹ para vinhaça proveniente de indústria de fabricação de tequila (Guadalajara, México). Wilkie et al. (2000) apresentaram valores médios de concentração de matéria orgânica de 30,4 g DQO L⁻¹ para vinhaça de caldo de cana de açúcar, 61,3 g DQO L⁻¹ para vinhaça proveniente de processamento de matéria-prima celulósica e 91,9 g DQO L⁻¹ para vinhaça proveniente de melaço de beterraba. Fernandes et al. (2010) reportaram concentração de matéria orgânica de 88,4 g DQO L⁻¹ em vinhaça proveniente de destilação de álcool de milho.

Em relação a nitrogênio total e sulfato obteve-se 187,5 mg L⁻¹ e 391,4 mg L⁻¹, respectivamente, na primeira coleta. Todavia, na segunda coleta obteve-se, respectivamente, 369,5 mg L⁻¹ e 559,5 mg L⁻¹. Esses valores foram mais próximos daqueles apresentados por Wilkie et al. (2000); ou seja, 400 a 1.190 mg L⁻¹ para nitrogênio total e 400 a 1.470 mg L⁻¹ para sulfato. Buitrón e Carvajal (2010), reportaram valores de 915 mg L⁻¹ e 110 mg L⁻¹, para sulfato e nitrogênio, respectivamente. Os valores reportados por Salomon e Lora (2009) para os mesmos parâmetros foram de 0,6-0,76 g SO₄⁻² L⁻¹ e 0,15-0,7 g N L⁻¹.

Segundo Wilkie et al. (2000) o volume de vinhaça produzido e as suas características são altamente variáveis e dependentes da matéria-prima utilizada e do processo produtivo. Salomon e Lora (2009) acrescentam que a composição química da vinhaça depende ainda da característica do solo, da variedade da cana de açúcar e do período de colheita.

Destaca-se que, no presente trabalho, os dois lotes de vinhaça foram coletados em meses distintos (janeiro e outubro de 2010) e, provavelmente, esse fato justifique a variação na composição quantitativa da vinhaça. Outra consideração que se deve fazer é que a água de lavagem dos equipamentos pode, muitas vezes, ser misturada com a vinhaça ocasionando a diluição da mesma. Dessa maneira, pode-se justificar o menor valor de DQO observado na primeira coleta, além da coleta ter sido realizada durante a época chuvosa do ano.

Os valores de pH foram de 3,8 e 3,6, os quais estão dentro da faixa de valores reportada por diversos autores: 3,5 a 3,9 (Wilkie et al. 2000); 3,7 a 4,6 (Salomon e Lora, 2009); 3,2 a 4,0 (Buitrón e Carvajal, 2010) e 3,8 (Fernandes et al. 2010).

Em relação aos metais, foi verificada maior concentração de Fe (136,8 mg L⁻¹ e 86,5 mg L⁻¹) do que outros metais, para as duas coletas realizadas. As demais concentrações oscilaram entre 0,035 mg L⁻¹ e 0,085 mg L⁻¹; 3,3 mg L⁻¹ e 3,81 mg L⁻¹, respectivamente para cromo e manganês para as duas coletas.

A análise de açúcares e ácidos orgânicos simultaneamente, que foi proposta no projeto de pesquisa, não pôde ser realizada segundo a metodologia a ser desenvolvida a partir do método descrito previamente por Lazaro (2009). Apesar de diversos trabalhos terem relatado análise de açúcar e ácidos orgânicos em diversas amostras empregando a mesma coluna (AMINEX HPX – 87H) e fase móvel (solução de H₂SO₄), que foi utilizada no presente trabalho, nenhum deles utilizou a mesma amostra.

Os valores de sólidos totais foram semelhantes para os dois lotes de vinhaça analisados: 18,2 e 21,2 g L⁻¹. Os sólidos totais voláteis corresponderam em média a 82 % da concentração dos sólidos totais e o restante correspondeu aos sólidos fixos. Com relação aos carboidratos totais, a concentração para os dois lotes de vinhaça foi bastante diferente. Sendo que a concentração do primeiro lote foi 3 g L⁻¹ e na segunda coleta esse valor foi maior do que o dobro da primeira (8,3 g L⁻¹) (Tabela 5.1). A composição da vinhaça, em termos de concentração de carboidratos totais solúveis, é de grande importância para o processo biológico de produção de hidrogênio, uma vez que matéria-prima rica em carboidratos é fonte preferencial para o processo (Hallenbeck, 2009).

Tabela 5.1: Caracterização dos dois lotes de vinhaça de cana-de-açúcar

PARÂMETROS		LOTE 1	LOTE 2
DQO _{bruta} (g L ⁻¹)		20,7	32
DQO _{filtrada} (g L ⁻¹)		15,7	24,7
pH		3,8	3,6
Sulfato (mg L ⁻¹)		391,4	559,5
Fosfato (mg L ⁻¹)		133	150,5
Nitrogênio Total (mg L ⁻¹)		187,5	369,5
Carboidratos Totais (g L ⁻¹)		3	8,3
Sólidos (g L ⁻¹)	Totais	18,2	21,2
	Fixos	3,7	3,2
	Voláteis	14,4	18
Metais (mg L ⁻¹)	Zn	0,8	1,85
	Pb	0,1	0,85
	Cd	<0,0006	0,098
	Ni	0,0465	0,230
	Fe	136,8	86,5
	Mn	3,3	3,81
	Cu	0,4	0,29
	Cr	0,03	0,085

5.2. Adaptação do inóculo à temperatura

Inicialmente, foi proposta a aplicação de dois inóculos diferentes para os ensaios de produção de hidrogênio a partir de vinhaça de cana-de-açúcar. Um dos inóculos foi consórcio microbiano, que foi enriquecido e utilizado para produção de hidrogênio a partir de açúcares puros (sacarose e xilose) em reatores em batelada a 37 °C, fornecido por Maintinguer (2008). Tal inóculo não foi capaz de produzir hidrogênio a 55 °C a partir da sacarose. Possivelmente, a incapacidade de produzir hidrogênio em temperatura termófila, seja devida à seleção microbiana imposta pela temperatura de incubação durante o trabalho de Maintinguer (2008). Dessa maneira, o inóculo utilizado foi o lodo de reator UASB submetido ao tratamento térmico e enriquecido em vinhaça a 37 °C e 55 °C.

5.3. Adaptação do inóculo à fonte de carbono

Após a seleção do inóculo capaz de crescer e produzir hidrogênio a 37 °C e 55 °C a partir de sacarose iniciou-se a fase de adaptação dos consórcios à vinhaça de cana-de-açúcar.

Na Figura 5.1 (A e B) é possível observar a morfologia das células microbianas provenientes de amostra da biomassa mesófila e termófila após adaptação em vinhaça. Por meio dos exames microscópicos foi observado predomínio de bacilos e bacilos com endósporos na amostra de biomassa mesófila. Para aquela submetida à condição termófila foi observado predomínio de bacilos delgados e raros endósporos.

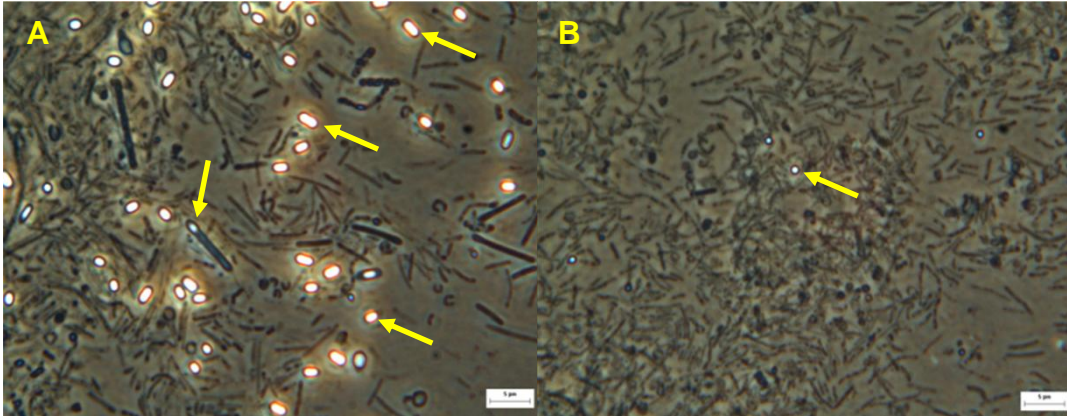


Figura 5.1: Microscopia óptica de contrastes de fase de biomassa mesófila (A) e termófila (B) após adaptação à vinhaça. As setas indicam endósporos

Além do exame microscópico, após a fase de adaptação da biomassa à vinhaça foi feita análise de PCR/DGGE para verificar as modificações na estrutura da comunidade microbiana a partir das seguintes amostras: lodo original usado como inóculo, lodo cultivado a 37 °C e 55 °C com sacarose, biomassa mesófila e termófila adaptadas à vinhaça e biomassa mesófila e termófila oriunda de ensaios controle (sem adição de inóculo).

A partir do dendrograma (Figura 5.2), pode-se observar a formação de três grupos. O primeiro deles foi composto pelo inóculo (lodo granulado de UASB) e aquelas amostras previamente adaptadas a 37 °C e a 55 °C, todavia, para condição sem adição de vinhaça. A porcentagem de similaridade desse ramo foi de 62 %.

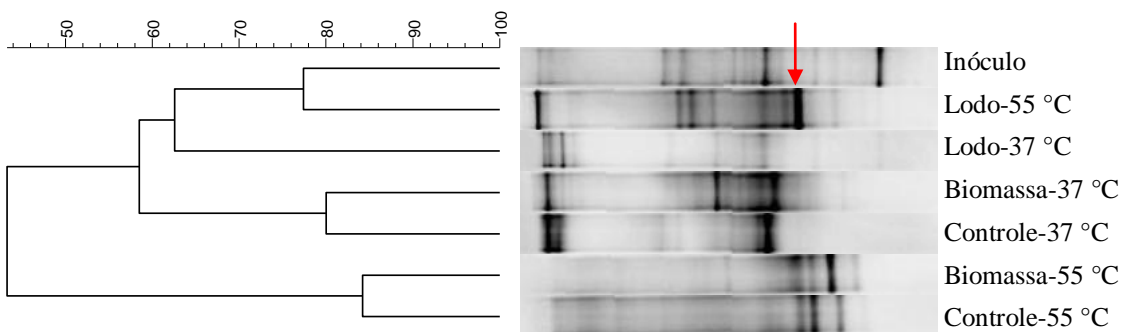


Figura 5.2: Dendrograma de DGGE. A seta indica a banda que foi recortada para sequenciamento de fragmentos do RNAr 16S

No segundo ramo, ficaram agrupadas as amostras de biomassa adaptada à vinhaça e biomassa do ensaio controle sem adição de inóculo, ambas cultivadas a 37 °C. As amostras foram agrupadas com similaridade de 80 %. A similaridade entre esse segundo ramo e o primeiro foi de apenas 58 %, indicando que a adição de vinhaça parece ter contribuído para a seleção de microrganismos.

No último ramo, foram agrupadas as amostras termófilas, tanto a biomassa adaptada à vinhaça, como aquela do ensaio controle, sem adição de inóculo. Para esse grupo o coeficiente de similaridade foi de 84 %; ou seja, a maior similaridade observada na comparação entre as amostras. Por outro lado, a similaridade desse ramo com as outras amostras (cultivadas 37 °C) foi a menor observada (< 44 %), indicando que além da vinhaça, a temperatura foi um fator importante na seleção de microrganismos.

Ressalta-se que, a elevada similaridade entre a amostra de biomassa adaptada à vinhaça (inoculada com lodo) e a biomassa proveniente do ensaio controle (sem adição de inóculo) indicou que o resíduo utilizado como substrato (vinhaça) serviu como fonte de inóculo. Infere-se que microrganismos presentes neste resíduo, com estruturas de resistência, provavelmente, germinaram, após o descongelamento da vinhaça e, por conseguinte, fizeram parte do consórcio microbiano termófilo.

Segundo Hung et al. (2011) os microrganismos presentes em resíduos utilizados sem esterilização como substrato para a produção de hidrogênio, contribuem em proporção significativa na composição da comunidade microbiana dos sistemas biotecnológicos.

A partir do DGGE, 26 bandas foram recortadas e sequenciadas. Contudo, as seqüências obtidas não puderam ser utilizadas para alinhamento com as do banco de dados, porque foram seqüências pequenas (< 150 pb). A única banda que pôde ser utilizada para se obter a afiliação filogenética está marcada com a seta vermelha no gel de DGGE (Figura 5.2). Tal seqüência foi similar a *Caloramator* sp. (AY548786; 100 %) (Kaksonen et al., 2004).

Bactérias pertencentes a esse gênero são microrganismos termófilos (50 °C a 68 °C), coram-se como Gram-negativos ou Gram-positivos, mas possuem estrutura de parede celular de microrganismos Gram-positivos. Dependendo da espécie, podem ser móveis e formar endósporos. Apresentam metabolismo heterotrófico e sacarolítico (Baena e Patel, 2009).

Segundo Sigurbjörnsdóttir (2009), cepa com alta similaridade a *Caloramator viterbensis* foi isolada de fonte termal. Por meio de testes bioquímicos, o autor verificou que representantes dessa espécie são sacarolíticas, e degradam mono e dissacarídeos. Os produtos finais da degradação da glicose são etanol, ácido acético, H₂ e CO₂. Possivelmente, esse microrganismo estivesse presente na biomassa adaptada a 55 °C com sacarose e tenha sido responsável pela produção de H₂. Todavia, como será apresentado no item 5.5 o consórcio microbiano termófilo não apresentou nenhum clone com sequência filogeneticamente similar a *Caloramator*, sugerindo que esse microrganismo não foi selecionado nas condições experimentais dos ensaios de produção de hidrogênio com vinhaça.

5.4. Produção de hidrogênio e geração de metabólitos

Os ensaios de produção de hidrogênio foram realizados com diferentes concentrações de vinhaça de cana-de-açúcar (aproximadamente 2 g DQO L⁻¹, 5 g DQO L⁻¹, 7 g DQO L⁻¹ e 12 g DQO L⁻¹) em temperatura mesófila (37 °C) e termófila (55 °C). Os dados relativos à produção do gás, consumo do substrato e composição dos metabólitos produzidos serão apresentados a seguir, para os ensaios realizados a 37 °C (item 5.4.1) e 55 °C (item 5.4.2).

5.4.1. Ensaios em temperatura mesófila

Ensaios de produção de hidrogênio a partir de diferentes concentrações de vinhaça de cana-de-açúcar foram realizados após enriquecimento e adaptação do consórcio microbiano mesófilo. Valores de R² superiores a 0,99 (Tabela 5.3) (Apêndice B) indicaram que o modelo utilizado para o ajuste dos dados experimentais foi apropriado.

Nos ensaios mesófilos não foi observada inibição da produção de hidrogênio com o aumento da concentração de substrato. Em todas as concentrações de vinhaça utilizadas (aproximadamente 2 g DQO L⁻¹, 5 g DQO L⁻¹, 7 g DQO L⁻¹ e 12 g DQO L⁻¹) foi observada geração do gás (Figura 5.8). Além disso, o potencial de produção do gás aumentou de

4,3 mmol H₂ para 28,4 mmol H₂ com o aumento da concentração de vinhaça de 2 g DQO L⁻¹ para 12 g DQO L⁻¹ (Figura 5.3). A produção específica de hidrogênio seguiu a mesma tendência do potencial de produção e aumentou de 76,5 mmol H₂ g⁻¹ SSV para 202,8 mmol H₂ g⁻¹ SSV (Figura 5.4), respectivamente.

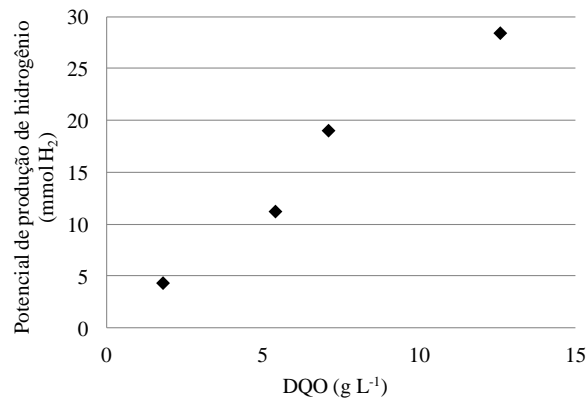


Figura 5.3: Relação entre potencial de produção de hidrogênio (*P*) e concentração inicial de vinhaça a 37 °C

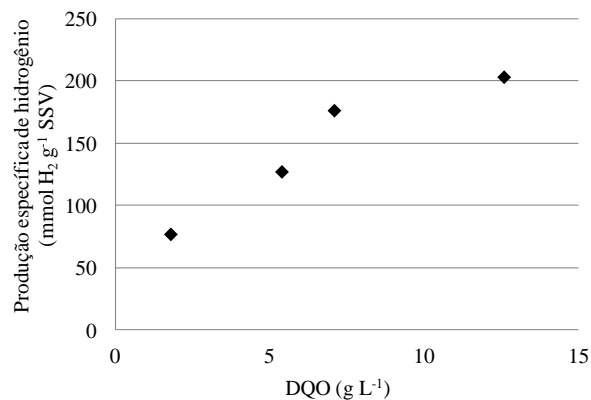


Figura 5.4: Relação entre produção específica de hidrogênio e concentração inicial de vinhaça a 37 °C

Contudo, o rendimento de hidrogênio, expresso como a razão entre o potencial de produção de hidrogênio e a massa de carboidrato consumida (mmol H₂ g⁻¹ carboidrato) não

seguiu tal tendência. Os valores foram similares para todos os ensaios (10 mmol H₂ g⁻¹ carboidrato a 10,9 mmol H₂ g⁻¹ carboidrato), exceto para o ensaio M5 cujo rendimento foi menor; ou seja, 8,6 mmol H₂ g⁻¹ carboidrato (Figura 5.5).

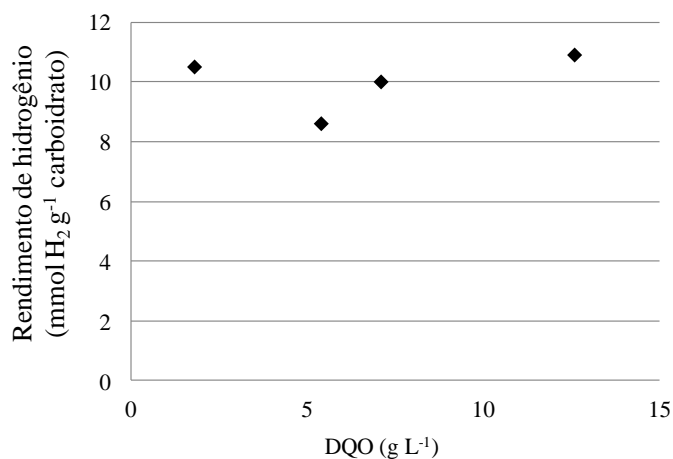


Figura 5.5: Relação entre o rendimento de produção de hidrogênio e concentração inicial de vinhaça a 37 °C

Ainda que o aumento da concentração de substrato, dentro de determinada faixa, promova o aumento do potencial e da taxa máxima de produção de hidrogênio, o rendimento do processo não acompanha tal tendência. O rendimento é um importante parâmetro na avaliação da viabilidade econômica do processo de produção biológica de hidrogênio. Segundo Wang e Wan (2008a) a maioria dos estudos visa à maximização desse parâmetro em detrimento do potencial de produção de hidrogênio.

O rendimento do processo está ligado ao metabolismo dos microrganismos, os quais são utilizados em culturas puras ou consórcios microbianos. Destaca-se que maiores rendimentos de produção de hidrogênio estão relacionados com a geração dos ácidos acético e butírico. No caso da produção de ácido propiônico, por exemplo, esse rendimento é reduzido (Bartacek et al. 2007). No caso específico desse trabalho, o menor rendimento (8,6 mmol H₂ g⁻¹ carboidrato) foi observado para o ensaio M5 (5 g DQO L⁻¹). Especificamente, nesse caso observou-se a geração de maior quantidade de ácido propiônico (384,1 mg L⁻¹) em relação as demais concentrações de vinhaça (83,9 e 140,6 mg L⁻¹ de ácido propiônico para os ensaios M2 e M7, respectivamente) (Tabela 5.3).

Wang e Wan (2008a) também observaram aumento da taxa ($15,1 \text{ mL H}_2 \text{ h}^{-1}$) e potencial de produção de hidrogênio ($426,8 \text{ mL H}_2$) para concentrações crescentes de substrato (0 a $25 \text{ g glicose L}^{-1}$). Todavia, o maior rendimento ($384,3 \text{ mL H}_2 \text{ g}^{-1} \text{ glicose}$) foi observado para $2 \text{ g glicose L}^{-1}$. Além disso, esses autores observaram que o potencial de produção de hidrogênio diminuiu para concentrações elevadas de substrato (50 a $300 \text{ g glicose L}^{-1}$).

O mesmo comportamento foi observado no presente estudo, no qual o potencial de produção de hidrogênio ($4,3$ para $28,4 \text{ mmol H}_2$) e a taxa máxima de produção ($6,5$ para $24,6 \text{ mmol H}_2 \text{ d}^{-1}$) aumentaram com o aumento da concentração de vinhaça. Todavia, o rendimento de hidrogênio ($10 \text{ mmol H}_2 \text{ g}^{-1} \text{ carboidrato}$ a $10,9 \text{ mmol H}_2 \text{ g}^{-1} \text{ carboidrato}$) foi similar para todas as concentrações de vinhaça.

Kargi et al. (2012) também estudaram a influência da concentração inicial de soro de queijo em pó ($5,2$ e $28,5 \text{ g açúcares totais L}^{-1}$) na produção de hidrogênio com concentração constante de biomassa (1 g L^{-1}). A produção acumulada de hidrogênio aumentou de 80 mL H_2 ($3,22 \text{ mmol H}_2$ a $30 \text{ }^\circ\text{C}$, 1 atm) para 257 mL H_2 ($10,34 \text{ mmol H}_2$ a $30 \text{ }^\circ\text{C}$, 1 atm) com aumento da concentração de $5,2 \text{ g L}^{-1}$ para $20 \text{ g açúcares totais L}^{-1}$ em 360 h de ensaio. Entretanto, para a concentração de $28,5 \text{ g L}^{-1}$ a produção diminuiu para 148 mL H_2 ($5,96 \text{ mmol H}_2$ a $30 \text{ }^\circ\text{C}$).

Li et al. (2008) estudaram a produção fermentativa de hidrogênio a partir de diversas concentrações de substrato (5 , $7,5$, 10 e $20 \text{ g glicose L}^{-1}$), diferentes valores de pH inicial ($5,6$ e 7) e também em pH controlado (5 , 6 e 7). Os valores de rendimento variaram para os diferentes valores de pH estudados. Nos ensaios em que o pH não foi controlado, a maior produção de hidrogênio ocorreu para concentração de $7,5 \text{ g glicose L}^{-1}$ e pH $7,0$ na qual o rendimento e a taxa de produção foram $1,85 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ glicose}$ e $0,085 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ glicose h}^{-1}$, respectivamente. Todavia, quando o pH foi mantido constante, a melhor condição experimental foi $7,5 \text{ g glicose L}^{-1}$ e pH $6,0$. Neste caso o rendimento e a taxa de produção foram $1,83 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ glicose}$ e $0,22 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ glicose h}^{-1}$. Observa-se que, apesar de o rendimento ser o mesmo nos dois casos, a taxa de produção do gás em condição de pH controlado é $2,6$ vezes maior do que no caso de ausência de controle de pH.

Cubillos et al. (2010) também estudaram a influência do pH inicial ($5,5$, $6,5$ e $7,5$) e concentração de substrato (3 g DQO L^{-1} , 5 g DQO L^{-1} e 10 g DQO L^{-1}) no rendimento de hidrogênio durante fermentação da glicose utilizando lodo termicamente tratado em ensaios

em batelada a 37 °C. Os autores verificaram que o rendimento diminuiu com o aumento da concentração de substrato; ou seja, 0,87 mol H₂ mol⁻¹ glicose (3 g DQO L⁻¹), para 0,82 mol H₂ mol⁻¹ glicose (5 g DQO L⁻¹) e 0,76 mol H₂ mol⁻¹ glicose (10 g DQO L⁻¹) em pH 5,5. Para pH 6,5 e 7,5 os maiores rendimentos foram 1,07 mol H₂ mol⁻¹ glicose (3 g DQO L⁻¹) e 0,88 mol H₂ mol⁻¹ glicose (5 g DQO L⁻¹).

De acordo com os dados apresentados por Li et al. (2008) e Cubillos et al. (2010), o valor inicial de pH e a concentração de substrato têm efeito no rendimento de hidrogênio. Entretanto, parece que não existe consenso acerca do valor de pH e concentração de substrato ideais para se obter maiores rendimentos. Li et al. (2008) obtiveram maior rendimento em pH 7 (pH não controlado) e 7,5 g L⁻¹ glicose. Cubillos et al. (2010), verificaram que a melhor condição experimental foi em pH 6,5 e 3 g DQO L⁻¹.

Assim, no presente estudo, se além da concentração de substrato, também tivesse sido avaliada a influência do valor inicial de pH, maiores rendimentos poderiam ter sido observados, já que, conforme reportado por Li et al. (2008) e Cubillos et al. (2010), maiores rendimentos foram obtidos em pH neutro (pH igual a 7,0 e 6,5) do que em pH ácido (pH 5,0 e 5,5), o qual foi utilizado no presente estudo; ou seja, pH 5,5.

Segundo Fan et al. (2004) é possível que o aumento na concentração de substrato tenha influência positiva no rendimento de produção de hidrogênio. Entretanto, excesso na concentração pode resultar em acúmulo de ácidos orgânicos voláteis, diminuição de pH, e inibição do crescimento de bactérias produtoras de hidrogênio. Além disso, o aumento na concentração de substrato pode ocasionar aumento do potencial de produção de hidrogênio e, como consequência, o aumento da pressão parcial deste gás fazendo com que os microrganismos alterem a rota metabólica produzindo alcoóis ao invés de hidrogênio.

Todavia, além dessas variáveis, outros fatores como, por exemplo, a origem do inóculo, qualidade de substrato, configuração de reator, entre outros, são fatores que exercem efeito sobre o rendimento de produção de hidrogênio juntamente com pH e a concentração de substrato (Mohan 2008).

Na Tabela 5.2 estão apresentados valores de rendimento de hidrogênio reportados por diversos autores, os quais utilizaram vários microrganismos, entre eles culturas puras e, também, consórcios microbianos, para a produção de H₂. Com base nesses dados não é

possível afirmar que culturas puras apresentem maiores rendimentos do que as culturas mistas, já que são apresentados valores de rendimentos similares, os quais variaram entre 8,2 mmol H₂ g⁻¹ glicose e 16 mmol H₂ g⁻¹ glicose para culturas puras e entre 7 mmol H₂ g⁻¹ glicose e 17 mmol H₂ g⁻¹ glicose para os consórcios microbianos. Contudo, destaca-se que essa comparação fica de certa maneira prejudicada, já que o tipo de inóculo não é a única variável entre os estudos, além disso, concentração de substrato, temperatura (ainda que em faixa mesófila) e pH também foram diferentes.

Os valores de rendimento obtidos no presente estudo estão dentro da faixa de valores apresentados por outros autores (Tabela 5.2), porém, ressalta-se que nesse estudo foi utilizada água residuária real como substrato e não fontes puras de açúcares, como nos outros estudos. Dessa maneira, pode-se sugerir com base no rendimento do processo para ensaios simples em batelada, que o uso de vinhaça de cana-de-açúcar pode ser um substrato promissor para a produção de hidrogênio em temperatura mesófila e por consórcio microbiano enriquecido. Contudo, o processo deve ser avaliado em reatores operados em fluxo contínuo e em maior escala (Wang e Wan 2009). Somado a isso, é necessário que além de apresentar rendimentos razoáveis, o processo de produção de H₂ seja estável.

Tabela 5.2: Produção de hidrogênio por microrganismos em culturas puras e consórcios microbianos

Microrganismo	Substrato	Temperatura	*Rendimento (mmol H ₂ g ⁻¹ glicose)	Referência
<i>Clostridium butyricum</i> ATCC19398			*10	
<i>Clostridium acetobutyricum</i> M121	glicose (3 g L ⁻¹)	35 °C	*13	Lin et al. (2007)
<i>Clostridium tyrobutyricum</i> FYa102			*8,2	
<i>Clostridium beijerinckii</i> L9			*16	
Lodo anaeróbio submetido ao tratamento térmico	glicose (10 g L ⁻¹)	37 °C	*7	Mu et al. (2006)
<i>Ethanoligenens harbinense</i> YUAN-3	glicose (10 g L ⁻¹)	35 °C	*10	Xing et al. (2008a)
Lodo anaeróbio submetido ao tratamento térmico	glicose (2 g L ⁻¹)	35 °C	*17	Wange Wan (2008b)
Consórcio microbiano	vinhaça (2 g DQO L ⁻¹)	37 °C	**10,5	presente estudo

* valores calculados a partir de rendimentos apresentados em mol H₂ mol substrato** mmol H₂ g⁻¹ carboidrato

Com relação à porcentagem de consumo de substrato verificou-se que esse valor foi semelhante em todos os ensaios (79 % a 81 %), com exceção do ensaio M7, cuja porcentagem foi ligeiramente maior (87 %) (Figura 5.6). Possivelmente, a maior concentração inicial de biomassa presente neste ensaio seja responsável pelo maior consumo de substrato observado (41,3 mg SSV L⁻¹).

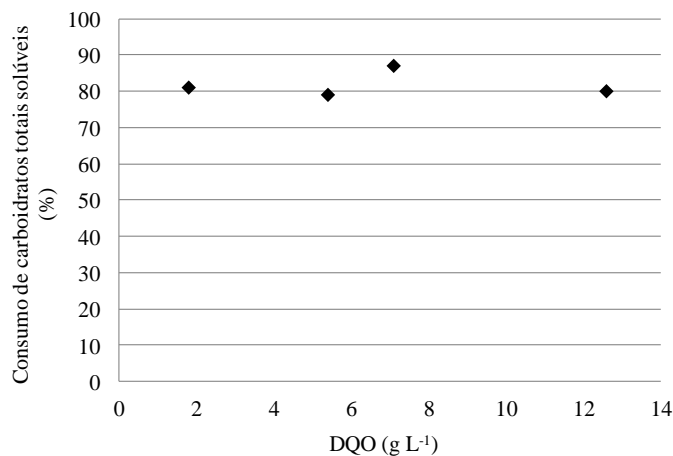


Figura 5.6: Relação entre porcentagem de consumo de substrato e concentração inicial de vinhaça a 37 °C

Wang e Wan (2008b) também observaram porcentagem de degradação de glicose similar (entre 92 e 98 %) para concentrações crescentes de substrato dentro de determinada faixa (entre 1 a 25 g L⁻¹), sendo que o maior valor foi de 97,6 %, para 2 g glicose L⁻¹. Todavia, para concentrações superiores (50 a 300 g L⁻¹), essa porcentagem diminuiu, atingindo valor mínimo aproximado de 25 %.

Segundo os mesmos autores, o aumento na concentração de substrato (1 a 300 g L⁻¹) ocasionou aumento na concentração dos ácidos orgânicos (7,8 a 116,9 mmol ácidos orgânicos voláteis L⁻¹). O acúmulo desses ácidos e a redução de pH pode afetar o metabolismo microbiano. Como mencionado no parágrafo anterior, a porcentagem de consumo de substrato não se alterou para concentrações entre 1 a 25 g L⁻¹, nas quais a concentração de ácido foi 7,8 e 90,6 mmol ácidos orgânicos voláteis L⁻¹, respectivamente. No presente estudo, a porcentagem de consumo de substrato também não se alterou e, provavelmente, isso tenha

ocorrido porque a concentração dos metabólitos gerados não foi elevada a ponto de influenciar o metabolismo dos microrganismos.

Com relação ao crescimento celular estimado pelo SSV foi observado que o aumento na concentração de substrato promoveu maior crescimento da biomassa (Figura 5.7); ou seja, para a menor e maior concentração de vinhaça obteve-se 24,5 mg SSV L⁻¹ e 108 mg SSV L⁻¹, respectivamente (Tabela 5.3). Portanto, constata-se que a concentração de substrato não inibiu o crescimento microbiano. Porém, novamente, ressalta-se que a viabilidade econômica do processo depende principalmente da combinação entre os parâmetros, rendimento e taxa máxima de produção de hidrogênio, em detrimento do crescimento celular.

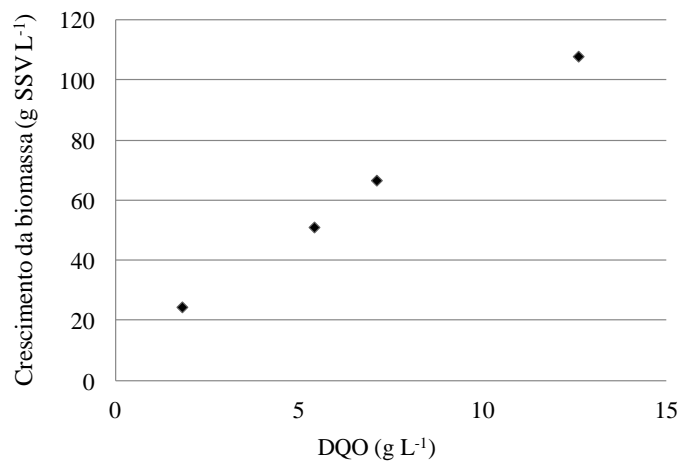


Figura 5.7: Relação entre crescimento da biomassa e concentração inicial de substrato a 37 °C

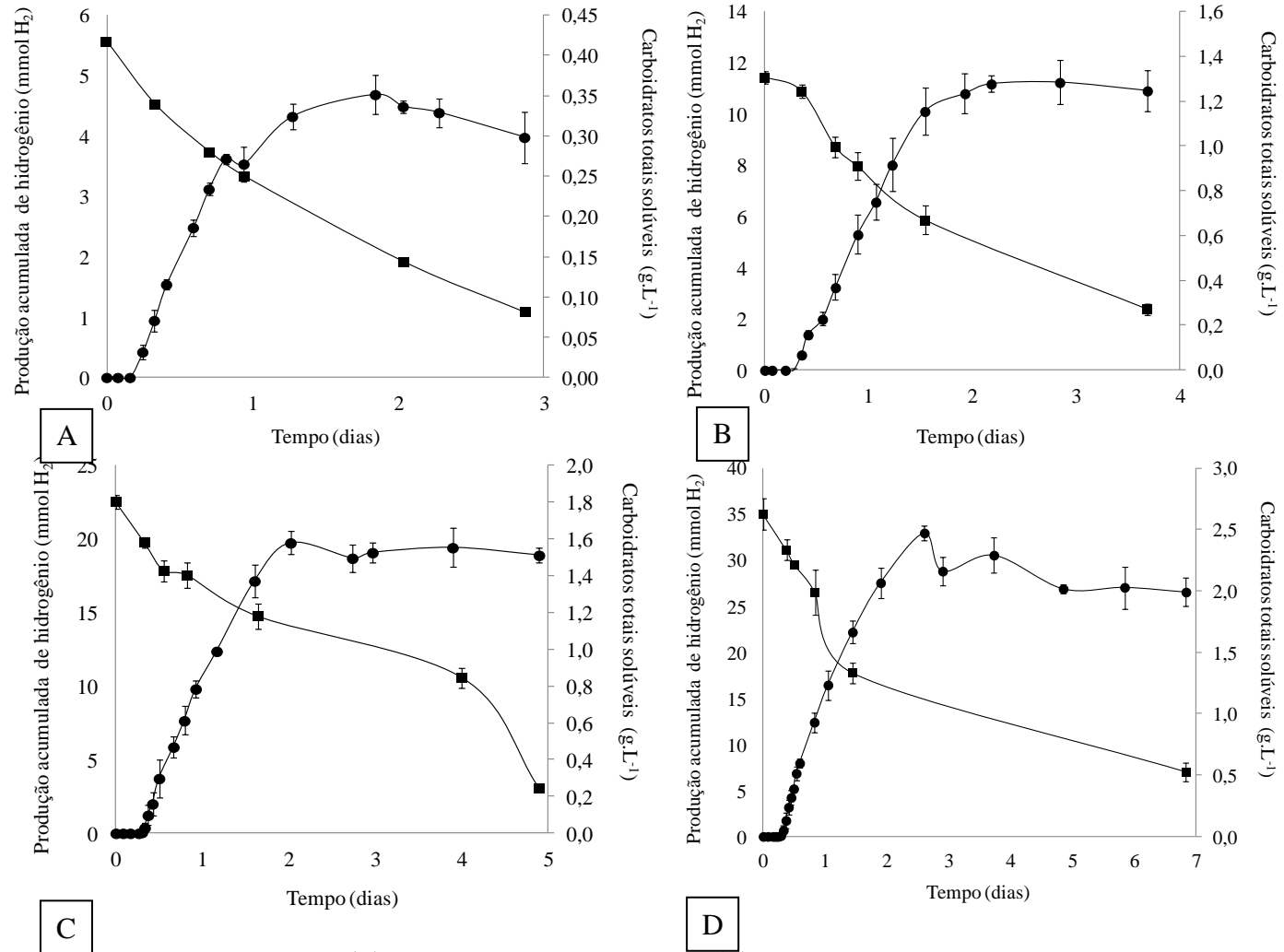


Figura 5.8: Produção acumulada de hidrogênio (●) e consumo de carboidratos (■) para os ensaios mesófilos. (A) – ensaio M2, (B) – ensaio M5, (C) – ensaios M7 e (D) ensaio M12

Tabela 5.3: Ensaio de produção de hidrogênio a 37 °C

Parâmetros		M2	M5	M7	M12
DQO (g L ⁻¹)	Inicial	1,8	5,4	7,1	12,6±1
	Final	1,7	4,8	6,3	11,9±1
Carboidratos totais solúveis (g L ⁻¹)	Inicial	0,42	1,31	1,8	2,62±0,1
	Final	0,08	0,27	0,24	0,52±0,1
Ácido acético (mg L ⁻¹)	Inicial	67,4±16	70,3±18	205,2±24	194±13
	Final	210,7±43	137,4±57	589,1±120,4	1161,7±90
Ácido butírico (mg L ⁻¹)	Inicial	-	-	34,4±5	-
	Final	158,6±21	696,6±130	688,2±151	990,9±170
Ácido propiônico (mg L ⁻¹)	Inicial	-	-	-	-
	Final	83,9±9	384,1±66	140,6±14	-
Etanol (mg L ⁻¹)	Inicial	23,4±14	406,9±71	607,6±30	1575,2±176
	Final	39±30	778,3±101	551,8±11	1597,2±115
SSV (mg L ⁻¹)	Inicial	31,7±4	37,3±2	41,3±6	32±3
	Final	56,2±5	88,4±11	108±21	140±12
Rendimento (mmol H ₂ g ⁻¹ carboidrato)		10,5	8,6	10	10,9
Rendimento (NmL H ₂ g ⁻¹ carboidrato)		235,3	192,6	224	244,2
Produção específica (mmol H ₂ g ⁻¹ SSV)		76,5	126,7	175,9	202,8
Produção (NmL H ₂)		^a 96,3	^a 250,9	^a 425,6	^a 636,2
*P (mmol)		4,3	11,2	19	28,4
*R _m (mmol d ⁻¹)		6,5	10,3	17,5	24,6
*fase Lag (d)		0,2	0,4	0,4	0,3
*R ²		0,995	0,999	0,998	0,993

^aValores em NmL calculados a partir de P (mmol) nas CNTPs.

*valores obtidos por meio do ajuste dos dados ao modelo modificado de Gompertz.

Em todos os reatores foram observados ácido acético, ácido butírico e ácido propiônico, com exceção do ensaio M12, no qual não foi observada a produção deste último ácido citado, mas observou-se a geração de n-butanol.

Em todos os ensaios, na amostra inicial foi detectado ácido acético e etanol, cujas concentrações foram maiores para concentrações de vinhaça mais elevadas (Tabela 5.3).

No ensaio M2 ($1,8 \text{ g DQO L}^{-1}$), foi observada a produção de ácido acético, ácido butírico e ácido propiônico (Figura 5.9). Este último foi detectado no final do ensaio (após 2 dias de incubação), quando a produção de hidrogênio estava estável (Figura 5.8-A).

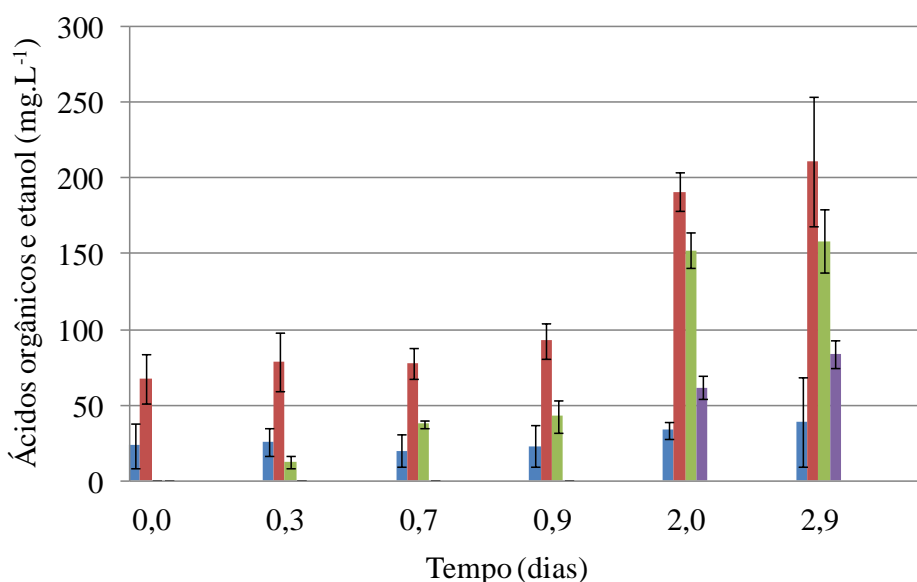


Figura 5.9: Composição dos ácidos orgânicos e etanol para o ensaio M2. (■) Etanol, (■) Ácido acético, (■) Ácido butírico, (■) Ácido propiônico

No ensaio M5 ($5,4 \text{ g DQO L}^{-1}$), também foi observada produção de ácido acético, ácido butírico e ácido propiônico (Figura 5.10). Seguindo o mesmo comportamento observado no ensaio M2, sendo que a produção de ácido propiônico foi observada somente no final do ensaio (1,5 dias) quando a produção de hidrogênio atingiu platô de estabilidade (Figura 5.8-B). Diferente do ensaio M2, a produção de ácido butírico ($696,6 \text{ mg L}^{-1}$) e ácido propiônico ($384,1 \text{ mg L}^{-1}$) foram maiores do que de ácido acético ($137,4 \text{ mg L}^{-1}$). Nesse

ensaio o valor do rendimento de hidrogênio ($8,6 \text{ mmol H}_2 \text{ g}^{-1}$ carboidrato) foi ligeiramente inferior entre os observados para os ensaios mesófilos e pode estar relacionado com a produção dos ácidos butírico e propiônico, pois sabe-se que quando ocorre a geração de ácido butírico o rendimento diminui de $4 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol}^{-1}$ glicose para $2 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol}^{-1}$ glicose. No caso específico da produção do ácido propiônico, há ainda o consumo de H_2 (Bartacek et al. 2007).

Segundo Ntaikou et al. (2010) muitas vezes a geração de metabólitos indesejáveis como por exemplo, etanol, n-butanol, ácido propiônico, ácido láctico, entre outros, ocorre quando o processo fermentativo é realizado por bactérias de metabolismo misto ou por consórcios microbianos. Nesse sentido, sugerem que quando culturas mistas são utilizadas é necessário controlar as condições de cultivos, como por exemplo, pH, de modo a direcionar o metabolismo para a geração de hidrogênio e/ou para a predominância de microrganismos que produzem o referido gás. No presente estudo, o uso do consórcio microbiano e a ausência de controle das condições de cultivo (pH) podem ter contribuído para o desvio de rota metabólica, culminando com a produção dos metabólitos indesejáveis.

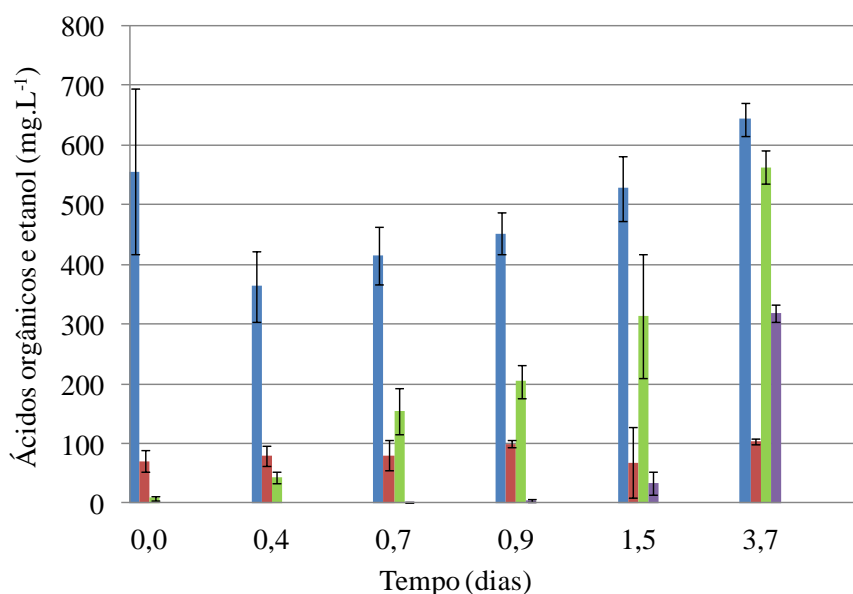


Figura 5.10: Composição dos ácidos orgânicos e etanol para o ensaio M5. (■) Etanol, (■) Ácido acético, (■) Ácido butírico, (■) Ácido propiônico

Para o ensaio M7 (7,1 g DQO L⁻¹) também foi observada produção de ácido acético, ácido butírico e ácido propiônico (Figura 5.11). Seguindo o mesmo comportamento observado nos ensaios M2 e M5, nos quais a produção de ácido propiônico foi observada no final do ensaio quando a produção de hidrogênio já se encontrava estabilizada (Figura 5.8-C).

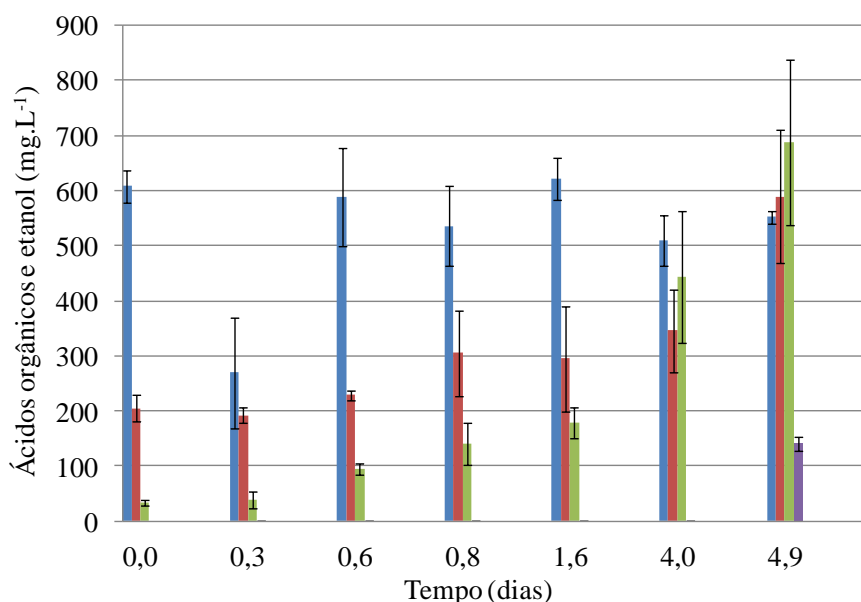


Figura 5.11: Composição dos ácidos orgânicos e etanol para o ensaio M7. (■) Etanol, (■) Ácido acético, (■) Ácido butírico, (■) Ácido propiônico

No ensaio M12 (12,6 g DQO L⁻¹) foram detectados apenas os ácidos acético (1.161,7 mg L⁻¹) e butírico (990,9 mg L⁻¹) (Figura 5.12). Apesar de não ter sido observada a produção de ácido propiônico, que é um metabólito indesejável no processo de produção de hidrogênio, foi detectada a geração de reduzida quantidade de n-butanol (54,85 mg L⁻¹). Tal metabólito pode ser produzido por *Clostridium* por meio da solvetogênese. Estudos relataram que quando o pH do meio atinge valores em torno de 4, os microrganismos alteram a rota metabólica versando da acidogênese para a solvetogênese (Bartacek et al. 2007). A produção de n-butanol no final do ensaio sugere que, possivelmente, devido à geração de grandes quantidades de ácido acético e ácido butírico, ocorreu mudança de rota metabólica.

Dentre os ensaios realizados a 37 °C, a geração de ácido propiônico não foi observada apenas no ensaio M12. Com o objetivo de justificar tal diferença, procurou-se analisar as condições experimentais iniciais dos ensaios, visando pontuar a diferença marcante que pudesse ter sido responsável por esse resultado. A concentração inicial de etanol no ensaio M12 (1,6 g L⁻¹) foi aquela que mais chamou a atenção, já que nos ensaios M2, M5 e M7 as concentrações iniciais desse composto foram inferiores e, respectivamente, 23,4 mg L⁻¹, 0,4 g L⁻¹ e 0,6 g L⁻¹ (Tabela 5.3).

Segundo as análises de DGGE, observou-se alteração no padrão de bandas do gel, sugerindo modificações na estrutura da comunidade microbiana entre todos os ensaios mesófilos (Figura 5.27). Destaca-se que o padrão de bandas do ensaio M12 foi o menos similar em relação aos outros ensaios mesófilos. Adicionalmente, a análise de DGGE, foi realizada a caracterização do consórcio microbiano do ensaio M12 por meio da técnica de clonagem e sequenciamento. Segundo os resultados, 22 % dos clones foram similares a família Ruminococcaceae (Figura 5.30), dentro da qual são encontrados microrganismos como *Ethanoligenes harbiense*, os quais são capazes de fermentar glicose produzindo etanol, ácido acético, H₂ e CO₂, contudo, não são produzidos os ácidos propiônico e succínico.

Ethanoligenes, como sugere o próprio nome do gênero, refere-se a microrganismos produtores de etanol. Devido a essa característica metabólica, pode ser que esses microrganismos apresentem maior tolerância a esse composto e, por isso, seu crescimento tenha sido favorecido nesse ensaio em detrimento dos outros microrganismos. Fato que corrobora com os resultados acerca da composição dos ácidos gerados, já que segundo o relato de Xing et al. (2006) esse microrganismo não é produtor de ácido propiônico.

Foi observada redução do valor de pH em todos os ensaios, sendo que o valor inicial era 5,5 e diminuiu para 4,0 devido à geração dos ácidos orgânicos. Tal comportamento era esperado e relatado nos estudos de produção de hidrogênio, nos quais não é feito controle do pH.

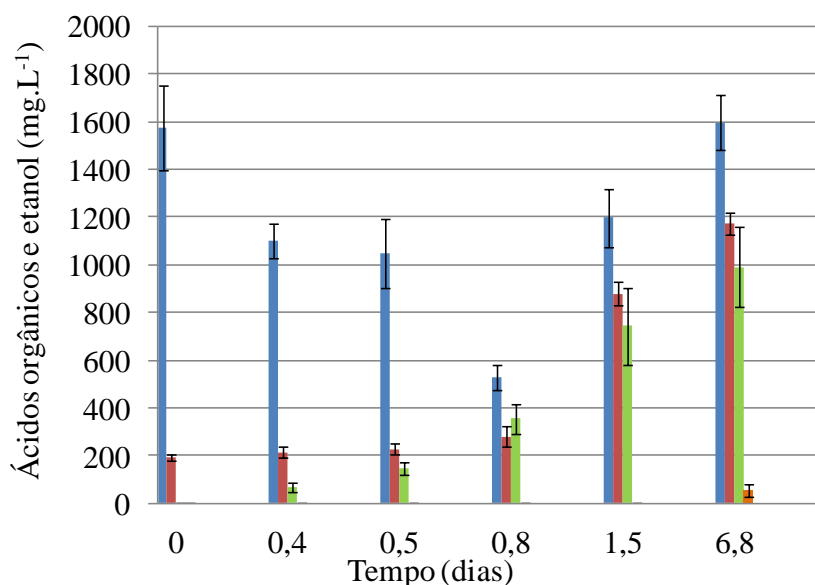


Figura 5.12: Composição dos ácidos orgânicos e etanol para o ensaio M12. (■) Etanol, (■) Ácido acético, (■) Ácido butírico, (■) n-butanol

5.4.2. Ensaio em temperatura termófila

Além dos ensaios em temperatura mesófila foram realizados também ensaios em temperatura termófila, visando avaliar a influência da temperatura na produção de hidrogênio a partir de diferentes concentrações de vinhaça.

Os resultados de produção de hidrogênio: consumo de substrato, produção de ácidos orgânicos e crescimento celular encontram-se sumarizados na Tabela 5.4.

Da mesma forma que para os ensaios a 37 °C, nos ensaios a 55 °C foi observada produção de hidrogênio em todas as concentrações de vinhaça utilizadas (aproximadamente 2 g DQO L⁻¹, 5 g DQO L⁻¹, 7 g DQO L⁻¹ e 12 g DQO L⁻¹) (Figura 5.19). Entretanto, o potencial de produção não aumentou para maiores concentrações de vinhaça e, em geral, foram menores do que os observados para os ensaios a 37 °C.

Assim como foi feito para os dados obtidos nos ensaios mesófilos, a produção de hidrogênio nos ensaios termófilos foi monitorada ao longo do tempo. Os dados foram

ajustados ao modelo modificado de Gompertz (Tabela 5.4) (Apêndice C), o qual se mostrou modelo apropriado para tal uma vez que os valores de R^2 foram superiores a 0,99.

Sob tal condição observou-se uma sutil variação do potencial de produção de hidrogênio (P ; mmol), para as diferentes concentrações de vinhaça. O menor e maior valor foram de 5 mmol H_2 e 6,7 mmol H_2 para 2 g DQO L^{-1} e 12 g DQO L^{-1} de vinhaça, respectivamente (Figura 5.13).

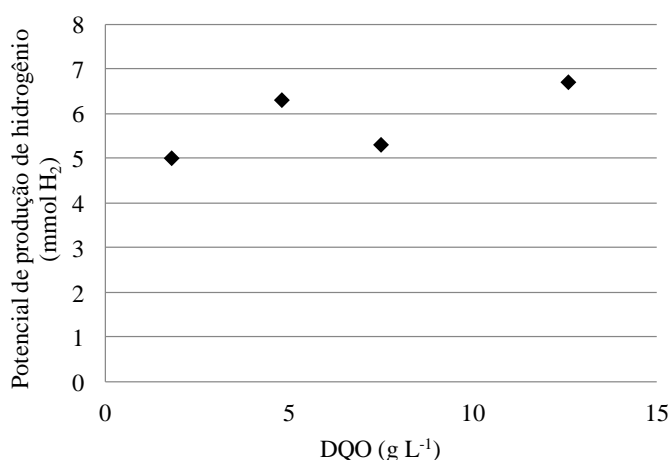


Figura 5.13: Relação entre potencial de produção de hidrogênio (P) e concentração inicial de vinhaça a 55 °C

O resultado esperado era que o potencial de produção de hidrogênio fosse maior nos ensaios em condição termófila do que na mesófila. No entanto, em geral, isso não ocorreu. Somente, para a menor concentração de vinhaça (1,8 g DQO L^{-1}) ocorreu maior produção de hidrogênio, quando comparado com a condição mesófila para a mesma concentração de vinhaça. Nesse caso, o potencial de produção no ensaio M2 foi 4,3 mmol H_2 , enquanto, no ensaio T2 foi 5 mmol H_2 . A partir desses valores, verificou-se que não correspondia a aumento expressivo, contudo, esperava-se que esse ligeiro aumento do potencial de produção em condição termófila fosse observado para todas as concentrações de substrato estudadas.

Em condição termófila verificou-se também que o aumento da concentração do substrato estimulou o crescimento da biomassa; ou seja, de 8,7 mg SSV L^{-1} para

56 mg SSV L⁻¹ com o aumento da concentração de vinhaça de 2 g DQO L⁻¹ para 12 g DQO L⁻¹ (Figura 5.14).

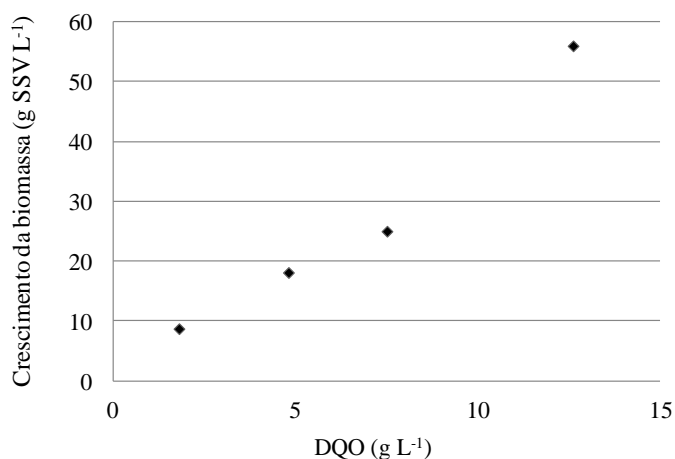


Figura 5.14: Relação entre crescimento da biomassa e concentração inicial de vinhaça a 55 °C

O crescimento da biomassa em condição termófila foi inferior ao crescimento na condição mesófila. Tal fato pode estar relacionado com a concentração inicial de biomassa, pois apesar das tentativas que foram feitas em manter a mesma concentração inicial de biomassa, em ambos os ensaios, isso não foi possível porque o crescimento da biomassa a 55 °C foi sempre inferior àquele observado a 37 °C.

Segundo Hallenbeck (2005), uma das limitações do uso de microrganismos termófilos é justamente essa; ou seja, a incapacidade desses microrganismos de atingir densidade celular elevada, o que acarreta baixa velocidade de produção de hidrogênio e acaba limitando o uso desses microrganismos.

Cakir, Ozmihci e Kargi (2010) usaram lodo submetido ao tratamento térmico (100 °C por 1 h) e, posteriormente, parte dessa biomassa foi adaptada à temperatura termófila, por meio de vários ciclos de crescimento com 3 dias de duração em meio de cultivo suplementado com glicose (60 g L⁻¹) e peptona (10 g L⁻¹). Tal estratégia poderia ter sido utilizada no presente estudo com a finalidade de aumentar a concentração de biomassa termófila. Todavia, ao mesmo tempo em que essa estratégia poderia favorecer o crescimento celular em meio

suplementado com glicose, também, poderia culminar com a inibição do crescimento e produção de hidrogênio por essas células quando o substrato fosse substituído, de glicose para vinhaça.

Além do potencial de produção de hidrogênio e crescimento celular, outros parâmetros foram avaliados, tais como, produção específica de hidrogênio e rendimento. Com relação à produção específica de hidrogênio foi observado comportamento contrário àquele apresentado para o consórcio mesófilo, cujos valores foram maiores para maior concentração de substrato (Figura 5.4).

Para os ensaios termófilos, a produção específica de hidrogênio diminuiu de $178,6 \text{ mmol H}_2 \text{ g}^{-1} \text{ SSV}$ para $83 \text{ mmol H}_2 \text{ g}^{-1} \text{ SSV}$ quando foi aplicada 2 g DQO L^{-1} e 12 g DQO L^{-1} de vinhaça, respectivamente (Figura 5.15). Isso ocorreu porque o crescimento da biomassa aumentou com o aumento da concentração de substrato, todavia, o potencial de produção de hidrogênio manteve-se praticamente constante.

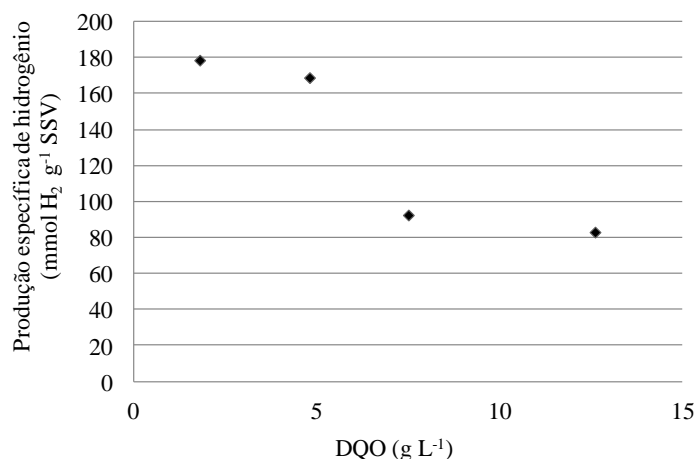


Figura 5.15: Relação entre produção específica de hidrogênio e concentração inicial de vinhaça a $55 \text{ }^\circ\text{C}$

O rendimento de hidrogênio seguiu a mesma tendência da produção específica. O maior rendimento foi de $21,7 \text{ mmol H}_2 \text{ g}^{-1} \text{ carboidrato}$ para 2 g DQO L^{-1} , diminuindo para $7 \text{ mmol H}_2 \text{ g}^{-1} \text{ carboidrato}$ (5 g DQO L^{-1}), depois para $3,5 \text{ mmol H}_2 \text{ g}^{-1} \text{ carboidrato}$ (7 g DQO L^{-1}) e atingindo o menor valor ($3,2 \text{ mmol H}_2 \text{ g}^{-1} \text{ carboidrato}$) quando foi aplicada

12 g DQO L⁻¹ de vinhaça (Figura 5.16). A partir desses resultados pode-se dizer que o aumento na concentração de substrato foi prejudicial para a produção de hidrogênio, levando-se em consideração o parâmetro rendimento.

O resultado esperado era que em temperatura termófila, o rendimento de produção de hidrogênio fosse maior, em relação aquele obtido a 37 °C. Porém, esse resultado não foi observado quando se comparou os ensaios em temperaturas diferentes (37 °C e 55 °C), mas com a mesma concentração de substrato. Somente, para a menor concentração de substrato (2 g DQO L⁻¹), o rendimento em temperatura termófila, ensaio T2 (21,7 mmol H₂ g⁻¹ carboidratos) foi maior em relação aquele para temperatura mesófila, M2 (10,5 mmol H₂ g⁻¹ carboidratos).

Para a faixa de concentração de vinhaça utilizada, o resultado esperado era que o rendimento não sofresse grandes alterações, como foi observado para os ensaios a 37 °C, ou que aumentasse com o aumento da concentração de substrato. Todavia, o rendimento diminuiu drasticamente de 21,7 mmol H₂ g⁻¹ carboidratos para 3,2 mmol H₂ g⁻¹ carboidratos, quando foi aplicada, respectivamente, 2 g DQO L⁻¹ e 12 g DQO L⁻¹ de vinhaça.

Em geral, o rendimento aumenta com aumento da concentração de substrato até atingir valor máximo e, para concentrações mais elevadas, ocorre diminuição nesse rendimento. No presente estudo não era esperada diminuição do rendimento de hidrogênio, para as concentrações de substrato utilizadas, porque essas não eram tão elevadas quanto às empregadas em outros estudos, como, por exemplo, 12,5 g xilose L⁻¹ (Ren et al., 2008) e 30 g amido L⁻¹ (Akutsu et al., 2009) acima das quais foi observada redução do rendimento (Ren et al. 2008, Akutsu et al. 2009).

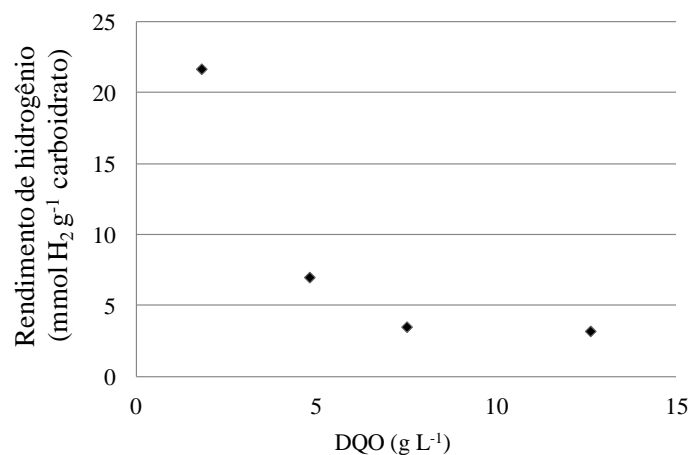


Figura 5.16: Relação entre rendimento de produção de hidrogênio e concentração inicial de vinhaça a 55 °C

Ren et al. (2008), avaliaram a produção de hidrogênio por *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* W16 em testes em batelada. Os autores obtiveram entre 2 e 2,5 mol H₂ mol⁻¹ xilose para 4 e 10 g xilose L⁻¹, porém, para valores acima de 12,5 g xilose L⁻¹, esse rendimento diminuiu sensivelmente, atingindo 0,6 mol H₂ mol⁻¹ xilose, por exemplo, para 25 g xilose L⁻¹. Os autores mencionaram que, provavelmente, essa redução de rendimento foi devida ao acúmulo dos ácidos, por conseguinte, alteração de pH ou inibição pelos produtos gerados.

Reforçando o que já foi dito anteriormente sobre rendimento, esse é um parâmetro de grande importância juntamente com a taxa de produção para se avaliar o processo. Assim, diante dos resultados apresentados, o consórcio termófilo adaptado de lodo mesófilo não representou fonte adequada de biomassa para a produção de hidrogênio a partir de vinhaça de cana-de-açúcar para concentrações acima de 2 g DQO L⁻¹.

Sendo a vinhaça um resíduo com elevada carga orgânica (~20 g DQO_{filtrada} L⁻¹, conforme a média de valores medidos para os dois lotes de vinhaça utilizados no presente estudo), seria necessário diluir a vinhaça pelo menos 10 vezes para que este resíduo pudesse ser utilizado como substrato pelo consórcio termófilo enriquecido no presente estudo.

Em relação à porcentagem de consumo de substrato observou-se valores inferiores nos ensaios termófilos. Para tanto, avaliou-se a razão entre a concentração de substrato e concentração de microrganismos (S/M). Desse modo, verificou-se relação superior para todos os ensaios termófilos (22 – T2; 66 – T5; 62 – T7 e 124 – T12) em relação aos mesófilos (13 –

M2; 35 – M5; 44 – M7 e 82 – M12) (Figura 5.17). Quanto maior essa relação, maior é a disponibilidade de substrato para determinada concentração de biomassa. Assim, se há muito mais substrato do que a capacidade dos microrganismos de consumi-lo, menor será a porcentagem de consumo.

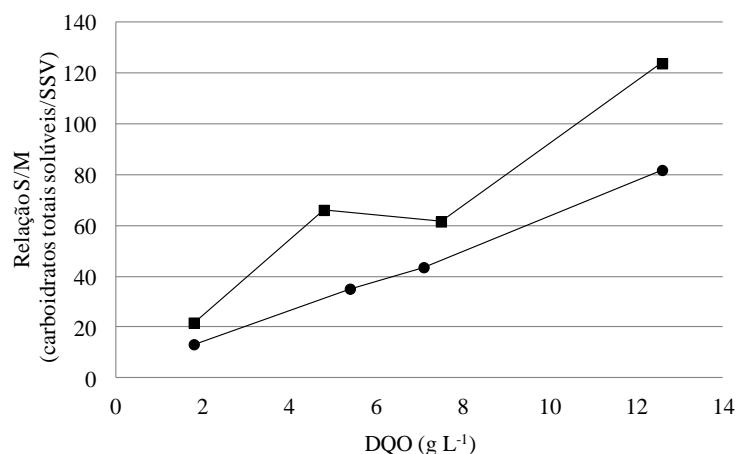


Figura 5.17: Relação entre concentração de carboidratos totais solúveis e sólidos suspensos voláteis nos ensaios a 37 °C (●) e 55 °C (■)

A porcentagem de consumo de substrato foi de 36, 57, 61 e 53 %, respectivamente, para os ensaios T2, T5, T7 e T12 (Figura 5.18). Observou-se que o consumo de substrato aumentou para concentração de até 7 g DQO L⁻¹. Todavia, esse valor diminuiu para 53 % quando foi aplicada vinhaça na concentração de 12 g DQO L⁻¹ (Figura 5.18). A maior porcentagem de consumo; ou seja, de 61 % obtida no ensaio T7 foi provavelmente devido a maior quantidade inicial de biomassa (32,3 mg SSV L⁻¹) neste ensaio.

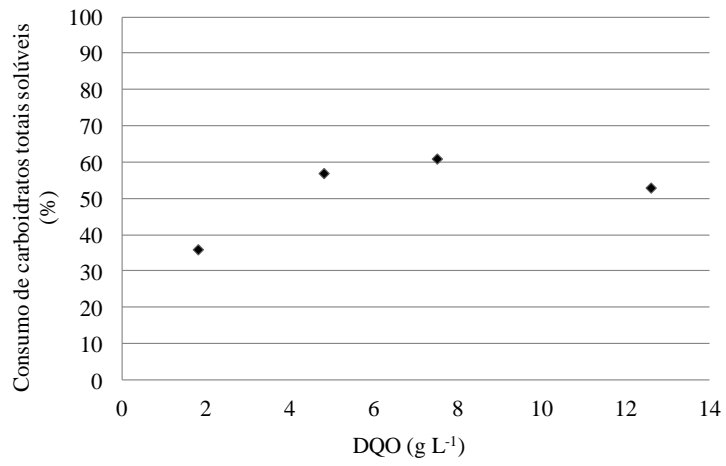


Figura 5.18: Relação entre a porcentagem de consumo de substrato e concentração inicial de vinhaça a 55 °C

Tabela 5.4: Ensaios de produção de hidrogênio a 55 °C

Parâmetros		T2	T5	T7	T12
DQO (g L ⁻¹)	Inicial	1,8	4,8	7,5	12,6
	Final	1,8	4,7	6,7	11,6±1
Carboidratos totais solúveis (g L ⁻¹)	Inicial	0,42	1,27	1,99±0,1	3,06
	Final	0,24	0,55	0,77	1,43
Ácido acético (mg L ⁻¹)	Inicial	81,8±11	24,6±11	194,9±24	130,5±39
	Final	36,1±12	52,3±10	141,5±17	152,6±6
Ácido butírico (mg L ⁻¹)	Inicial	-	-	20,6±5	-
	Final	183,8±35	101,4±8	172,1±31	137,8±52
Ácido propiônico (mg L ⁻¹)	Inicial	-	-	-	-
	Final	-	-	91,4±8	-
Etanol (mg L ⁻¹)	Inicial	32,8±3	481,8±38	572,7±77	1.668±30
	Final	54±10	671,9±17	513,7±170	1789,2±128
SSV (mg L ⁻¹)	Inicial	19,3±2	19,2±2	32,3±2	24,7±2
	Final	28±2	37,3±3	57,3±2	80,7±1
Rendimento					
(mmol H ₂ g ⁻¹ carboidrato)		21,7	7	3,5	3,2
Rendimento					
(NmL H ₂ g ⁻¹ carboidrato)		486,1	156,8	78,4	71,7
Produção específica					
(mmol H ₂ g ⁻¹ SSV)		178,6	168,9	92,5	83
Produção (NmL H ₂)		^a 112	^a 141,1	^a 118,7	^a 150,1
* <i>P</i> (mmol)		5,0	6,3	5,3	6,7
* <i>R_m</i> (mmol d ⁻¹)		1,4	1,5	0,6	3,4
*fase <i>Lag</i> (d)		1,0	0,2	1,6	0,6
* <i>R</i> ²		0,995	0,991	0,995	0,995

^aValores em NmL calculados a partir de *P* (mmol) nas CNTPs.

*parâmetros obtidos por meio do ajuste dos dados ao modelo modificado de Gompertz.

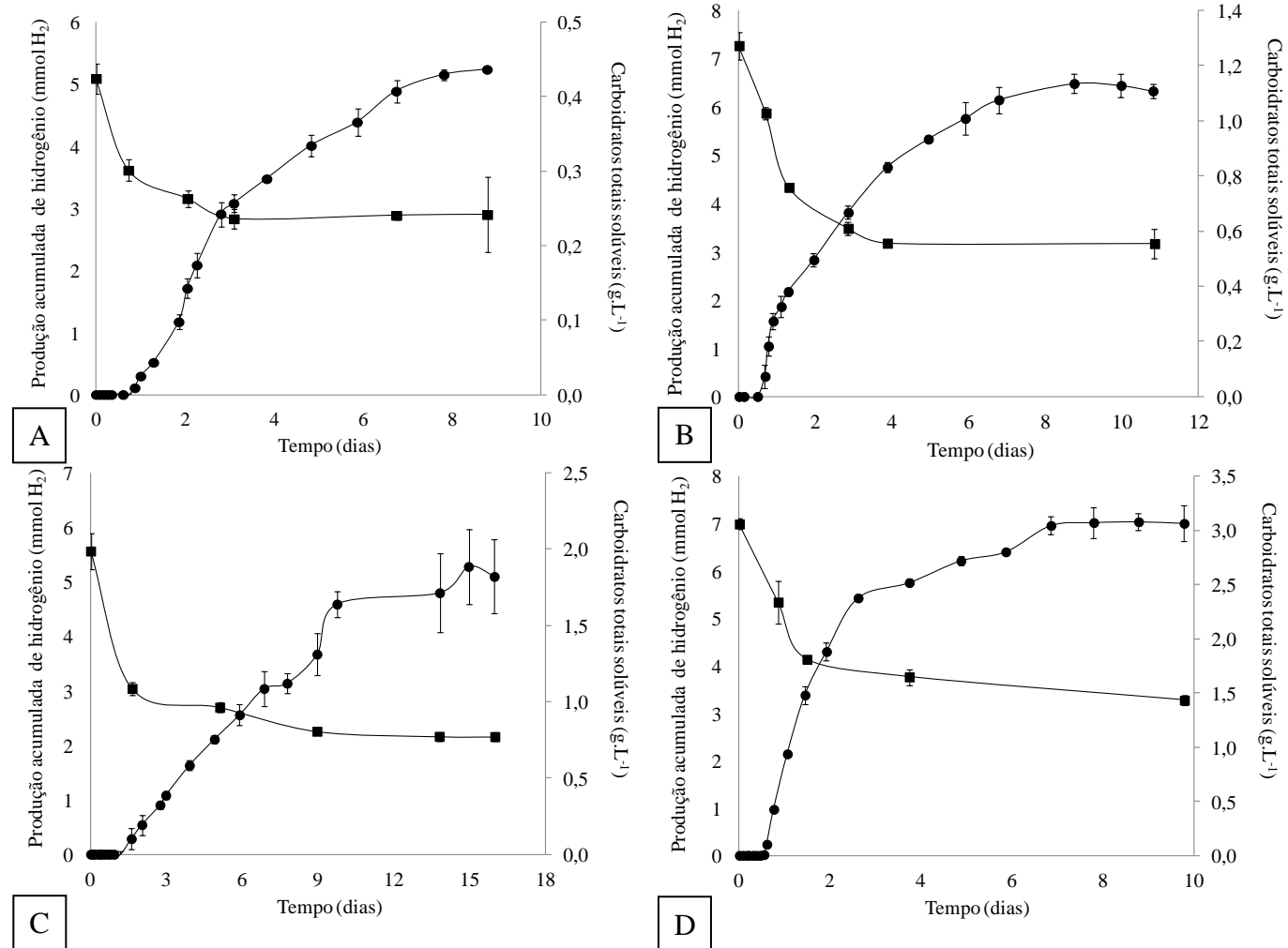


Figura 5.19: Produção acumulada de hidrogênio (●) e consumo de carboidratos (■) para os ensaios termófilos. (A) – ensaio T2, (B) – ensaio T5, (C) – ensaio T7 e (D) ensaio T12

Além das amostras do *headspace* para análise da produção de hidrogênio, foram coletadas amostras para quantificar os produtos líquidos, ácidos e alcoóis. Assim como para os ensaios a 37 °C, também foi observada a presença de ácido acético e etanol, nas amostras coletadas no início dos ensaios a 55 °C. A concentração desses compostos foi maior para concentrações mais elevadas de vinhaça (Tabela 5.4).

Em todos os ensaios realizados a 55 °C observou-se que a fermentação dos carboidratos da vinhaça culminou com a geração de ácido butírico (183,8 mg L⁻¹ - T2; 101,4 mg L⁻¹ - T5; 172,1 mg L⁻¹ - T7 e 137,8 mg L⁻¹ - T12), exceto no ensaio T7, no qual também foi observada a produção de ácido propiônico (91,4 mg L⁻¹) (Figura 5.20; Figura 5.21; Figura 5.22; Figura 5.23).

Todos os ensaios termófilos foram finalizados quando a produção de hidrogênio encontrava-se estável. Em geral, para os ensaios termófilos o período de ensaio foi maior do que para os ensaios mesófilos. No ensaio T7, em especial, a duração do ensaio foi ainda maior; ou seja, 16 dias, uma vez que, a produção de H₂ foi estável a partir de 14 dias de ensaio. Ressalta-se que nesse ensaio, após o décimo terceiro dia, detectou-se a presença do ácido propiônico (Figura 5.22).

Na maioria dos estudos de produção de hidrogênio são utilizados substratos sintéticos, resultando em ausência de ácidos orgânicos ou alcoóis no início dos ensaios, exceto naqueles em que tais compostos são adicionados com o objetivo de se avaliar, justamente, a influência dos mesmos na produção de hidrogênio (Liu et al. 2008, Wang et al. 2008).

Todavia, quando se aplica água residuária real, isso nem sempre ocorre, como por exemplo, aquilo observado nesse estudo, no início de operação do reator em batelada foi detectada a presença de ácido acético e etanol, os quais são produtos da fermentação de carboidratos. Muitas vezes é sugerido que o acúmulo desses produtos ao longo do período de operação seja responsável pela inibição da produção de hidrogênio (inibição pelos produtos gerados). Dessa maneira, a presença de tais compostos no início do período de incubação pode ter sido responsável pela reduzida produção de hidrogênio observada nos ensaios termófilos.

Wang et al. (2008) estudaram o efeito inibitório da adição de etanol, ácido acético, ácido butírico e ácido propiônico na produção fermentativa de hidrogênio em pH 7,0 a 35 °C,

utilizando como substrato a glicose. Os autores verificaram que a eficiência de degradação do substrato, potencial de produção de hidrogênio, rendimento e taxa máxima de produção diminuíram com o aumento da concentração dos referidos compostos (de 0 a 300 mmol L⁻¹). Além disso, observaram também que o efeito inibitório do etanol foi menor do que a inibição causada pela adição dos ácidos orgânicos.

Ressalta-se que as concentrações utilizadas no estudo de Wang et al. (2008) variaram de 10 mmol L⁻¹ (0,6 g L⁻¹ para ácido acético e 0,46 g L⁻¹ para etanol) para 300 mmol L⁻¹ (18 g L⁻¹ para ácido acético e 13,8 g L⁻¹ para etanol). Sendo que no presente estudo as maiores concentrações de ácido acético e etanol foram de 194,9 mg L⁻¹ e 1,7 g L⁻¹, as quais não foram tão elevadas como as concentrações máximas estudadas por esses autores mencionados anteriormente.

Devido ao menor consumo de substrato e menor produção de ácidos, a diminuição no valor de pH nos ensaios termófilos (pH final igual a 4,5) foi menor do que nos ensaios mesófilos (pH final igual a 4,0).

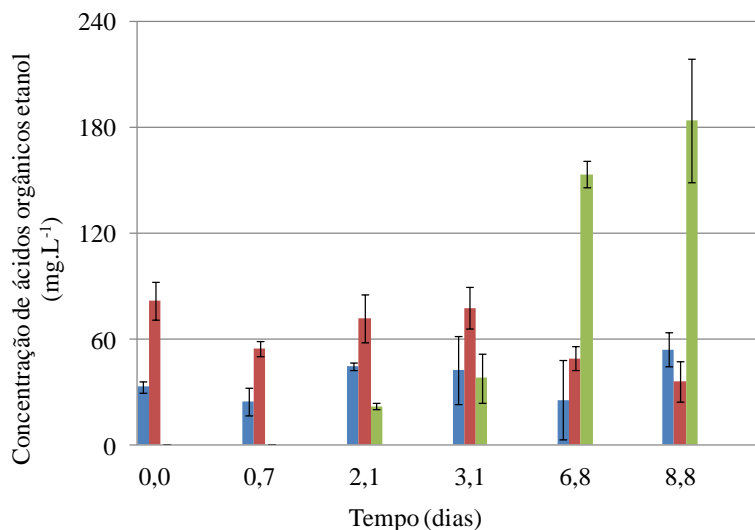


Figura 5.20: Composição dos ácidos orgânicos e etanol para o ensaio T2. (■) Etanol, (■) Ácido acético, (■) Ácido butírico

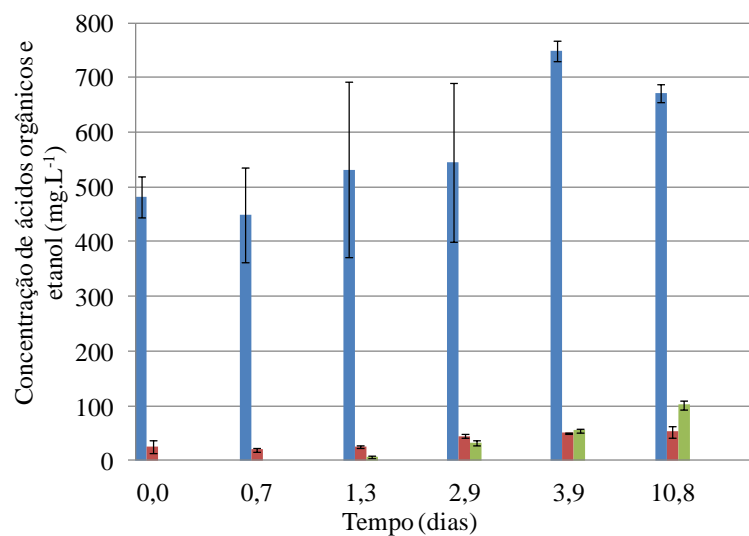


Figura 5.21: Composição dos ácidos orgânicos e etanol para o ensaio T5. (■) Etanol, (■) Ácido acético, (■) Ácido butírico

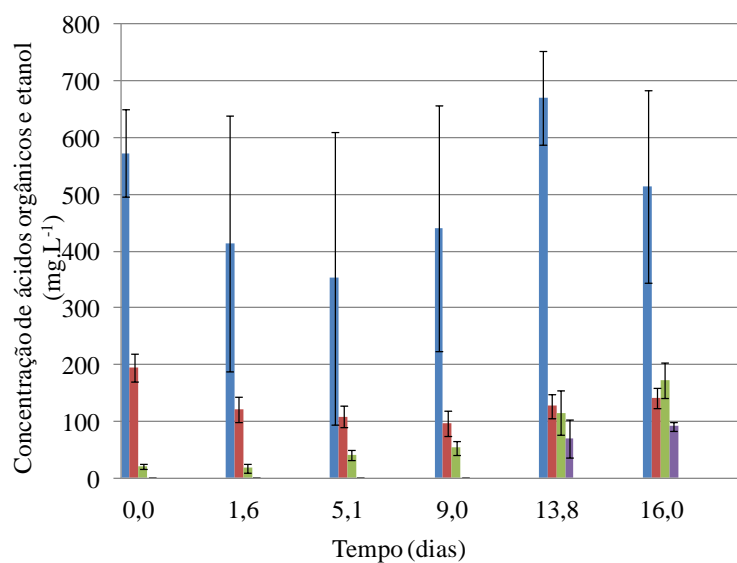


Figura 5.22: Composição dos ácidos orgânicos e etanol para o ensaio T7. (■) Etanol, (■) Ácido acético, (■) Ácido butírico; (■) Ácido propiônico

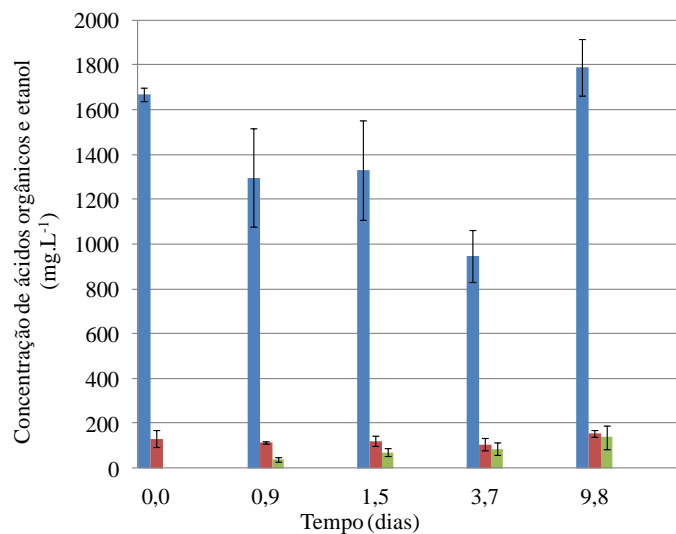


Figura 5.23: Composição dos ácidos orgânicos e etanol para o ensaio T12. (■) Etanol, (■) Ácido acético, (■) Ácido butírico

5.4.3. Análise comparativa da produção de hidrogênio em condição mesófila e termófila

Esse item destina-se a comparar resumidamente os resultados obtidos nos ensaios em temperatura mesófila (item 5.4.1.) e termófila (item 5.4.2.), e também apresentar os resultados de outros estudos nos quais essa comparação também foi realizada (Figura 5.24; Figura 5.25; Figura 5.26).

De maneira contrária ao resultado esperado, obteve-se para os ensaios a 37 °C maior potencial de produção de H₂, maior consumo de substrato e rendimento, em relação aquele realizado a 55 °C.

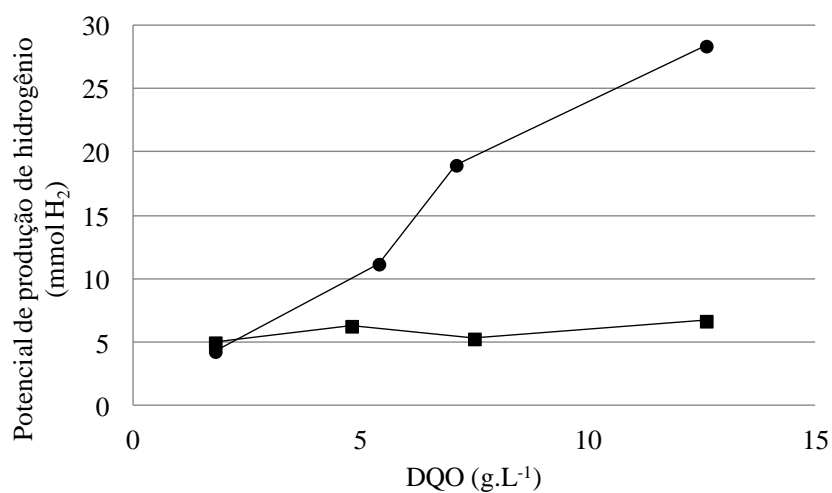


Figura 5.24: Relação entre o potencial de produção de hidrogênio (P) e concentração de substrato nos ensaios a 37 °C (●) e 55 °C (■)

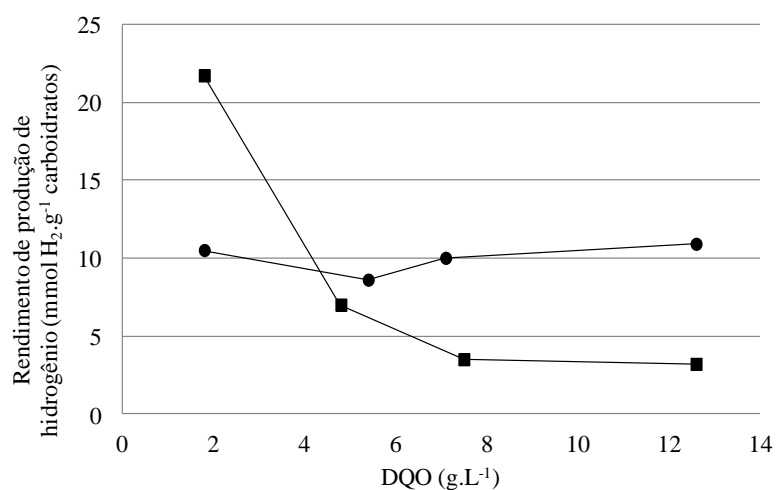


Figura 5.25: Relação entre o rendimento de produção de hidrogênio e concentração de substrato nos ensaios a 37 °C (●) e 55 °C (■)

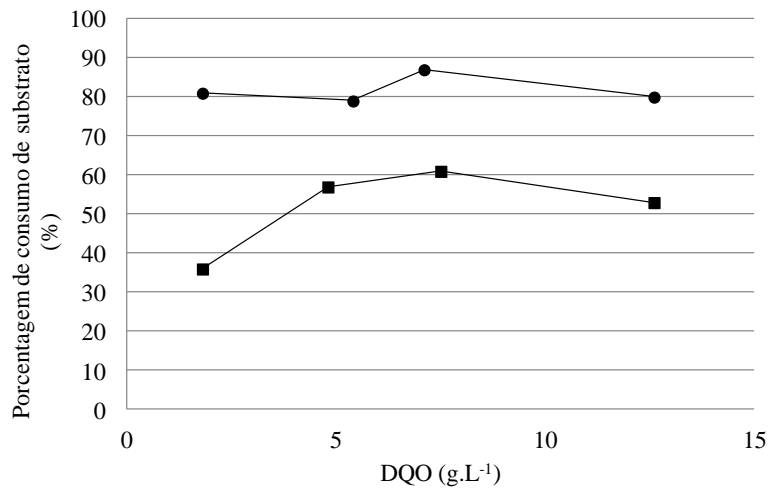


Figura 5.26: Relação entre a porcentagem de consumo de substrato e concentração de substrato nos ensaios a 37 °C (●) e 55 °C (■)

Como já mencionado, além do presente trabalho, outros autores também avaliaram a influência da temperatura na fermentação de carboidratos para produção de hidrogênio. De acordo com os dados reportados não existe consenso sobre qual é a temperatura ideal para otimizar o processo.

De acordo com os resultados reportados por Shin et al. (2004), a produção de hidrogênio a partir de resíduos alimentícios foi maior em temperatura termófila do que em mesófila, na qual foi detectada a produção de CH₄. Nesse estudo os autores utilizaram dois tipos de inóculo: cultura mesofílica e termofílica retiradas de dois CSTR operados a 35 °C e 55 °C, respectivamente. Como esses inóculos não receberam nenhum tratamento para eliminar os microrganismos consumidores de H₂, os autores concluíram que a temperatura termofílica inativou a metanogênese resultando em maior rendimento de produção de hidrogênio.

Lee et al. (2008) relataram que a condição mesófila foi mais adequada para a produção de hidrogênio, na qual foi observado potencial de produção de 1.447 mL H₂ de H₂ (37 °C), enquanto, em condição termófila observou-se somente 241 mL H₂. Todavia, ressalta-se que os autores avaliaram a melhor condição com base no potencial de produção de H₂, e não com base no rendimento do processo, já que esse valor foi menor a 37 °C (1 mmol H₂ g⁻¹ amido) do que a 55 °C (1,44 mmol H₂ g⁻¹ amido).

Baghchehsaraee et al. (2010) estudaram a produção de hidrogênio em temperatura mesófila (37 °C) e termófila (55 °C) a partir de amido de mandioca utilizando dois tipos de inóculo: lodo ativado e lodo anaeróbio. A partir dos resultados obtidos foi possível concluir que a fonte de inóculo exerceu influência na produção de hidrogênio nas duas temperaturas testadas. O potencial de produção de hidrogênio e o rendimento obtido no ensaio usando o lodo ativado como inóculo foi maior a 55 °C (177,5 mL H₂; 1,32 mol H₂ g⁻¹ glicose) do que a 37 °C (44,1 mL H₂; 0,56 mol H₂ g⁻¹ glicose). Em relação ao potencial de produção de hidrogênio e rendimento do ensaio inoculado com lodo anaeróbio, os autores observaram valores maiores a 37 °C (275,1 mL H₂ e 2,18 mol H₂ g⁻¹ glicose) do que a 55 °C (214 mL H₂; 1,25 mol H₂ g⁻¹ glicose), respectivamente. Ambos os inóculos foram submetidos ao tratamento térmico (65 °C por 30 min), e dessa forma, somente os microrganismos formadores de endósporos foram selecionados nos dois casos. Contudo, ainda que submetidos ao mesmo pré-tratamento, provavelmente, a comunidade microbiana de cada inóculo era diferente, o que justificou os resultados observados em cada caso.

Ainda, com relação à produção de hidrogênio em temperaturas diferentes, Cakir et al. (2010) relataram que a maior produção de hidrogênio ocorreu em condição termófila. Todavia, além da temperatura, os autores avaliaram ainda a produção a partir substrato submetido a dois pré-tratamentos diferentes: hidrólise ácida e cozimento de trigo. Os autores não destacaram que a maior produção a 55 °C foi observada a partir do hidrolisado ácido de trigo, sendo a maior produção de 752,3 mL H₂ (55 °C) em comparação com 600 mL H₂ (37 °C). Contudo, para o substrato submetido à fervura não foi observado o mesmo resultado, sendo a produção a 37 °C (125,7 mL H₂) ligeiramente superior àquela observada a 55 °C (115,7 mL H₂). Assim, provavelmente, além da influência da fonte de inóculo, o tipo de substrato empregado também afetou a produção de hidrogênio.

Diante dos resultados relatados, verificou-se que no presente estudo que a fonte de inóculo foi adequada para obtenção de consórcio mesófilo. Todavia, a biomassa proveniente de reator UASB não foi adequada para obtenção de diversidade de bactérias termófilas, uma vez que, o consórcio microbiano apresentou 96 % de clones semelhantes a *Thermoanaerobacterium*. Nesse caso, recomenda-se a utilização de inóculo em tal condição de temperatura, os quais podem ser obtidos de reatores operados em condição termófila, com a finalidade de obter maior diversidade filogenética termófila.

5.4.4. Balanço de carbono

Por meio da determinação da $DQO_{inicial}$ e DQO_{final} verificou-se que a eficiência de remoção de matéria orgânica foi bastante reduzida, em todos os ensaios. Tal fato era esperado, considerando que a matéria carbonácea foi oxidada a ácidos orgânicos e, não totalmente, mineralizada a CH_4 e CO_2 , como ocorre quando a digestão anaeróbia é completa. A eficiência de remoção de DQO variou entre 6 a 11 % para os ensaios a 37 °C e entre 0 a 11 % para os ensaios 55 °C.

Tabela 5.5: DQO inicial e final, e eficiência de remoção de DQO para os ensaios mesófilos e termófilos

Ensaio	$DQO_{inicial}$ (g L ⁻¹)	DQO_{final} (g L ⁻¹)	Eficiência (%)
M2	1,8	1,7	6
M5	5,4	4,8	11
M7	7,1	6,3	11
M12	12,6±1	11,9±1	6
T2	1,8	1,8	-
T5	4,8	4,7	2
T7	7,5	6,7	11
T12	12,6±1	11,6±1	8

A partir dos metabólitos quantificados por cromatografia gasosa e os carboidratos totais solúveis calculou-se a $DQO_{teórica}$, a qual foi menor do que a DQO_{medida} nas duas condições de temperatura estudadas, tanto nas amostras do início, quanto do final do ensaio. Calculou-se também a porcentagem da $DQO_{teórica}$ em relação a DQO_{medida} .

Nos ensaios a 37 °C, a porcentagem da $DQO_{teórica}$ em relação a DQO_{medida} inicial variou de 32 % a 44 %. No final do ensaio, a porcentagem da $DQO_{teórica}$ em relação a DQO_{medida} final, foi ligeiramente superior e variou de 46 % a 70 % (Tabela 5.6). Para os ensaios a 55 °C, os

valores observados foram: 34 % a 47 % e 30 % a 39 %, respectivamente, para a porcentagem da $DQO_{teórica}$ em relação a $DQO_{medida\ inicial}$ e $DQO_{teórica}$ em relação a $DQO_{medida\ final}$ (Tabela 5.7).

Valores próximos a 100 % indicariam que os compostos analisados (ácidos orgânicos, solventes, carboidratos) eram os responsáveis pela DQO_{medida} . Todavia, os valores de $DQO_{teórica}$ obtidos foram bastante reduzidos indicando que compostos orgânicos não quantificados e, por isso, não considerados para fins do cálculo de $DQO_{teórica}$ estão presentes na vinhaça de cana-de-açúcar e são responsáveis pela DQO_{medida} . Como exemplo para estas substâncias pode-se citar composto fenólico (ácido tânico e ácido húmico), melanoidina e furfural, os quais podem estar presentes na vinhaça (Wilkie et al. 2000). Tais compostos são conhecidos por serem inibidores para processos de fermentação, para os microrganismos do rúmen, bem como para o tratamento biológico deste resíduo.

Análise de compostos orgânicos por cromatografia líquida de alta eficiência foi realizada com o objetivo de quantificar ácidos orgânicos não voláteis, além dos voláteis mensurados por cromatografia gasosa. Entretanto, o método cromatográfico empregado não foi adequado uma vez que no cromatograma não foram observados picos bem resolvidos. Possivelmente, devido à complexidade da amostra seja necessário tratamento preliminar da mesma ou o uso de diferente método de análise.

Amostras brutas de vinhaça de cana-de-açúcar foram enviadas para a empresa Eurofins do Brasil Análise de Alimentos Ltda porque não foi possível determinar a composição de açúcares presentes na vinhaça por meio de metodologia cromatográfica implantada no Laboratório de Processos Biológicos. Segundo os relatórios apresentados pela empresa responsável por tais análises, a concentração dos açúcares frutose, glicose, lactose, maltose e sacarose encontrava-se abaixo do limite de detecção do método utilizado (Apêndice D).

Tabela 5.6: DQO_{teórica}, DQO quantificada e relação DQO_t/DQO para os ensaios mesófilos

Ensaio	DQO _{inicial}					DQO _t /DQO (%)
	DQO _t	DQO _t	DQO _t	DQO _t	DQO	
	carboidratos totais	EtOH	HAc	Total	Total	
	(g L ⁻¹)	(g L ⁻¹)	(g L ⁻¹)	(g L ⁻¹)	(g L ⁻¹)	
M2	0,47	0,03	0,07	0,57	1,8	32
M5	1,48	0,57	0,07	2,12	5,4	39
M7	2,03	0,85	0,22	3,1	7,1	44
M12	2,96	2,19	0,21	5,36	12,6±1	44

Ensaio	DQO _{final}							DQO _t /DQO (%)
	DQO _t	DQO _t	DQO _t	DQO _t	DQO _t	DQO _t	DQO	
	carboidratos totais	EtOH	HAc	HBu	HPr	Total	Total	
	(g L ⁻¹)	(g L ⁻¹)	(g L ⁻¹)	(g L ⁻¹)	(g L ⁻¹)	(g L ⁻¹)	(g L ⁻¹)	
M2	0,09	0,05	0,22	0,29	0,13	0,78	1,7	46
M5	0,3	1,08	0,15	1,27	0,58	3,38	4,8	70
M7	0,27	0,77	0,63	1,25	0,21	3,13	6,3	53
M12	0,59	2,22	1,24	1,80	-	5,85	11,9±1	49

Tabela 5.7: DQO_{teórica}, DQO quantificada e relação DQO_t/DQO para os ensaios termófilos

Ensaio	DQO _{inicial}						DQO _t /DQO (%)
	DQO _t	DQO _t	DQO _t	DQO _t	DQO		
	carboidratos totais	EtOH	HAc	Total	Total		
	(g L ⁻¹)	(g L ⁻¹)	(g L ⁻¹)	(g L ⁻¹)	(g L ⁻¹)		
T2	0,47	0,05	0,09	0,61	1,8		34
T5	1,43	0,67	0,03	2,13	4,8		44
T7	2,25	0,80	0,21	3,26	7,5		43
T12	3,45	2,32	0,14	5,91	12,6±1		47

Ensaio	DQO _{final}							DQO _t /DQO (%)
	DQO _t	DQO _t	DQO _t	DQO _t	DQO _t	DQO _t	DQO	
	carboidratos totais	EtOH	HAc	HBu	HPr	Total	Total	
	(g L ⁻¹)	(g L ⁻¹)	(g L ⁻¹)	(g L ⁻¹)	(g L ⁻¹)	(g L ⁻¹)	(g L ⁻¹)	
T2	0,27	0,07	0,04	0,33	-	0,71	1,8	39
T5	0,62	0,93	0,05	0,18	-	1,78	4,7	38
T7	0,87	0,71	0,15	0,31	0,14	2,04	6,7	30
T12	1,61	2,49	0,16	0,25	-	4,51	11,6±1	39

5.5. Caracterização microbiana

A seguir serão apresentados os resultados das análises de biologia molecular: DGGE (item 5.5.1.), PCR em tempo real (item 5.5.2.), clonagem e sequenciamento (item 5.5.3) e aproximação filogenética das cepas dos microrganismos isolados (item 5.5.4.).

5.5.1. Eletroforese em gel com gradiente desnaturante

A partir da construção do dendrograma foi observado que as amostras foram distribuídas em dois grandes grupos. Em um deles foram agrupadas amostras dos ensaios de produção de hidrogênio realizados a 37 °C e o inóculo (lodo granulado). No outro grupo foram arranjadas as amostras dos ensaios termófilos (Figura 5.27).

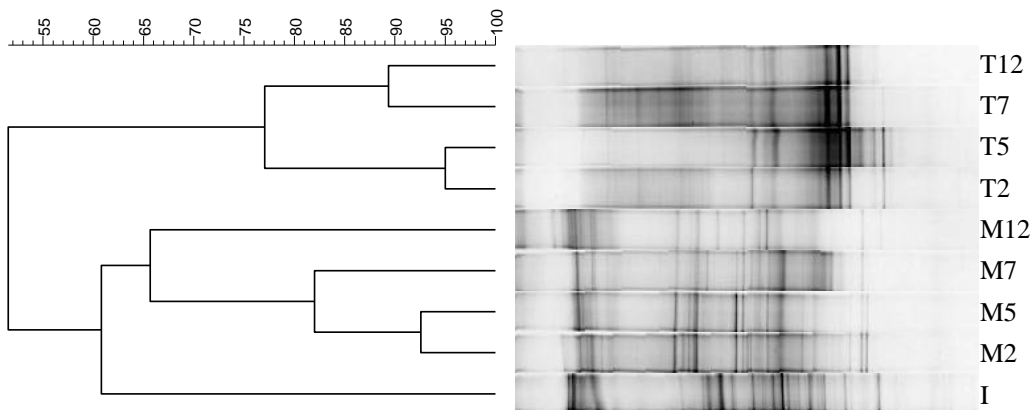


Figura 5.27: Dendrograma construído com todas as amostras utilizando o coeficiente de DICE

Essa separação entre amostras dos ensaios mesófilos e termófilos era esperada, já que a temperatura de incubação é considerada fator importante na seleção de populações microbianas.

A partir do dendrograma observou-se que as amostras mesófilas dos ensaios M2 e M5 foram 93 % similares. A amostra do ensaio M7 foi 82 % similar a essas duas já citadas, enquanto, aquela do ensaio M12 foi similar somente em 66% com as outras amostras (M2, M5 e M7). Provavelmente, concentração crescente de vinhaça (2 g DQO L⁻¹, 5 g DQO L⁻¹, 7 g DQO L⁻¹ e 12 g DQO L⁻¹) favoreceu alteração na estrutura das comunidades microbianas, por conseguinte, alteração das populações e redução da similaridade entre as amostras, sendo, nesse caso, portanto, fator seletivo importante (Figura 5.27). Como já foi mencionado, o primeiro grande grupo reuniu as amostras dos ensaios em condição mesófila com o inóculo original. Todavia, a similaridade entre as amostras M2, M5, M7, M12 e o inóculo foi de apenas 61 %. Assim, ainda que estas amostras tenham sido agrupadas, observou-se que houve seleção entre as populações presentes no lodo granulado e nas demais amostras.

No caso dos ensaios termófilos observou-se a formação de dois subgrupos dentro do grande grupo que compreende todas as amostras relativas à temperatura de 55 °C. Um desses subgrupos compreendeu as amostras dos ensaios T2 e T5 com 95 % de similaridade, enquanto, o outro subgrupo compreendeu as amostras de T7 e T12 com 90 % de similaridade. A similaridade entre esses dois subgrupos foi de 77 %. Apesar de apresentarem distribuição diferente da observada para os ensaios mesófilos, verificou-se que o aumento na concentração de vinhaça também foi fator responsável pela seleção de populações microbianas. A justificativa para essa afirmação pode ser inferida pelo fato de que as amostras dos ensaios em que foram empregadas as menores concentrações de vinhaça (2 g DQO L⁻¹ e 5 g DQO L⁻¹) foram arranjadas em um subgrupo, e aquelas em que foram empregadas as maiores concentrações (7 g DQO L⁻¹ e 12 g DQO L⁻¹) formaram o outro subgrupo. A similaridade do ramo que reuniu as amostras oriundas dos ensaios termófilos e o inóculo foi de 52 %.

5.5.2. PCR em tempo real

As análises de PCR em tempo real foram realizadas utilizando-se *primer* específico para a enzima Fe-hidrogenase, uma das quais está presente nos microrganismos produtores de hidrogênio e é responsável pela catálise da reação de produção do referido gás.

Assim, o objetivo dessa análise foi verificar se havia relação entre a produção de hidrogênio, concentração de vinhaça e número de cópias do gene responsável por codificar a Fe-hidrogenase.

Esperava-se que, nos ensaios a 37 °C, nos quais a produção de hidrogênio aumentou com o aumento da concentração de vinhaça aumentasse também o número de cópias de fragmentos de DNA que codificasse a enzima. Contudo, relação diferente da esperada foi observada. Uma das possibilidades é que para as maiores concentrações de vinhaça, outros microrganismos que não sejam pertencentes ao gênero *Clostridium*, os quais contêm a Fe-hidrogenase, possam ser responsáveis pelo aumento na produção do gás (Figura 5.28), como, por exemplo, as enterobactérias. Todavia, segundo as análises de clonagem e sequenciamento, realizadas na amostra M12, não foram encontrados clones filogeneticamente relacionados a tais microrganismos. Todavia, ressalta-se que a análise filogenética foi realizada a partir de somente 104 clones. Dessa maneira, existe a possibilidade de que tais microrganismos estivessem presentes no consórcio microbiano analisado, porém, não foram identificados devido ao número de fragmentos de DNA analisados. Provavelmente, por meio da técnica de pirosequenciamento, devido a maior abrangência desta, no que diz respeito ao número de fragmentos de DNA analisados, teria sido possível identificar clones semelhantes a tais microrganismos.

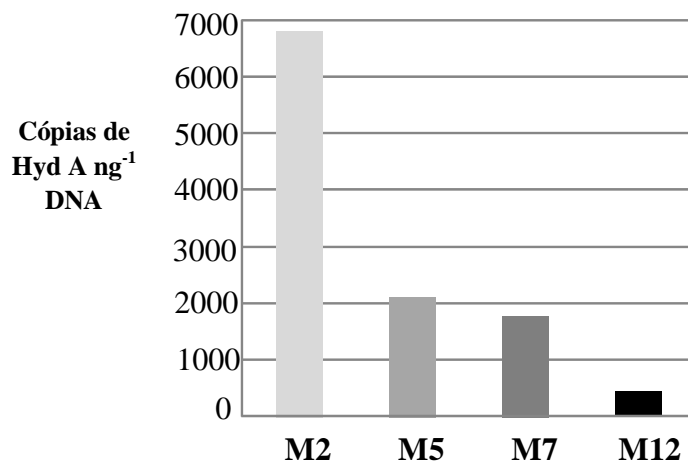


Figura 5.28: Relação entre o número de cópias de Hyd A e a quantidade de DNA nos ensaios mesófilos

Destaca-se que foram realizadas análises de PCR em tempo real em amostras obtidas a partir de ensaios de produção de hidrogênio somente em condição mesófila. Não foi possível

fazer este tipo de análise para as amostras termófilas. Acredita-se que as bactérias crescidas nesta temperatura possuem um dos tipos de enzima hidrogenase diferente daquela que o *primer* utilizado nessa análise poderia amplificar.

5.5.3. Caracterização filogenética dos consórcios microbianos

Para a caracterização filogenética da comunidade microbiana foram utilizadas amostras provenientes dos ensaios mesófilos e termófilos realizados com a maior concentração de vinhaça (12 g DQO L⁻¹).

5.5.3.1. Caracterização filogenética do consórcio microbiano mesófilo

A caracterização filogenética do consórcio mesófilo foi realizada a partir de 104 clones, os quais foram agrupados em 20 UTOs (Unidades Taxonômicas Operacionais) com 95 % de similaridade (Tabela 5.8). Todos os clones foram classificados como pertencentes ao Domínio *Bacteria*, sendo que a maioria deles (96 %) foi classificada no filo Firmicutes (Figura 5.29). O tamanho das sequências utilizadas para estas análises foi em torno de 700 pb.

Microrganismos desse filo (Firmicutes) eram de interesse para o presente estudo, já que a maioria dos trabalhos de produção de hidrogênio é realizada com culturas puras ou mistas desses microrganismos, principalmente *Clostridium*, os quais são frequentemente selecionados a partir de amostras de solo e lodo de reatores, por exemplo, com a aplicação de métodos de tratamento de inóculo que visam buscar microrganismos formadores de endósporos.

Todos os membros do filo Firmicutes possuem estrutura de parede celular rígida, sendo que a maioria dos membros é Gram-positiva, mas estão incluídos também aqueles Gram-negativos, tais como, os membros da família Veillonellaceae. O filo engloba bactérias

fenotipicamente muito diversas. Em relação à morfologia celular, podem ser encontrados cocos, bacilos retos, curvos e helicoidais e também filamentos. As células podem exibir ou não flagelos e endósporos. São microrganismos aeróbios, anaeróbios ou facultativos, e alguns membros são termófilos e/ou halófilos. A maioria exibe metabolismo quimioorganotrófico e poucos são fotoheterotróficos anoxigênicos (Schleifer, 2009).

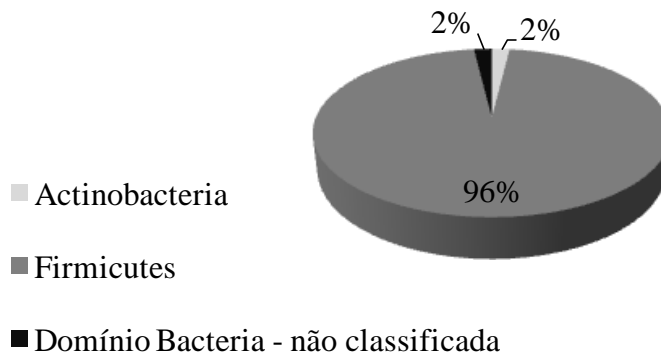


Figura 5.29: Classificação dos clones dentro do Domínio Bacteria

Dentro do Filo Firmicutes, 22 % dos clones foram classificados como pertencentes à família Ruminococcaceae, 75 % foram relacionados à família Clostridiaceae e 3 % foram classificados até ordem, Clostridiales, para um limite de confiança de 90 % (Figura 5.30). Portanto, foi possível verificar que o consórcio microbiano foi selecionado devido às condições impostas de execução dos ensaios, uma vez que, o lodo empregado como inóculo apresentava elevada diversidade de microrganismos, tanto, de bactérias, como de arqueias.

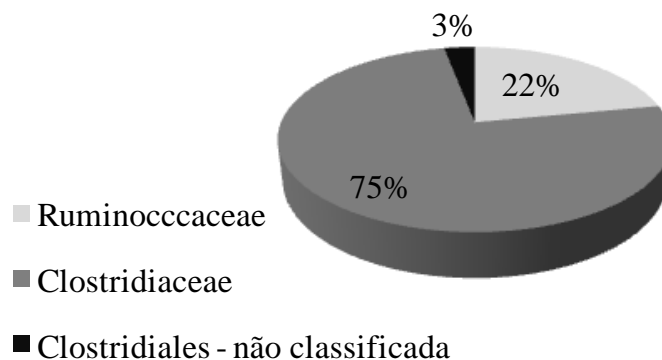


Figura 5.30: Classificação dos clones dentro do Filo Firmicutes

A UTO_1 foi similar à bactéria não cultivada (GU907824, 98 %), cuja sequência foi depositada no banco de dados por Abreu et al. (2011), que estudaram estratégias para suprimir microrganismos consumidores de hidrogênio utilizando pré-tratamentos, como choque térmico, ácido 2-bromoetano sulfônico (ABES) e ABES mais clorofórmio em lodo granulado anaeróbio. Segundo os autores, o lodo submetido ao tratamento com ABES apresentou maior produção de hidrogênio e, por meio de análises moleculares, verificaram que os microrganismos afiliados à Clostridiaceae e Ruminococcaceae estavam presentes nesse lodo.

A UTO_3 foi representada por apenas um clone similar à *Ethanoligenes harbiense* YUAN-3 (AY295777; 98 %). Tal microrganismo foi isolado por Xing et al. (2006) a partir de lodo anaeróbio de reator CSTR alimentado com melaço. Microrganismos dessa cepa são bacilos Gram-positivos, endósporos negativos, mesófilo e móvel, ocorrem sozinhos, em pares, ou em cadeias de até oito células. É capaz de fermentar glicose e produzir ácido acético, etanol, H₂ e CO₂.

A UTO_4 foi aquela que agrupou maior número de clones (36 % do total). A sequência representativa dessa UTO foi 99 % similar a *Clostridium aciditolerans* JW/YJL-B3 (DQ114945) isolada por Lee et al. (2007) a partir de amostra de sedimento de *wetland* que recebia água residuária ácida contendo sulfato. Segundo os autores esses microrganismos são bacilos retos ou curvos, anaeróbios obrigatórios, endósporos positivo e mesófilo. Segundo os autores, as fontes de carbono utilizadas foram extrato de carne, peptona, triptona, arabinose, celobiose, frutose, galactose, glicose, lactose, maltose, manose, rafinose, ribose, sacarose, xilose. Os produtos da fermentação da glicose foram ácido acético, ácido butírico e etanol.

Além da UTO_4 (37 clones), a UTO_8 (1 clone), UTO_14 (11 clones) e UTO_15 (2 clones) também apresentaram suas sequências representativas filogeneticamente similares a *Clostridium aciditolerans* JW/YJL-B3 (DQ114945) (Tabela 5.8). Por isso, a porcentagem total de clones similares a este microrganismo é de 49 %.

O enriquecimento de microrganismos semelhantes ao *Clostridium aciditolerans* JW/YJL-B3 é pertinente, já que o substrato utilizado no presente estudo, a vinhaça, contém quantidades consideráveis de sulfato (Tabela 5.1) e, ainda, o ajuste do pH inicial em 5,5 (pH ácido) são condições experimentais semelhantes às do estudo de (Lee et al. 2007) e favoreceram o crescimento de tais bactérias.

As UTO_5 (5 clones), UTO_7 (1 clone), UTO_16 (2 clones), UTO_17 (1 clone) e UTO_20 (1 clone) apresentaram clones semelhantes a bactérias não cultivadas (Tabela 5.8), cujas sequências foram encontradas por Xing et al. (2008b). Esses autores avaliaram a diversidade de microrganismos relacionados com a produção de hidrogênio a partir de melaço de açúcar de beterraba em reator CSTR mantido a 35 °C e pH entre 4,5 a 5,0. Segundo os autores, outras culturas mesófilas e acidófilas estão envolvidas na produção fermentativa de hidrogênio além de *Clostridium* e *Enterobacter*.

Oito clones foram agrupados na UTO_6. Esses clones foram filogeneticamente afiliados a *Clostridium acetobutylicum* HP7 (FM994940; 99 %), cepa isolada por Liang et al. (2010). Esses autores estudaram a formação de grânulos em reator em batelada sequencial (AnSBR) aplicados a produção de hidrogênio alimentado com glicose a 28 °C e pH 5,5.

Os autores (Op. cit.) submeteram o lodo inicialmente ao choque térmico (80 °C por 20 min) e, posteriormente, ao choque ácido (pH 2,0 por 24 horas) e, observaram a rápida granulação (10 dias), contudo, a produção de hidrogênio estava baixa e o biogás era composto principalmente por CO₂. Assim, com o objetivo de enriquecer os grânulos com microrganismos formadores de endósporos, foi aplicado novo choque térmico, o qual se mostrou bastante eficiente para aumentar a produção de hidrogênio. Além de estudar as estratégias para a granulação do lodo do reator da produção de hidrogênio, os autores também avaliaram a produção por três cepas de microrganismos que isolaram (HP2, HP4 e HP7).

A UTO_12 (3 clones) foi filogeneticamente similar a *Clostridium nitrophenolicum* (AM261414; 97 %), que foi cepa isolada por Suresh et al. (2007) a partir de amostra de solo. A cepa foi caracterizada como Gram-positiva, mesófila, anaeróbia, móvel e formadora de endósporos, capaz de degradar p-nitrofenol na concentração de 0,5 mM. Possivelmente, microrganismos como esse puderam se manter no consórcio microbiano já que eram capazes de degradar o fenol, que é um composto presente na vinhaça (Parnaudeau et al. 2008).

A UTO_18 compreendeu 1 clone semelhante a bactéria não cultivada; clos1 (DQ907198; 97 %) que foi encontrada por Jones et al. (2006) em estudo acerca da comunidade microbiana envolvida na decloração rápida e simultânea de 1,1,2,2-tetracloroetano e intermediários clorados etano e eteno. Segundo os autores, 65 % dos clones foram similares a Clostridiales, 14 % similares a Bacteroides e outros 14 % relacionados com microrganismos do subfilo Epsilon Proteobacteria. Entre as características de *Clostridium* está

a capacidade de esporular em condições ambientais adversas. No estudo de Jones et al. (2006) a elevada porcentagem de clones relacionados com Clostridiales deve-se, possivelmente, à formação de endósporos na presença do tóxico aplicado.

Todas as UTOs apresentadas anteriormente reuniram clones pertencentes ao Filo Firmicutes. Além dessas, outras 4 UTOs foram formadas, as quais agruparam somente 4 % do total de clones, sendo que as UTO_9 e UTO_10 foram classificadas dentro do Filo Actinobacteria, enquanto, as UTO_11 e UTO_19 (1 clone cada) foram classificadas somente dentro do Domínio *Bacteria*.

A UTO_9 (1 clone) foi semelhante a *Pseudoclavibacter caeni* MJ28 (HQ266601; 99 %), cepa isolada por Srinivasan et al. (2011), que foi identificado como bacilo Gram-positivo não formador de endoporos, não móvel e aeróbio estrito isolado a partir de lodo de estação de tratamento de esgoto localizada na Coreia do Sul.

A UTO_10 foi representada por 1 clone com sequência semelhante a bactéria não cultivada G-25 (DQ443951; 100 %), encontrada por Zhao, Ren e Wang (2008). Esses autores estudaram o papel das bactérias acidogênicas fermentativas e redutoras de sulfato na degradação de lactato e redução de sulfato em reator CSTR operado a 35 °C. Além da relação DQO/SO_4^{-2} , os autores avaliaram o efeito da adição de molibdato na redução de sulfato e na composição da comunidade microbiana. A comunidade microbiana predominante após a adição de molibdato era composta por *Clostridium*, *Bacteroides* e *Ruminococcus* e os metabólitos gerados foram etanol e, posteriormente, ácido propiônico. Enquanto que, na ausência de molibdato, a comunidade era composta por *Desulfobulbus*, *Desulfovibrio*, *Pseudomonas* e *Clostridium*.

Na

Figura 5.31 está apresentada a árvore filogenética construída com as sequências representativas das 16 UTOs e sequências do banco de dados, sendo que 6 UTOs (UTO_9, UTO_10, UTO_11, UTO_16, UTO_18 e UTO_19) não foram incorporadas nessa análise, pois não foram classificadas com limite de confiança acima de 90 % para família.

Tabela 5.8: UTOs, número de clones, aproximação filogenética, porcentagem de similaridade, número de acesso e referência

Unidade Taxonômica Operacional	Número de clones	Classificação*	Afiliação filogenética	Similaridade (%)	Número de acesso	Referência
1	19	Ruminococcaceae	Bactéria não cultivada	98	GU907824	Abreu et al. (2011)
2	3	Clostridiaceae	Bactéria não cultivada; CZ8	96	FR716146	Li et al. não publicado
3	1	Ruminococcaceae	<i>Ethanoligenes harbiense</i> YUAN-3	98	AY295777	Xing et al. (2006)
4	37	Clostridiaceae	<i>Clostridium aciditolerans</i> JW/YJL-B3	99	DQ114945	Lee et al. (2007)
5	5	Clostridiaceae	<i>Clostridium</i> sp. HPR59 não cultivado	100	DQ464532	Xing et al. (2008b)
6	8	Clostridiaceae	<i>Clostridium acetobutylicum</i> ; HP7	99	FM994940	Liang et al. (2010)
7	1	Ruminococcaceae	Bactéria não cultivada HPR3	98	DQ464460	Xing et al. (2008b)
8	1	Clostridiaceae	<i>Clostridium aciditolerans</i> JW/YJL-B3	98	DQ114945	Lee et al. (2007)
9	1	Microbacteriaceae	<i>Pseudoclavibacter caeni</i> MJ28	99	HQ266601	Srinivasan et al. (2011)
10	1	Actinomycetaceae	Bactéria não cultivada G-25	100	DQ443951	Zhao et al. (2008)
11	1	Bacteria	-	-	-	-
12	3	Clostridiaceae	<i>Clostridium nitrophenolicum</i>	97	AM261414	Suresh et al. (2007)
13	4	Clostridiaceae	<i>Clostridium scatologenes</i> DSM 757	100	DQ911270	Lemme et al. não publicado
14	11	Clostridiaceae	<i>Clostridium aciditolerans</i> JW/YJL-B3	99	DQ114945	Lee et al. (2007)
15	2	Clostridiaceae	<i>Clostridium aciditolerans</i> JW/YJL-B3	96	DQ114945	Lee et al. (2007)
16	2	Clostridiales	Bactéria não cultivada HPR145	97	DQ482729	Xing et al. (2008b)
17	1	Clostridiales	Bactéria não cultivada; HPR136	98	DQ464593	Xing et al. (2008b)
18	1	Clostridiaceae	Bactéria não cultivada; clos1	97	DQ907198	Jones et al. (2006)
19	1	Bacteria	-	-	-	-
20	1	Ruminococcaceae	Bactéria não cultivada; HPR82	99	DQ464539	Xing et al. (2008b)

*classificação para um limite de confiança de 90 %

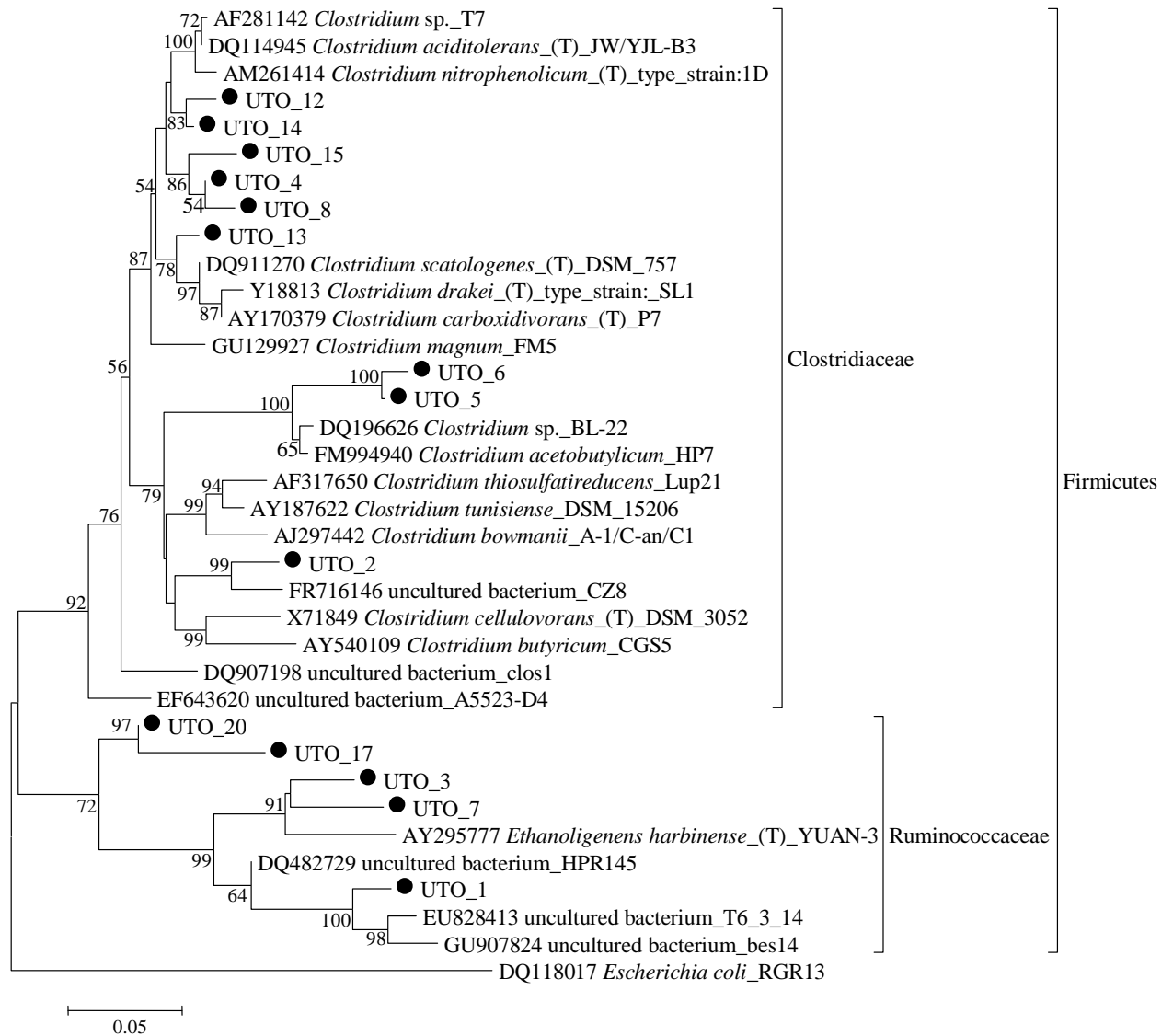


Figura 5.31: Árvore filogenética construída a partir de distâncias evolutivas inferidas usando o método Neighbor-Joining (Saitou and Nei 1987). A porcentagem de réplicas da árvore está apresentada perto dos ramos e foi calculada com base em teste de *bootstrap* com 1000 réplicas (Felsenstein 1985), valores inferiores a 50 % não foram apresentados. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método de Jukes-Cantor (Jukes e Cantor, 1969). A análise foi realizada com base em 36 sequências de nucleotídeos. A análise evolutiva foi realizada utilizando o *software* MEGA5 (Tamura et al. 2011). Out-group: *E.coli*

5.5.3.2. Caracterização filogenética do consórcio microbiano termófilo

A caracterização filogenética do consórcio termófilo foi realizada a partir de 89 clones, os quais foram agrupados em 4 UTOs com 95 % de similaridade. Todos os clones foram classificados como pertencentes ao Domínio *Bacteria* e Filo Firmicutes. A UTO_2 agrupou o maior número de clones (83 clones; 93 % do total), seguida pela OTU 3 (4 clones). As UTOs 1 e 4 foram formadas por somente um clone cada (Tabela 5.9).

As UTOs 1, 2 e 4 foram classificadas como pertencentes ao filo Firmicutes, Classe Clostridia, Ordem Thermoanaerobacterales, Família III Incertae Sedis e Gênero *Thermoanaerobacterium*, com limite de confiança de 90 %. A UTO_3 foi classificada como pertencente ao Filo Firmicutes, Classe Bacilli e Ordem Bacillales (Figura 5.32).

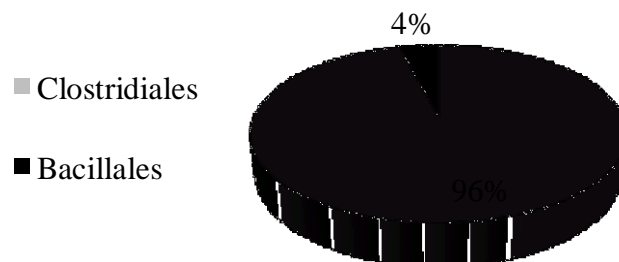


Figura 5.32: Classificação dos clones termófilos dentro do Filo Firmicutes

Tanto, nos ensaios mesófilos como termófilos era esperada seleção microbiana, já que foi aplicado ao inóculo (lodo granulado de UASB) tratamento térmico para selecionar os microrganismos formadores de endósporos. Além disso, seleção microbiana ainda mais severa era o resultado esperado para os ensaios realizados em temperatura termófila, tendo em vista que o lodo utilizado como inóculo era de reator anaeróbio operado a 30 °C e, por isso, acreditava-se que a comunidade microbiana termófila não seria tão representativa como a mesófila. As análises de clonagem e sequenciamento confirmaram que as condições impostas aos microrganismos, principalmente, a temperatura mais elevada, foi fator determinante na

seleção microbiana, já que 96 % dos clones foram similares a *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*.

Segundo a definição apresentada no Manual de Sistemática Bacteriológica de Bergey (Onyenwoke e Wiegel, 2009), bacilos semelhantes a *Thermoanaerobacterium* crescem na ausência de oxigênio em elevada temperatura. Contudo, é ampla a faixa de temperatura na qual já foi observado o crescimento de microrganismos das diferentes espécies (35 a 75 °C). O intervalo de pH para crescimento também é igualmente amplo (3,2 a 8,5). Porém, o menor e maior pH ótimos para o crescimento celular foi de 5,2 e entre 7,8-8,0 para *Thermoanaerobacterium aotearoense* e *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*, respectivamente.

São microrganismos que apresentam metabolismo quimiorganotrófico, fermentam hexoses e produzem ácido acético, ácido lático, etanol, H₂ e CO₂ em diversas estequiometrias. Em alguns casos, ácido butírico e butanol são formados, como por exemplo, no metabolismo de *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*. Também, é relatado que a adição de extrato de levedura pode estimular o crescimento celular da maioria das espécies (Onyenwoke e Wiegel, 2009).

Dentre as espécies do gênero, *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* cresce na presença de carboidratos fermentáveis. Os produtos da fermentação em meio de cultivo PYG incluem ácido acético, ácido butírico, ácido lático e ácido succínico, etanol e H₂. A temperatura e o pH ótimos para crescimento dessa espécie é de 55-62 °C e 7,8, respectivamente.

Microrganismo dessa espécie foi isolado primeiramente por McClung (1935) a partir de amostra de solo. *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* é ubíquo e pode ser isolado a partir de diferentes ambientes, tanto, mesófilos, quanto, termófilos, incluindo também aqueles ligeiramente ácidos (pH > 4) a ligeiramente alcalinos (pH < 9,5).

A UTO_1 foi formada por um clone com sequência similar a *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* KKU-ED1 (JN049814; 99 %) depositada por Fangkum e Reungsang, (2011). Os autores estudaram a produção de hidrogênio utilizando como inóculo esterco de elefante termicamente tratado (100 °C por 2 horas) a partir de mistura de xilose e arabinose e hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar em pH 5,5 a 55 °C. Apesar, da fonte de inóculo que

foi utilizada pelos autores ter sido diferente daquela utilizada no presente trabalho, a temperatura (55 °C) e o substrato (bagaço de cana-de-açúcar hidrolisado) parecem ter favorecido o enriquecimento de microrganismos semelhantes.

A UTO_2, que agrupou 96 % dos clones, também foi similar a *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* (cepa W16) (EU563362, 99 %). Ren et al. (2008) isolaram a cepa W-16 a partir de amostra de lodo de fonte termal (67 °C e pH 7,0) utilizando a técnica para cultivo de microrganismos anaeróbios *roll-tube* descrita por Hungate (1969). Segundo os autores a cepa W-16 apresentou rendimentos de produção de hidrogênio de 2,42 mol H₂ mol⁻¹ glicose e 2,19 mol H₂ mol⁻¹ xilose em experimentos com 10 g L⁻¹ de substrato a 60 °C. A cepa também foi capaz degradar açúcares presentes no hidrolisado de palha de milho (arabinose, glicose e xilose) e produzir hidrogênio com rendimento de 2,3-2,4 mol H₂ mol⁻¹ substrato, além de gerar acetato, butirato e etanol.

Assim, como foi discutido para a UTO_1, parece que *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* é um microrganismo facilmente selecionado a partir das mais diversas fontes de inóculo, como no presente estudo a partir de lodo granular de reator UASB, a partir de esterco de elefante (Fangkum e Reungsang, 2011), a partir de lodo de fonte termal (Ren et al. 2008) e a partir de lodo de reator anaeróbico em batelada aplicado à produção de hidrogênio a 60 °C (O-Thong et al. 2008). Tal fato deve estar relacionado com a capacidade desse microrganismo de formar endósporos e poder estar presente em diversos ambientes ainda que não como célula vegetativa.

A UTO_3 reuniu 4 clones e sua sequência representativa foi similar a bactéria não cultivada HS-3, pertencente a Ordem Bacillales (AB207932; 100 %) (Ueno et al. 2006). Essa sequência foi obtida em estudo que avaliou a produção de hidrogênio, distribuição dos produtos gerados e estrutura da comunidade microbiana em reator contínuo de mistura perfeita (CSTR) mantido a 60 °C e inoculado com lodo de composteira. Os autores relataram que a produção de hidrogênio com a formação de acetato e butirato foi otimizada para tempo de detenção hidráulica (TDH) menor que 1 dia em pH 5,0-6,0, no qual observou-se predominância de *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*. Microrganismos não identificados foram dominantes e não ocorreu a produção de hidrogênio para TDH de 4 dias em pH 6,0.

A UTO_4 (1 clone) foi similar a bactéria não cultivada; EG7b (GU296470, 94 %), cuja sequência foi obtida por Abreu et al. (2010). Esses autores compararam a produção de hidrogênio em reator de leito expandido (EGSB) a 70 °C usando dois inóculos: lodo granuloso metanogênico tratado termicamente (100°C por 15 min), denominado HTG (*heat treated granules*); e o mesmo lodo pré-tratado “engenheirado” por ter sido colocado em contato com cultura microbiana com elevada capacidade de produzir hidrogênio, denominado EHTG (*engineered heat treated granules*). A sequência depositada por Abreu et al. (2010) foi obtida na melhor condição operacional do reator (inóculo EHTG; TDH de 8 horas e alimentação com 5 g DQO L⁻¹). Segundo os autores, nessa condição foi observada a maior produção de hidrogênio (2,6 L H₂ L⁻¹ reator dia⁻¹) e similar àquela apresentada no presente trabalho.

Tabela 5.9: UTOs, número de clones, aproximação filogenética, porcentagem de similaridade, número de acesso e referência

Unidade Taxonômica Operacional	Número de clones	Classificação*	Afiliação filogenética	Similaridade (%)	Número de acesso	Referência
1	1	Incertae Sedis	<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> KKU-ED1	99	JN049814	Fangkum e Reungsang (2011)
2	83	Incertae Sedis	<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> W16	99	EU563362	Ren et al. (2008)
3	4	Bacillales	bactéria não cultivada; HS-3	100	AB207932	Ueno et al. (2006)
4	1	Firmicutes	bactéria não cultivada; EG7b	94	GU296470	Abreu et al. (2010)

*classificação para um limite de confiança de 90 %

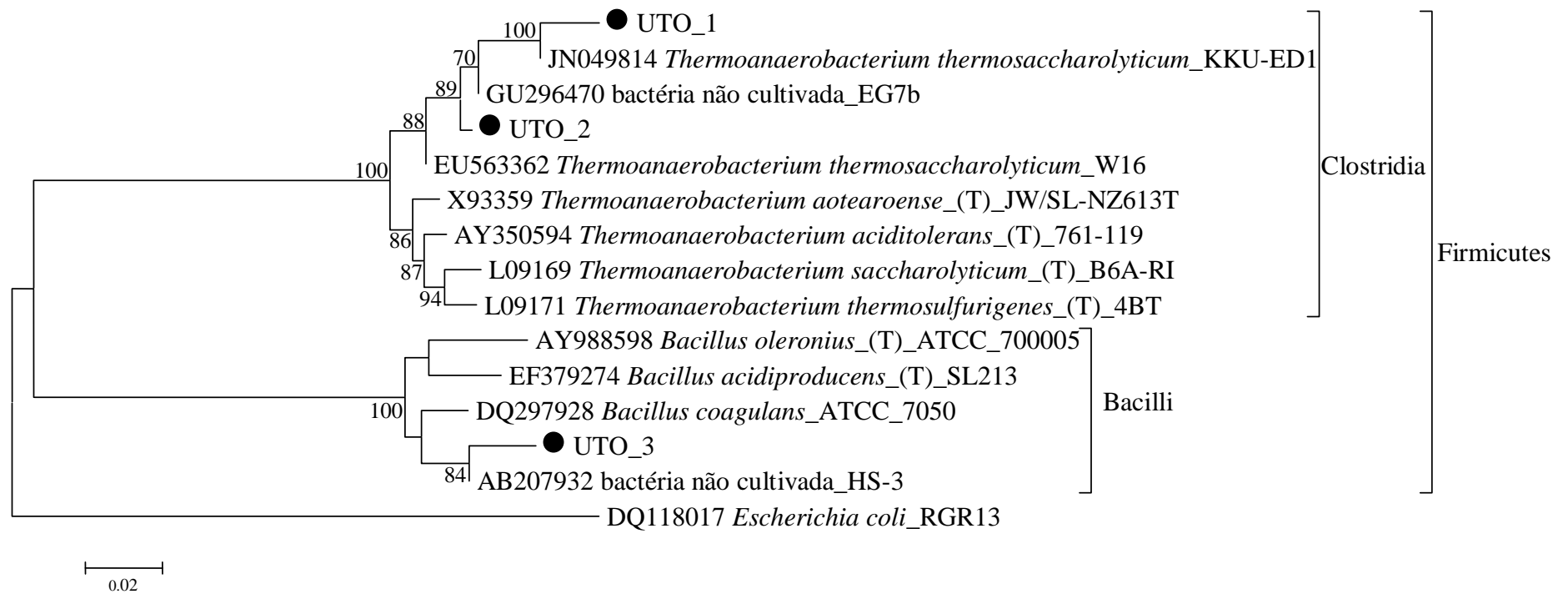


Figura 5.33: Árvore filogenética construída a partir de distâncias evolutivas inferidas usando o método Neighbor-Joining (Saitou and Nei 1987). A porcentagem de réplicas da árvore está apresentada perto dos ramos e foi calculada com base em teste de *bootstrap* com 1000 réplicas (Felsenstein 1985), valores inferiores a 50 % não foram apresentados. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método de Jukes-Cantor (Jukes e Cantor, 1969). A análise foi realizada com base em 15 seqüências de nucleotídeos. A análise evolutiva foi realizada utilizando o software MEGA5 (Tamura et al. 2011). Out-group: *E. coli*.

5.6. Ensaio de produção de hidrogênio com os microrganismos mesófilos isolados

Foram isoladas cepas de microrganismos produtores de hidrogênio crescidos a 37 °C, os quais foram denominados CA, C1 e C5, todos com sequências semelhantes filogeneticamente a *Clostridium* (99 %). Tal resultado era esperado uma vez que o pré-tratamento do inóculo com elevada temperatura favoreceria microrganismos formadores de endósporos como os desse gênero (Tabela 5.10 e Figura 5.41). Valores elevados de R^2 ($> 0,99$) indicaram que o modelo modificado de Gompertz foi adequado para o ajuste dos dados experimentais (Apêndice E).

A cepa CA apresentou 100 % de similaridade a *Clostridium acetobutylicum*; HP7 (FM994940), que foi isolada por Liang et al. (2010), a partir de grânulos de reator anaeróbio operado em bateladas sequenciais (AnSBR – *Anaerobic Sequencing Batch Reactor*) utilizados para a produção de hidrogênio a partir de glicose. Nesse estudo os autores isolaram três cepas: HP2, HP4 e HP7, as quais apresentaram rendimento de 1,22 mol H₂ mol⁻¹ glicose, 1,41 mol H₂ mol⁻¹ glicose e 1,15 mol H₂ mol⁻¹ glicose, enquanto, os grânulos do reator apresentaram rendimento de 1,42 mol H₂ mol⁻¹ glicose.

No ensaio em que a cepa CA foi utilizada como inóculo o rendimento da produção de hidrogênio foi de 1,8 mmol H₂ mmol⁻¹ glicose (10 mmol H₂ g⁻¹ glicose ou 224 NmL H₂ g⁻¹ glicose) e 80 % de consumo de glicose (Figura 5.34). Dentre os metabólitos produzidos, foram observados os ácidos butírico (2 g L⁻¹) e acético (0,8 g L⁻¹) (Figura 5.35).

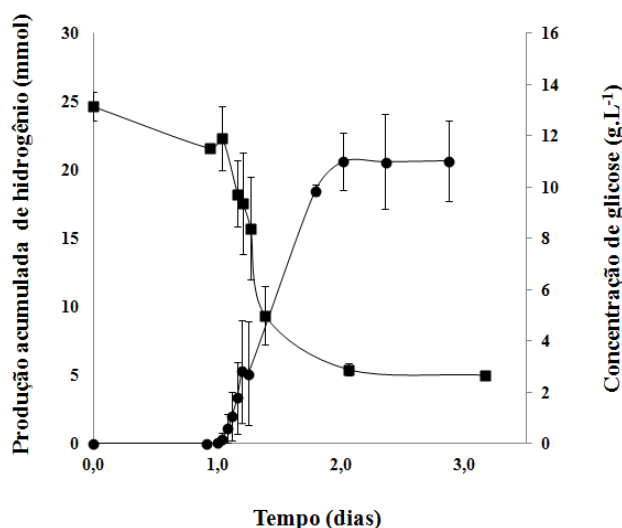


Figura 5.34: Produção acumulada de hidrogênio (●) e consumo de substrato (■) do ensaio com a cepa CA

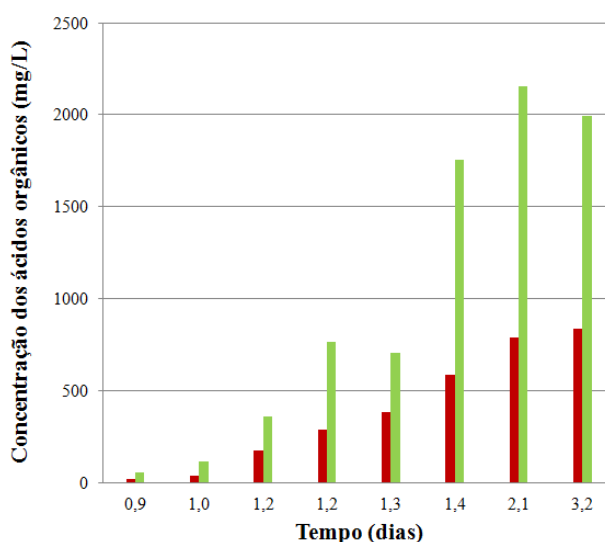


Figura 5.35: Ácidos orgânicos do ensaio com a cepa CA: (■) Ácido acético, (■) Ácido butírico

Conforme pode ser observado na Figura 5.36, a pressão parcial do H_2 tem efeito direto na produção biológica do referido gás. Isso porque a oxidação do $NADH$ a NAD^+ que possibilita a geração H_2 é termodinamicamente favorável somente quando a pressão parcial deste gás é inferior a 60 Pa. Assim, no caso de a pressão parcial de H_2 ser maior do que 60 Pa, o $NADH$ não é oxidado para a formação de H_2 , porém, ocorrerá a formação de ácido butírico (Angenent et al. 2004).

No ensaio com a cepa CA observou-se que a geração deste ácido sobressaiu à geração de ácido acético. Possivelmente isso está relacionado com a pressão parcial de H_2 neste ensaio.

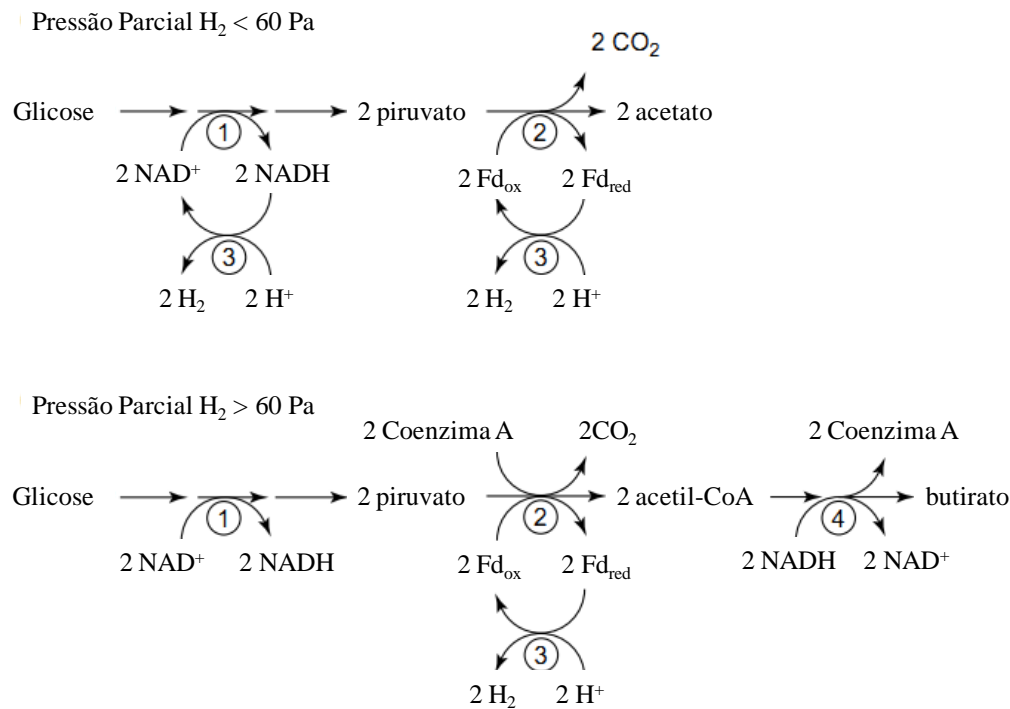
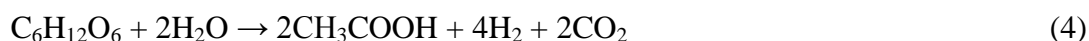


Figura 5.36: Efeito da pressão parcial de H_2 na produção biológica do referido gás. Os números indicam: (1) metabolismo da glicose pela via da glicólise; (2) a descarboxilação oxidativa do piruvato pela ação da piruvato-ferredoxina oxidoreductase; (3) a formação de H_2 pela ação da hidrogenase e (4) formação de ácido butírico. Fonte: Angenent et al. (2004)

A cepa C1 teve sua sequência similar a *Clostridium carboxidivorans* (T); P7 (AY170379) com 100 % de similaridade (Figura 5.41). *Clostridium carboxidivorans* foi descrita por Liou et al. (2005). Trata-se de um microrganismo anaeróbio Gram-positivo, móvel, formador de endósporo, homoacetogênico. Os principais produtos de seu metabolismo são o ácido acético e o ácido butírico, além de etanol e butanol. Pode crescer utilizando variedade de substratos como glicose, xilose, celulose, amido, glicerol, etanol, CO e H_2/CO_2 .

Nos ensaios com a cepa C1 o principal produto da fermentação foi ácido acético ($1,7 \text{ g L}^{-1}$ ou 28 mmol) e, em menor quantidade, ácido butírico ($0,35 \text{ g L}^{-1}$) (Figura 5.37). Foi observado consumo de 40 % de glicose e rendimento de produção de hidrogênio bastante reduzido ($0,2 \text{ mmol H}_2 \text{ mmol}^{-1}$ glicose ou $24,9 \text{ NmL H}_2 \text{ g}^{-1}$ glicose) (Figura 5.38). Devido à elevada produção de ácido acético esperava-se que o rendimento fosse igualmente elevado. Todavia, este parâmetro foi bastante reduzido. Uma possível explicação para esta situação seria a produção de ácido acético por meio do consumo de H_2/CO_2 via homoacetogênese, tendo em vista que se trata de espécie similar a *Clostridium carboxidivorans*, a qual é capaz de realizar tal rota metabólica.

Considerando a via de produção de hidrogênio com a formação somente de ácido acético (Equação 4) teríamos nesse ensaio a produção máxima de 12 mmol ou 720 mg desse ácido, já que o consumo de substrato foi de $1,1 \text{ g}$ de glicose (6 mmol de glicose). Contudo, além de ácido acético, observou-se também a produção de ácido butírico (70 mg ou $0,8 \text{ mmol}$) (Equação 5), fato que diminui ainda mais a quantidade de ácido acético que poderia ser gerada. Dessa maneira, houve a produção de ácido acético pela via homoacetogênica (Equação 6) justificando a produção de elevada quantidade desse ácido e baixo rendimento de produção de H_2 .



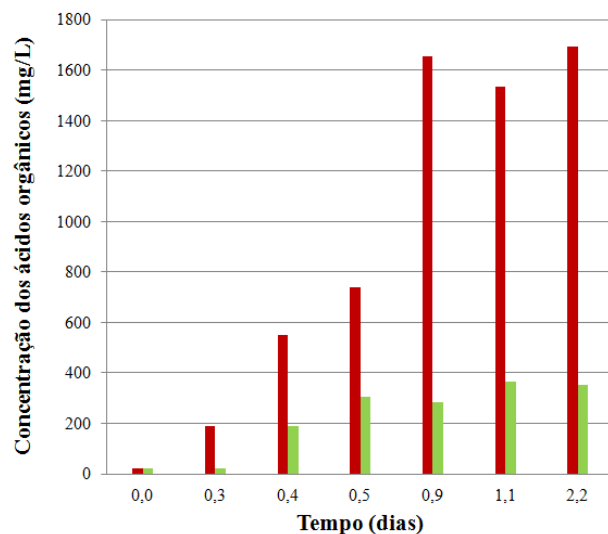


Figura 5.37: Ácidos orgânicos do ensaio com a cepa C1 (■) Ácido acético, (■) Ácido butírico

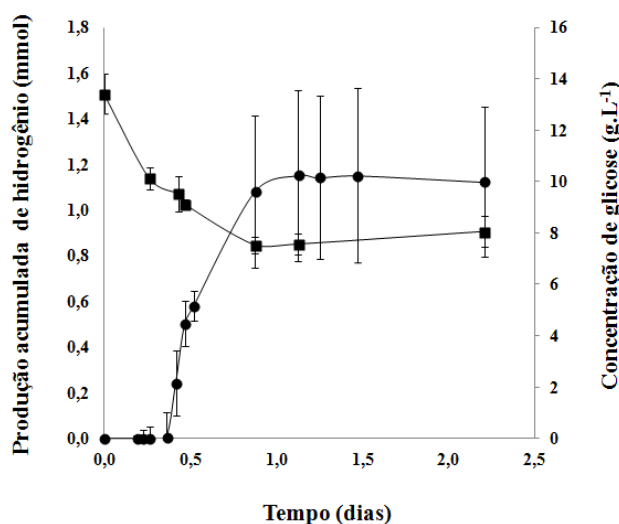


Figura 5.38: Produção acumulada de hidrogênio (●) e consumo de substrato (■) do ensaio com a cepa C1

A cepa C5 foi similar à bactéria não cultivada; CZ27 (FR716159; 99 %), cuja sequência foi depositada no banco de dados por Li et al. (não publicado). A produção máxima de hidrogênio, o consumo de substrato e o rendimento para essa cepa foram de 5,3 mmol H₂, 40 % e 1,3 mmol H₂ mmol⁻¹ glicose (7,2 mmol H₂ g⁻¹ glicose ou 161,3 NmL H₂ g⁻¹ glicose), respectivamente (Figura 5.39). Os produtos gerados, além do H₂ e CO₂ foram ácido acético (0,3 g L⁻¹) e ácido butírico (0,47 g L⁻¹) (Figura 5.40).

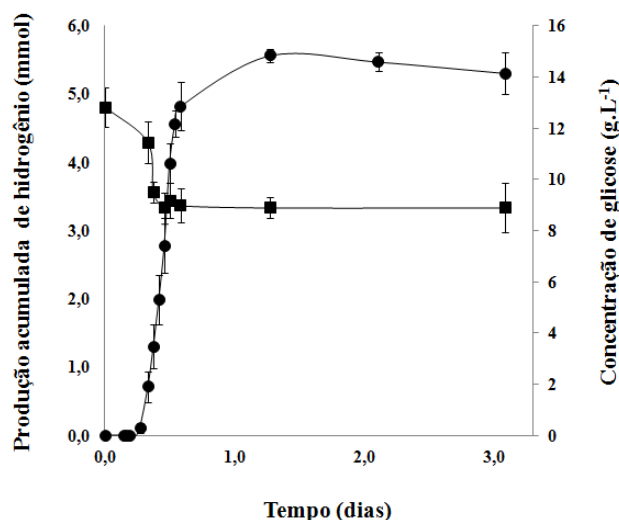


Figura 5.39: Produção acumulada de hidrogênio (●) e consumo de substrato (■) do ensaio com a cepa C5

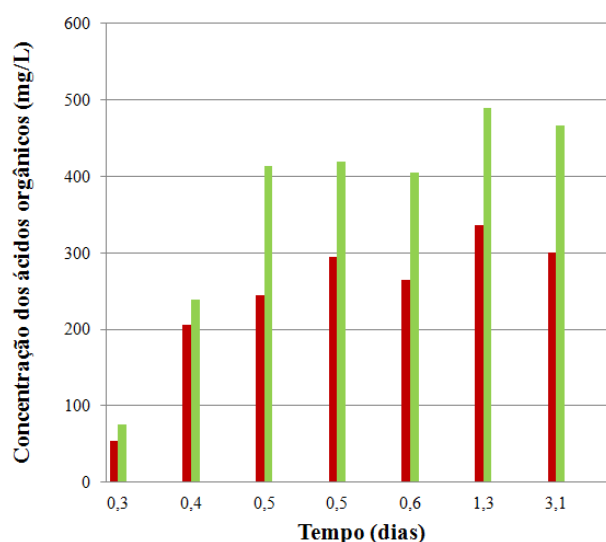


Figura 5.40: Ácidos orgânicos do ensaio com a cepa C5: (■)Ácido acético, (■) Ácido butírico

Diante dos resultados de rendimentos apresentados pelas três cepas (1,8 mmol H₂ mmol⁻¹ glicose, CA; 0,2 mmol H₂ mmol⁻¹ glicose, C1 e 1,3 mmol H₂ mmol⁻¹ glicose, C5) foi possível verificar que microrganismos do mesmo gênero, *Clostridium*, os quais são indicados na literatura como produtores de hidrogênio, e empregados em diversos reatores com diferentes substratos, podem não apresentar rendimentos desejáveis, uma vez que possuem versatilidade metabólica, podendo consumir o hidrogênio produzido, por meio da homoacetogênese resultando na redução no rendimento do processo, quando presentes no consórcio microbiano.

O isolamento de microrganismos produtores de hidrogênio e o emprego daqueles que apresentem bons rendimentos pode ser de grande valia para a bioaumentação, já que por meio desta técnica obtêm-se a redução do período de partida do reator (Wilderer, Rubio and Davids 1991) e, por conseguinte, desempenho favorável do processo de produção (Stephenson e Stephenson, 1992). Desse modo, dentre as cepas isoladas, a CA seria a mais indicada para essa finalidade.

A técnica da bioaumentação foi estudada para a remoção de compostos recalcitrantes (Quan et al. 2004; Wang et al. 2002; Limbergen et al. 1998). Recentemente, Mohan et al. (2007) lançaram mão dessa ferramenta com o objetivo melhorar o processo de produção de hidrogênio.

Em relação as cepas isoladas de microrganismos termófilos (C7, C6, J3, J7), verificou-se similaridade à *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* W16 (EU563362; 100 %). Tais bactérias são frequentemente reportadas na literatura como produtoras de hidrogênio em condição termófila. Todavia, como explicado anteriormente (item 4.10) não foram realizados ensaios de produção de hidrogênio com essas cepas.

Tabela 5.10: Denominação da cepa, classificação, aproximação filogenética, porcentagem de similaridade, número de acesso e referência

Cepa	Classificação *	Afiliação filogenética	Similaridade (%)	Número de acesso	Referência
C1	Clostridiaceae	<i>Clostridium carboxidivorans</i> (T); P7	100	AY170379	Liou et al. (2005)
C5	Clostridiaceae	bactéria não cultivada; CZ27	99	FR716159	Li et al., não publicado
CA	Clostridiaceae	<i>Clostridium acetobutylicum</i> ; HP7	100	FM994940	Liang et al. (2010)
C6	Incertae Sedis	<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> W16	100	EU563362	Ren et al. (2008)
C7	Incertae Sedis	<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> W16	100	EU563362	Ren et al. (2008)
J3	Incertae Sedis	<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> W16	100	EU563362	Ren et al. (2008)
J7	Incertae Sedis	<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> W16	100	EU563362	Ren et al. (2008)

*classificação para um limite de confiança de 90 %

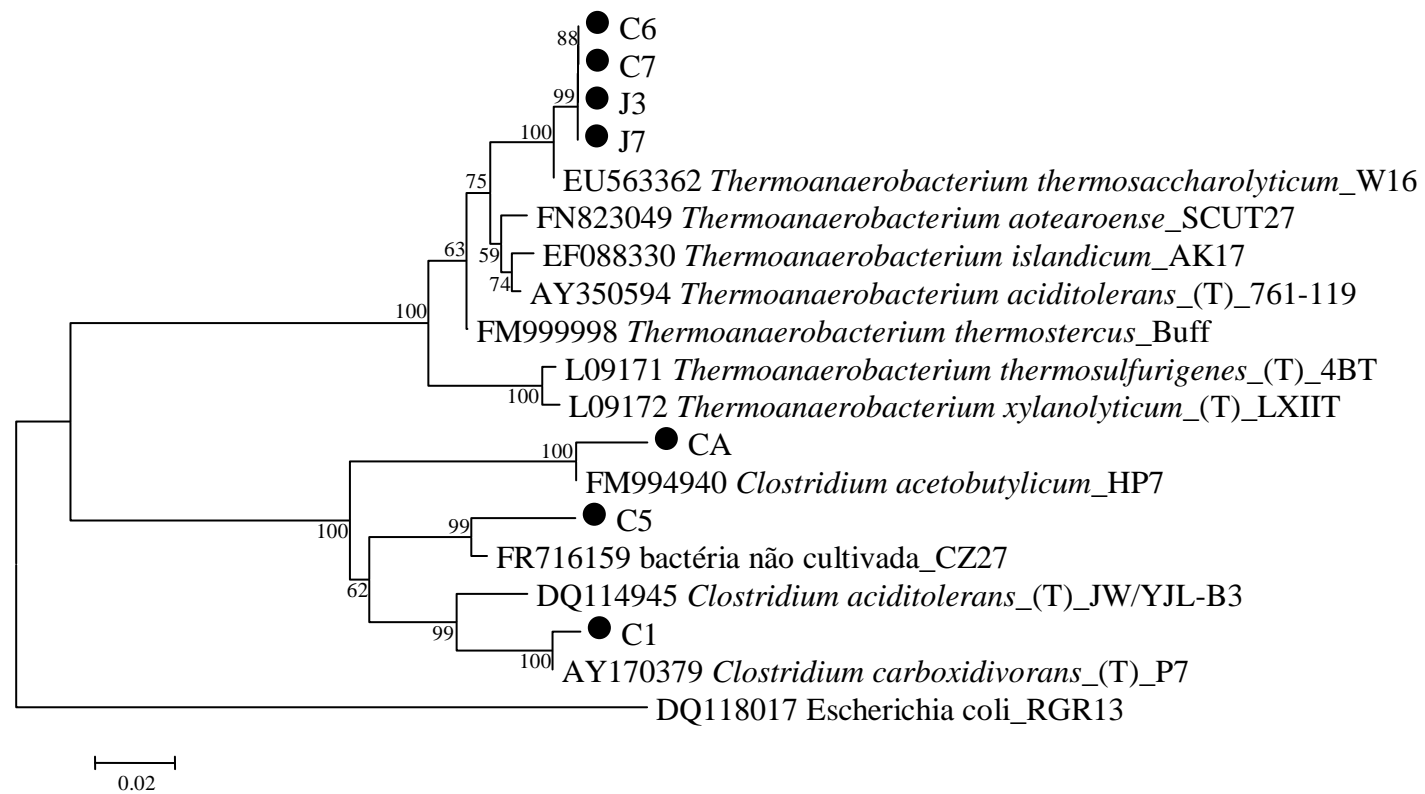


Figura 5.41: Árvore filogenética construída a partir de distâncias evolutivas inferidas usando o método Neighbor-Joining (Saitou and Nei 1987). A porcentagem de réplicas da árvore está apresentada perto dos ramos e foi calculada com base em teste de *bootstrap* com 1000 réplicas (Felsenstein 1985), valores inferiores a 50 % não foram apresentados. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método de Jukes-Cantor (Jukes e Cantor, 1969). A análise foi realizada com base em 19 seqüências de nucleotídeos. A análise evolutiva foi realizada utilizando o *software* MEGA5 (Tamura et al. 2011). Out-group: *E. coli*.

5. CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos foi possível concluir que a temperatura e a concentração de substrato influenciam a produção fermentativa de hidrogênio por consórcio microbiano alimentado com vinhaça de cana-de-açúcar.

O lodo granulado de reator UASB foi fonte de inóculo adequada para a obtenção do consórcio mesófilo. Porém, para o consórcio termófilo, o substrato utilizado (vinhaça) foi a fonte de inóculo para obtenção de bactérias produtoras de hidrogênio. Em ambos os consórcios, a eliminação dos microrganismos metanogênicos foi obtida por meio da aplicação do tratamento térmico ao lodo granulado.

A vinhaça pôde ser utilizada com única fonte de carbono para a produção de H₂ em ensaios em batelada nas duas temperaturas testadas (37 e 55 °C). Porém, os melhores resultados de potencial de produção de hidrogênio, rendimento de produção de H₂ e taxa máxima de produção de H₂ foram obtidos nos ensaios realizados em temperatura mesófila (37 °C). A produção de H₂ aumentou para concentrações crescentes de vinhaça nos ensaios a 37 °C. Todavia, esta tendência não se repetiu para os ensaios realizados a 55 °C.

Maior diversidade microbiana foi observada para o consórcio mesófilo (Filo Firmicutes, Classe Clostridia, Famílias Clostridiaceae e Ruminococcaceae) do que para o termófilo (Filo Firmicutes, Classe Clostridia, Gênero *Thermoanaerobacterium*), sugerindo que a temperatura foi fator importante na seleção dos microrganismos a partir de biomassa proveniente de reator UASB mesófilo.

Diferentes microrganismos (ainda que similares a *Clostridium*) apresentaram rendimentos de produção de H₂ e distribuição dos metabólitos gerados diferentes entre si, possivelmente devido à versatilidade metabólica desse gênero. Nesse sentido, a aplicação de pré-tratamentos que visem a selecionar espécies formadoras de endósporos em detrimento de outras pode não ser o procedimento mais adequado para enriquecer e selecionar consórcios microbianos produtores de H₂ com altos rendimentos produtivos.

6. SUGESTÕES

A partir dos resultados obtidos no presente estudo sugere-se:

- Uso da vinhaça de cana-de-açúcar como fonte de inóculo para os ensaios de produção de hidrogênio;
- Uso de vinhaça de cana-de-açúcar *in natura* (sem diluição) visando avaliar a produção e o rendimento de hidrogênio a 37 °C em ensaios em batelada com controle de pH;
- Avaliação da produção de H₂ a partir de vinhaça de cana-de-açúcar em reatores de fluxo contínuo em escala de bancada;
- Uso de lodo bioaumentado com cepa CA, que apresentou bom rendimento (~ 45 % do rendimento teórico), para a produção de H₂ a partir de vinhaça de cana-de-açúcar;
- Avaliação da produção de H₂ a partir de vinhaça de cana-de-açúcar utilizando como fonte de inóculo lodo de reator operado em condição termófila.

REFERÊNCIAS

Abreu, A. A., J. I. Alves, M. A. Pereira, D. Karakashev, M. M. Alves & I. Angelidaki (2010) Engineered heat treated methanogenic granules: A promising biotechnological approach for extreme thermophilic biohydrogen production. *Bioresource Technology*, 101, 9577-9586.

Abreu, A. A., J. I. Alves, M. A. Pereira, D. Z. Sousa & M. M. Alves (2011) Strategies to Suppress Hydrogen-Consuming Microorganisms Affect Macro and Micro Scale Structure and Microbiology of Granular Sludge. *Biotechnology and Bioengineering*, 108, 1766-1775.

Akutsu, Y., Y. Y. Li, H. Harada & H. Q. Yu (2009) Effects of temperature and substrate concentration on biological hydrogen production from starch. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34, 2558-2566.

Angenent, LT.; Karim, K.; Al-Dahhan, MH.; Wrenn, BA.; Domínguez-Espinosa, R. (2004) Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater. *TRENDS in Biotechnology*, 22, 477-485.

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.

Armaroli, N. & Balzani, V. (2011). Energy for a sustainable world: From the oil age to a sun-powered future. Weinheim: Wiley-VCH

Baghchehsaraee, B., G. Nakhla, D. Karamanev & A. Margaritis (2010) Fermentative hydrogen production by diverse microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35, 5021-5027.

Baghchehsaraee, B., G. Nakhla, D. Karamanev, A. Margaritis & G. Reid (2008) The effect of heat pretreatment temperature on fermentative hydrogen production using mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 4064-4073.

Barbosa, M. J., J. M. S. Rocha, J. Tramper & R. H. Wijffels (2001) Acetate as a carbon source for hydrogen production by photosynthetic bacteria. *Journal of Biotechnology*, 85, 25-33.

Barros, A. R., M. A. T. Adorno, I. K. Sakamoto, S. I. Maintinguer, M. B. A. Varesche & E. L. Silva (2011) Performance evaluation and phylogenetic characterization of anaerobic fluidized

bed reactors using ground tire and pet as support materials for biohydrogen production. *Bioresource Technology*, 102, 3840-3847.

Bartacek, J., J. Zabranska & P. N. L. Lens (2007) Developments and constraints in fermentative hydrogen production. *Biofuels Bioproducts & Biorefining-Biofpr*, 1, 201-214.

Beckers, L., S. Hilgsmann, C. Hamilton, J. Masset & P. Thonart (2010) Fermentative hydrogen production by *Clostridium butyricum* CWBI1009 and *Citrobacter freundii* CWBI952 in pure and mixed cultures. *Biotechnologie Agronomie Societe Et Environnement*, 14, 541-548.

Briones, A. & L. Raskin (2003) Diversity and dynamics of microbial communities in engineered environments and their implications for process stability. *Current Opinion in Biotechnology*, 14, 270-276.

Buitrón, G. & C. Carvajal (2010) Biohydrogen production from Tequila vinasses in an anaerobic sequencing batch reactor: Effect of initial substrate concentration, temperature and hydraulic retention time. *Bioresource Technology*, 101, 9071-9077.

Cakir, A., S. Ozmihci & F. Kargi (2010) Comparison of bio-hydrogen production from hydrolyzed wheat starch by mesophilic and thermophilic dark fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35, 13214-13218.

Chang, J.-J., J.-J. Lin, C.-Y. Ho, W.-C. Chin & C.-C. Huang (2010) Establishment of rumen-mimic bacterial consortia: A functional union for bio-hydrogen production from cellulosic bioresource. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35, 13399-13406.

Chen, W. H., S. Y. Chen, S. K. Khanal & S. W. Sung (2006) Kinetic study of biological hydrogen production by anaerobic fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31, 2170-2178.

Chin, H. L., Z. S. Chen & C. P. Chou (2003) Fedbatch operation using *Clostridium acetobutylicum* suspension culture as biocatalyst for enhancing hydrogen production. *Biotechnology Progress*, 19, 383-388.

Chong, M.-L., R. A. Rahim, Y. Shirai & M. A. Hassan (2009) Biohydrogen production by *Clostridium butyricum* EB6 from palm oil mill effluent. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34, 764-771.

Cubillos, G., Arrué, R., Jeison, D., Chamy, R., Tapia, E., Rodríguez, J., Ruiz-Filippi, G. (2010) Simultaneous effects of pH and substrate concentration on hydrogen production by acidogenic fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology*; 13: 1-7. ISSN: 0717-3458.

Das, D. & T. N. Veziroglu (2001) Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. *International Journal of Hydrogen Energy*, 26, 13-28.

Del Nery, V. (1987) Utilização de lodo anaeróbio imobilizado em gel no estudo de partida de reatores de fluxo ascendente com manta de lodo. Ph.D. diss. University of São Paulo.

de Vrije, T., A. E. Mars, M. A. W. Budde, M. H. Lai, C. Dijkema, P. de Waard & P. A. M. Claassen (2007) Glycolytic pathway and hydrogen yield studies of the extreme thermophile *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74, 1358-1367.

Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers & F. Smith (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28, 350-356.

Edwards, U.; Rogall, T.; Blöcker, H.; Emde, M.; Böttger, E. C (1989) Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research*, 17(19), 7843–7853.

Espinoza-Escalante, F. M., C. Pelayo-Ortiz, J. Navarro-Corona, Y. Gonzalez-Garcia, A. Borjes & H. Gutierrez-Pulido (2009) Anaerobic digestion of the vinasses from the fermentation of Agave tequilana Weber to tequila: The effect of pH, temperature and hydraulic retention time on the production of hydrogen and methane. *Biomass & Bioenergy*, 33, 14-20.

Fan, Y. T., C. L. Li, J. J. Lay, H. W. Hou & G. S. Zhang (2004) Optimization of initial substrate and pH levels for germination of sporing hydrogen-producing anaerobes in cow dung compost. *Bioresource Technology*, 91, 189-193.

Fang, H. H. P., H. Liu & T. Zhang (2002) Characterization of a hydrogen-producing granular sludge. *Biotechnology and Bioengineering*, 78, 44-52.

Fang, H. H. P., C. L. Li & T. Zhang (2006) Acidophilic biohydrogen production from rice slurry. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31, 683-692.

Fang, H. H. P., T. Zhang & C. Li (2006) Characterization of Fe-hydrogenase genes diversity and hydrogen-producing population in an acidophilic sludge. *Journal of Biotechnology*, 126, 357-364.

Fangkum, A. & A. Reungsang (2011) Biohydrogen production from mixed xylose/arabinose at thermophilic temperature by anaerobic mixed cultures in elephant dung. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36, 13928-13938.

Felsenstein, J. (1985) Confidence-Limits On Phylogenies - An Approach Using The Bootstrap. *Evolution*, 39, 783-791.

Ferchichi, M., E. Crabbe, G. H. Gil, W. Hintz & A. Almadidy (2005) Influence of initial pH on hydrogen production from cheese whey. *Journal of Biotechnology*, 120, 402-409.

Fernandes, B. S., G. Peixoto, F. R. Albrecht, N. K. Saavedra del Aguila & M. Zaiat (2010) Potential to produce biohydrogen from various wastewaters. *Energy for Sustainable Development*, 14, 143-148.

Fontes Lima, D. M. & M. Zaiat The influence of the degree of back-mixing on hydrogen production in an anaerobic fixed-bed reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*.

Geng, A., Y. He, C. Qian, X. Yan & Z. Zhou (2010) Effect of key factors on hydrogen production from cellulose in a co-culture of *Clostridium thermocellum* and *Clostridium thermopalmarium*. *Bioresource Technology*, 101, 4029-4033.

Griffiths, R. I., A. S. Whiteley, A. G. O'Donnell & M. J. Bailey (2000) Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA- and rRNA-based microbial community composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 5488-5491.

Guo, X. M., E. Trably, E. Latrille, H. Carrere & J.-P. Steyer (2010) Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35, 10660-10673.

Hallenbeck, P. C. (2005) Fundamentals of the fermentative production of hydrogen. *Water Science and Technology*, 52, 21-29.

Hallenbeck, P. C. & D. Ghosh (2009) Advances in fermentative biohydrogen production: the way forward? *Trends in Biotechnology*, 27, 287-297.

Hallenbeck, P. C. & D. Ghosh (2012) Improvements in fermentative biological hydrogen production through metabolic engineering. *Journal of Environmental Management*, 95, S360-S364.

Hsiao, C.-L., J.-J. Chang, J.-H. Wu, W.-C. Chin, F.-S. Wen, C.-C. Huang, C.-C. Chen & C.-Y. Lin (2009) *Clostridium* strain co-cultures for biohydrogen production enhancement from condensed molasses fermentation solubles. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34, 7173-7181.

Hung, C.-H., Y.-T. Chang & Y.-J. Chang (2011) Roles of microorganisms other than *Clostridium* and *Enterobacter* in anaerobic fermentative biohydrogen production systems - A review. *Bioresource Technology*, 102, 8437-8444.

Hungate, R. E. & J. Macy (1973) The Roll-Tube Method for Cultivation of Strict Anaerobes. *Bulletins from the Ecological Research Committee*, 123-126.

Jones, E. J. P., M. A. Voytek, M. M. Lorah & J. D. Kirshtein (2006) Characterization of a Microbial Consortium Capable of Rapid and Simultaneous Dechlorination of 1,1,2,2-Tetrachloroethane and Chlorinated Ethane and Ethene Intermediates. *Bioremediation Journal*, 10, 153-168.

Jukes T.H. and Cantor C.R. (1969). Evolution of protein molecules. In Munro HN, editor, *Mammalian Protein Metabolism*, pp. 21-132, Academic Press, New York.

Kaksonen, A. H., J. J. Plumb, W. J. Robertson, M. Riekkola-Vanhanen, P. D. Franzmann & J. A. Puhakka (2006) The performance, kinetics and microbiology of sulfidogenic fluidized-bed treatment of acidic metal and sulfate-containing wastewater. *Hydrometallurgy*, 83, 204-213.

Kapdan, I. K. & F. Kargi (2006) Bio-hydrogen production from waste materials. *Enzyme and Microbial Technology*, 38, 569-582.

Kargi, F., N. S. Eren & S. Ozmihci (2012) Hydrogen gas production from cheese whey powder (CWP) solution by thermophilic dark fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37, 2260-2266.

Kawagoshi, Y., N. Hino, A. Fujimoto, M. Nakao, Y. Fujita, S. Sugimura & K. Furukawa (2005) Effect of inoculum conditioning on hydrogen fermentation and pH effect on bacterial community relevant to hydrogen production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100, 524-530.

Kim, D. H., S. K. Han, S. H. Kim & H. S. Shin (2006) Effect of gas sparging on continuous fermentative hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31, 2158-2169.

Kotay, S. M. & D. Das (2007) Microbial hydrogen production with *Bacillus coagulans* IIT-BT S1 isolated from anaerobic sewage sludge. *Bioresource Technology*, 98, 1183-1190.

--- (2008) Biohydrogen as a renewable energy resource - Prospects and potentials. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 258-263.

Kraemer, J. T. & D. M. Bagley (2007) Improving the yield from fermentative hydrogen production. *Biotechnology Letters*, 29, 685-695.

Kumar, N. & D. Das (2000) Enhancement of hydrogen production by *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08. *Process Biochemistry*, 35, 589-593.

Lay, J. J. (2001) Biohydrogen generation by mesophilic anaerobic fermentation of microcrystalline cellulose. *Biotechnology and Bioengineering*, 74, 280-287.

Lay, J. J., K. S. Fan, J. Chang & C. H. Ku (2003) Influence of chemical nature of organic wastes on their conversion to hydrogen by heat-shock digested sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*, 28, 1361-1367.

Lee, K.-S., Y.-F. Hsu, Y.-C. Lo, P.-J. Lin, C.-Y. Lin & J.-S. Chang (2008) Exploring optimal environmental factors for fermentative hydrogen production from starch using mixed anaerobic microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 1565-1572.

Lee, Y.-J., C. S. Romanek & J. Wiegel (2007) *Clostridium aciditolerans* sp. nov., an acid-tolerant spore-forming anaerobic bacterium from constructed wetland sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57, 311-315.

Levin, D. B., R. Islam, N. Cicek & R. Sparling (2006) Hydrogen production by *Clostridium thermocellum* 27405 from cellulosic biomass substrates. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31, 1496-1503.

Li, Z., H. Wang, Z. Tang, X. Wang & J. Bai (2008) Effects of pH value and substrate concentration on hydrogen production from the anaerobic fermentation of glucose. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 7413-7418.

Li H.J., Peng J.J., Zhu Y.G.; Diversity and characterization of H₂-dependent Fe(III)-reducing microorganisms in rice paddy soils. Artigo não publicado.

Liang, D.-W., S. S. Shayegan, W. J. Ng & J. He (2010) Development and characteristics of rapidly formed hydrogen-producing granules in an acidic anaerobic sequencing batch reactor (AnSBR). *Biochemical Engineering Journal*, 49, 119-125.

Lin, C.-Y., C.-C. Wu, J.-H. Wu & F.-Y. Chang (2008) Effect of cultivation temperature on fermentative hydrogen production from xylose by a mixed culture. *Biomass & Bioenergy*, 32, 1109-1115.

Lin, C. Y. & R. C. Chang (2004) Fermentative hydrogen production at ambient temperature. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29, 715-720.

Lin, P. Y., L. M. Whang, Y. R. Wu, W. J. Ren, C. J. Hsiao, S. L. Li & J. S. Chang (2007) Biological hydrogen production of the genus *Clostridium*: Metabolic study and mathematical model simulation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 32, 1728-1735.

Liou, J. S. C., D. L. Balkwill, G. R. Drake & R. S. Tanner (2005) *Clostridium carboxidivorans* sp. nov., a solvent-producing clostridium isolated from an agricultural settling lagoon, and reclassification of the acetogen *Clostridium scatologenes* strain SL1 as *Clostridium drakei* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, 2085-2091.

Liu, D., B. Min & I. Angelidaki (2008) Biohydrogen production from household solid waste (HSW) at extreme-thermophilic temperature (70 degrees C) - Influence of pH and acetate concentration. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 6985-6992.

Liu, G. Z. & J. Q. Shen (2004) Effects of culture and medium conditions on hydrogen production from starch using anaerobic bacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 98, 251-256.

Liu, Q., X. Zhang, L. Yu, A. Zhao, J. Tai, J. Liu, G. Qian & Z. P. Xu (2011) Fermentative hydrogen production from fresh leachate in batch and continuous bioreactors. *Bioresource Technology*, 102, 5411-5417.

Lo, Y. C., W. M. Chen, C. H. Hung, S. D. Chen & J. S. Chang (2008) Dark H₂ fermentation from sucrose and xylose using H₂-producing indigenous bacteria: Feasibility and kinetic studies. *Water Research*, 42, 827-842.

Maintinguer, S. I., B. S. Fernandes, I. C. S. Duarte, N. K. Saavedra, M. A. T. Adorno & M. B. Varesche (2008) Fermentative hydrogen production by microbial consortium. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 4309-4317.

Maintinguer, S. I., B. S. Fernandes, I. C. S. Duarte, N. K. Saavedra, M. A. T. Adorno & M. B. A. Varesche (2011) Fermentative hydrogen production with xylose by *Clostridium* and *Klebsiella* species in anaerobic batch reactors. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36, 13508-13517.

Mangayil, R., V. Santala & M. Karp (2011) Fermentative hydrogen production from different sugars by *Citrobacter* sp. CMC-1 in batch culture. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36, 15187-15194.

Massanet-Nicolau, J., R. Dinsdale & A. Guwy (2008) Hydrogen production from sewage sludge using mixed microflora inoculum: Effect of pH and enzymatic pretreatment. *Bioresource Technology*, 99, 6325-6331.

Mohan, S. V. (2008) Fermentative hydrogen production with simultaneous wastewater treatment: influence of pretreatment and system operating conditions. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 67, 950-961.

Mohan, S. V., G. Mohanakrishna, S. V. Raghavulu & P. N. Sarma (2007) Enhancing biohydrogen production from chemical wastewater treatment in anaerobic sequencing batch biofilm reactor (AnSBBR) by bioaugmenting with selectively enriched kanamycin resistant anaerobic mixed consortia. *International Journal of Hydrogen Energy*, 32, 3284-3292.

Mu, Y., X. J. Zheng, H. Q. Yu & R. F. Zhu (2006) Biological hydrogen production by anaerobic sludge at various temperatures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31, 780-785.

Nandi, R. & S. Sengupta (1998) Microbial production of hydrogen: An overview. *Critical Reviews in Microbiology*, 24, 61-84.

Nath, K., A. Kumar & D. Das (2006) Effect of some environmental parameters on fermentative hydrogen production by *Enterobacter cloacae* DM11. *Canadian Journal of Microbiology*, 52, 525-532.

Nielsen, A. T., W. T. Liu, C. Filipe, L. Grady, S. Molin & D. A. Stahl (1999) Identification of a novel group of bacteria in sludge from a deteriorated biological phosphorus removal reactor. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 1251-1258.

Ntaikou, I.; Antonopoulou, G.; Lyberatos, G. (2010) Biohydrogen production from biomass and wastes via dark fermentation: a review. *Waste Biomass Valor*, 1, 21-39.

O-Thong, S., P. Prasertsan, D. Karakashev & I. Angelidaki (2008) Thermophilic fermentative hydrogen production by the newly isolated *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* PSU-2. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 1204-1214.

Oh, S. E., S. Van Ginkel & B. E. Logan (2003) The relative effectiveness of pH control and heat treatment for enhancing biohydrogen gas production. *Environmental Science & Technology*, 37, 5186-5190.

Pan, C. M., Y. T. Fan, P. Zhao & H. W. Hou (2008) Fermentative hydrogen production by the newly isolated *Clostridium beijerinckii* Fanp3. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 5383-5391.

Parnaudeau, V., N. Condom, R. Oliver, P. Cazevielle & S. Recous (2008) Vinasse organic matter quality and mineralization potential, as influenced by raw material, fermentation and concentration processes. *Bioresource Technology*, 99, 1553-1562

Prada, S.M, Guekezian, M., Suárez-Iha, M. E. V. (1998) Metodologia analítica para a determinação de sulfato em vinhoto. *Química Nova*, 21, 249-252.

Qian, C.-x., L.-y. Chen, H. Rong & X.-m. Yuan (2011) Hydrogen production by mixed culture of several facultative bacteria and anaerobic bacteria. *Progress in Natural Science-Materials International*, 21, 506-511.

Quan, X. C., H. C. Shi, H. Liu, J. L. Wang & Y. Qian (2004) Removal of 2,4-dichlorophenol in a conventional activated sludge system through bioaugmentation. *Process Biochemistry*, 39, 1701-1707.

Ren, N., G. Cao, A. Wang, D.-J. Lee, W. Guo & Y. Zhu (2008) Dark fermentation of xylose and glucose mix using isolated *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* W16. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 6124-6132.

Rossetto, A.J. (1987) Utilização agrônômica dos sub-produtos e resíduos da indústria açucareira e alcooleira. In: *Cana-de-açúcar – Cultivo e Utilização*, 2, 435-504.

Saitou, N. & M. Nei (1987) The Neighbor-Joining Method - A New Method For Reconstructing Phylogenetic Trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4, 406-425.

Salomon, K. R. & E. E. Silva Lora (2009) Estimate of the electric energy generating potential for different sources of biogas in Brazil. *Biomass & Bioenergy*, 33, 1101-1107.

Schleifer, K.-H. 2009. Phylum XIII. *Firmicutes* Gibbons and Murray 1978, 5 (*Firmacutes* [sic] Gibbons and Murray 1978, 5).

Seppala, J. J., J. A. Puhakka, O. Yli-Harja, M. T. Karp & V. Santala (2011) Fermentative hydrogen production by *Clostridium butyricum* and *Escherichia coli* in pure and cocultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36, 10701-10708.

Shida, G. M., A. R. Barros, C. M. dos Reis, E. L. Cavalcante de Amorim, M. H. R. Z. Damianovic & E. L. Silva (2009) Long-term stability of hydrogen and organic acids production in an anaerobic fluidized-bed reactor using heat treated anaerobic sludge inoculum. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34, 3679-3688.

Shin, H. S., J. H. Youn & S. H. Kim (2004) Hydrogen production from food waste in anaerobic mesophilic and thermophilic acidogenesis. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29, 1355-1363.

Shin, J. H., J. H. Yoon, E. K. Ahn, M. S. Kim, S. J. Sim & T. H. Park (2007) Fermentative hydrogen production by the newly isolated *Enterobacter asburiae* SNU-1. *International Journal of Hydrogen Energy*, 32, 192-199.

Sigurbjörnsdóttir, M. A. (2009) Physiological and phylogenetic studies of *Caloramator* and *Thermoanaerobacterium* species : ethanol and hydrogen production from complex biomass. Disponível em <http://hdl.handle.net/1946/3108>.

Siles, J. A., I. Garcia-Garcia, A. Martin & M. A. Martin (2011) Integrated ozonation and biomethanization treatments of vinasse derived from ethanol manufacturing. *Journal of Hazardous Materials*, 188, 247-253.

Silva, M.A.S. (2007) Uso de vinhaça e impactos nas propriedades do solo e lençol freático. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 11, n.1, 108-114.

Srinivasan, S., Kim, M., K., Lee, M. (2012) *Pseudoclavibacter caeni* sp. nov., isolated from sludge of a sewage disposal plant. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*, 62, 786-790

Stephenson, D. & T. Stephenson (1992) Bioaugmentation for enhancing biological wastewater treatment. *Biotechnology Advances*, 10, 549-559.

Suresh, K., Prakash, D., Rastogi, N., Jain, R. K. (2007) *Clostridium nitrophenolicum* sp. nov., a novel anaerobic *p*-nitrophenol-degrading bacterium, isolated from a subsurface soil sample. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*, 57: 1886-1890.

Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei & S. Kumar (2011) MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28, 2731-2739.

Tanisho, S. & Y. Ishiwata (1994) Continuous hydrogen-production from molasses by the bacterium *Enterobacter aerogenes*. *International Journal of Hydrogen Energy*, 19, 807-812.

Ngo, T. A., N. Tra Huong & B. Ha Thi Viet (2012) Thermophilic fermentative hydrogen production from xylose by *Thermotoga neapolitana* DSM 4359. *Renewable Energy*, 37, 174-179.

Tolvanen, K. E. S. & M. T. Karp (2011) Molecular methods for characterizing mixed microbial communities in hydrogen-fermenting systems. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36, 5280-5288.

Ueno, Y., S. Haruta, M. Ishii & Y. Igarashi (2001a) Characterization of a microorganism isolated from the effluent of hydrogen fermentation by microflora. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92, 397-400.

--- (2001b) Microbial community in anaerobic hydrogen-producing microflora enriched from sludge compost. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57, 555-562.

Ueno, Y., D. Sasaki, H. Fukui, S. Haruta, M. Ishii & Y. Igarashi (2006) Changes in bacterial community during fermentative hydrogen and acid production from organic waste by thermophilic anaerobic microflora. *Journal of Applied Microbiology*, 101, 331-343.

UNICA-União da Indústria de Cana-de-açúcar:
<http://www.unica.com.br/dadosCotacao/estatistica/> site acessado em abril de 2012.

Valdez-Vazquez, I. & H. M. Poggi-Varaldo (2009) Hydrogen production by fermentative consortia. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, 13, 1000-1013.

Van Limbergen, H., E. M. Top & W. Verstraete (1998) Bioaugmentation in activated sludge: current features and future perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 50, 16-23.

van Niel, E. W. J., M. A. W. Budde, G. G. de Haas, F. J. van der Wal, P. A. M. Claasen & A. J. M. Stams (2002) Distinctive properties of high hydrogen producing extreme thermophiles, *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* and *Thermotoga elfii*. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27, 1391-1398.

Vardar-Schara, G., T. Maeda & T. K. Wood (2008) Metabolically engineered bacteria for producing hydrogen via fermentation. *Microbial Biotechnology*, 1, 107-125.

Wang, B., W. Wan & J. L. Wang (2008) Inhibitory effect of ethanol, acetic acid, propionic acid and butyric acid on fermentative hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 7013-7019.

Wang, J. & W. Wan (2008a) Effect of temperature on fermentative hydrogen production by mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 5392-5397.

--- (2008b) The effect of substrate concentration on biohydrogen production by using kinetic models. *Science in China Series B-Chemistry*, 51, 1110-1117.

--- (2009) Factors influencing fermentative hydrogen production: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34, 799-811.

Wang, J. L., X. C. Quan, L. B. Wu, Y. Qian & W. Hegemann (2002) Bioaugmentation as a tool to enhance the removal of refractory compound in coke plant wastewater. *Process Biochemistry*, 38, 777-781.

Wang, J. L. & W. Wan (2008c) Comparison of different pretreatment methods for enriching hydrogen-producing bacteria from digested sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 2934-2941.

Wilderer, P. A., M. A. Rubio & L. Davids (1991) Impact of the addition of pure cultures on the performance of mixed culture reactors. *Water Research*, 25, 1307-1313.

Wilkie, A.C., Riedesel, K.J., Owens J.M (2000) Stillage characterization and anaerobic treatment of ethanol stillage from conventional and cellulosic feedstocks. *Biomass and Bioenergy*, 19, 63-102.

Xing, D., N. Ren, A. Wang, Q. Li, Y. Feng & F. Ma (2008a) Continuous hydrogen production of auto-aggregative *Ethanoligenens harbinense* YUAN-3 under non-sterile condition. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 1489-1495.

Xing, D. F., N. Q. Ren, O. B. Li, M. Lin, A. J. Wang & L. H. Zhao (2006) *Ethanoligenens harbinense* gen. nov., sp nov., isolated from molasses wastewater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56, 755-760.

Xing, D. F., N. Q. Ren & B. E. Rittmann (2008b) Genetic diversity of hydrogen-producing bacteria in an acidophilic ethanol-H₂-coproducing system, analyzed using the [Fe]-hydrogenase gene. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 1232-1239.

Xu, J.-F., N.-q. Ren, D.-X. Su & J. Qiu (2010) Bio-hydrogen production from acetic acid steam-exploded corn straws by simultaneous saccharification and fermentation with *Ethanoligenens harbinense* B49. *International Journal of Energy Research*, 34, 381-386.

Yokoi, H., A. Saitsu, H. Uchida, J. Hirose, S. Hayashi & Y. Takasaki (2001) Microbial hydrogen production from sweet potato starch residue. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 91, 58-63.

Zhang, T., H. Liu & H. H. P. Fang (2003) Biohydrogen production from starch in wastewater under thermophilic condition. *Journal of Environmental Management*, 69, 149-156.

Zhao, Y., N. Ren & A. Wang (2008) Contributions of fermentative acidogenic bacteria and sulfate-reducing bacteria to lactate degradation and sulfate reduction. *Chemosphere*, 72, 233-242.

Zhu, H., W. Parker, R. Basnar, A. Proracki, P. Falletta, M. Beland & P. Seto (2009) Buffer requirements for enhanced hydrogen production in acidogenic digestion of food wastes. *Bioresource Technology*, 100, 5097-5102.

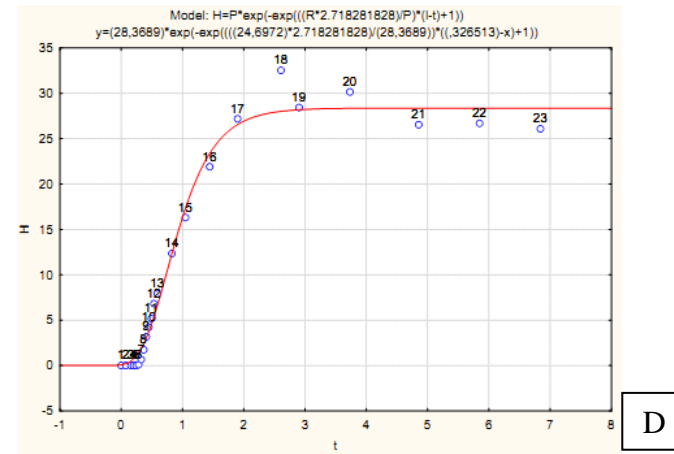
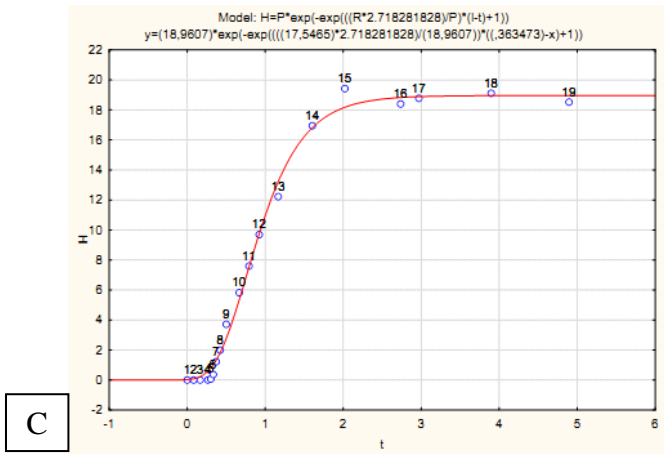
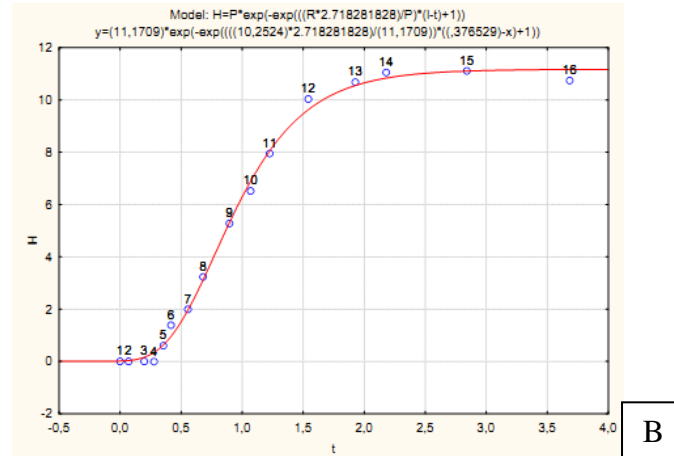
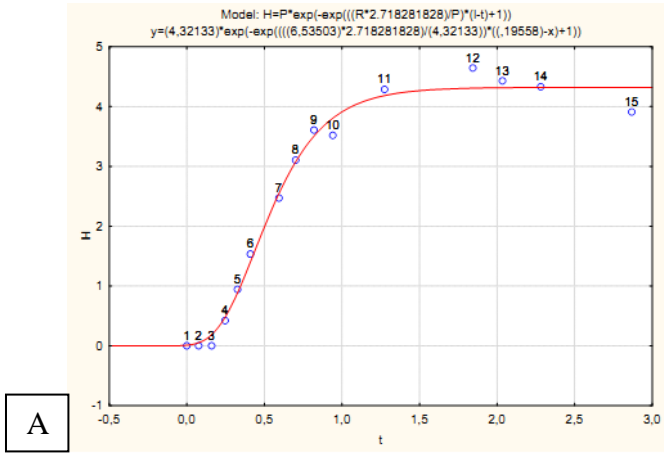
Zwietering, M. H., I. Jongenburger, F. M. Rombouts & K. Vantriet (1990) Modeling of the bacterial-growth curve. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 1875-1881.

APÊNDICES

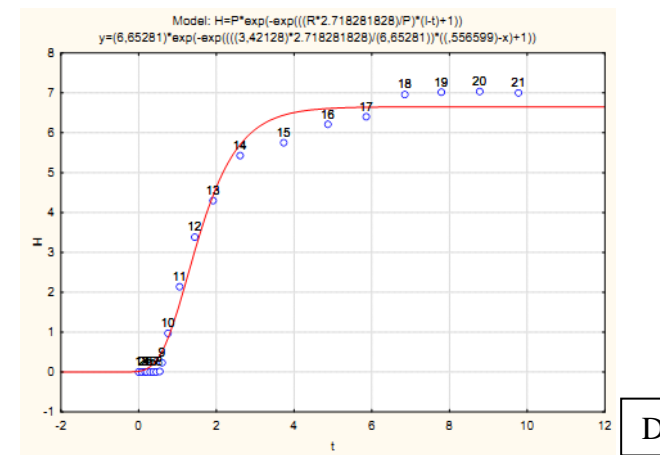
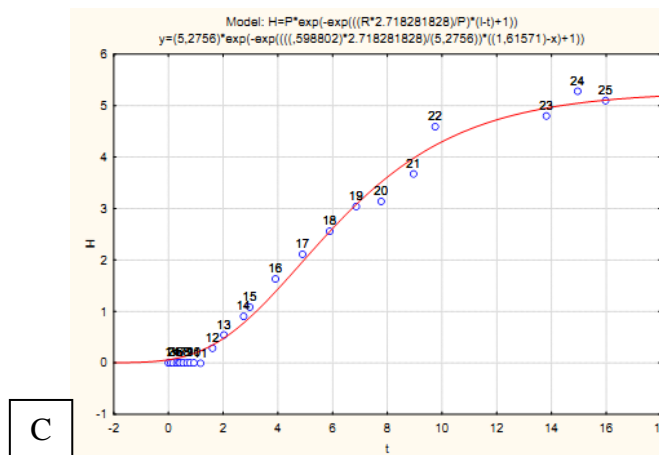
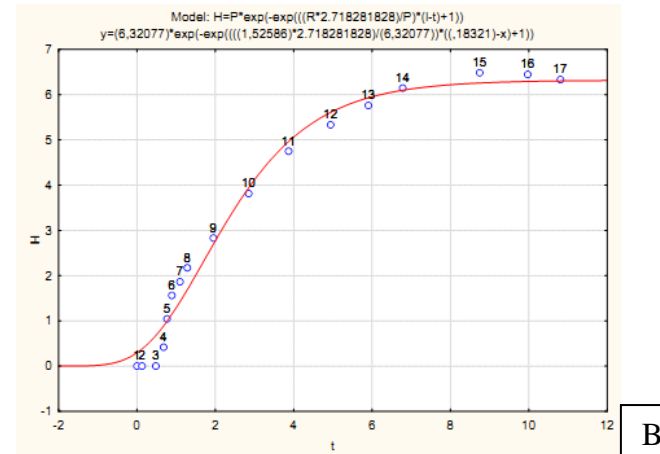
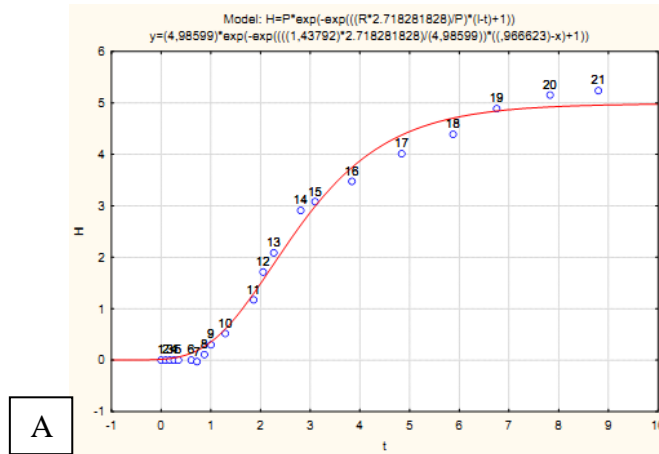
Apêndice A – Tabela: Limites de detecção (LD) para análise da composição do biogás por cromatografia gasosa

Composto	LD (μmol)
Hidrogênio	0,902
Nitrogênio	1,985
Metano	1,039
Gás carbônico	0,474

Apêndice B – Gráficos com os dados de produção acumulada de hidrogênio ajustados ao modelo modificado de Gompertz nos ensaios mesofílicos. A) – ensaio M2, (B) – ensaio M5, (C) – ensaio M7 e (D) ensaio M12



Apêndice C – Gráficos com os dados de produção acumulada de hidrogênio ajustados ao modelo modificado de Gompertz nos ensaios termófilos. A) – ensaio T2, (B) – ensaio T5, (C) – ensaio T7 e (D) ensaio T12



Apêndice D – Figura D.1: Análise de açúcares por cromatografia líquida de alta eficiência em amostra de vinhaça (LOTE 1).



Eurofins do Brasil Análises de Alimentos Ltda
 Rod. Eng. Ermênio O. Penhado, Km 57,7 sh
 Condomínio Industrial - Prédio 1
 Bairro Tombadouro
 13337-300 Indaiatuba
 São Paulo
 BRASIL
 Tel: +55 19 2107 5500
 Fax: +55 19 2107 5505
 PABX: +55 19 2107 5500
 FelipeBarnello@eurofins.com.br
 www.eurofins.com.br

CAROLINA ZAMPOL LAZARO
 attn. CAROLINA ZAMPOL LAZARO
 AVENIDA JOÃO DAGNONE, 1100
 JD. SANTA ANGELINA
 13563-120 SÃO CARLOS, SP
 BRASIL

Data do Relatório: 02.03.2012

Relatório de Ensaio: AR-12-GB-004994-01



Código da Amostra 691-2012-00003378

Dados da amostra	Trata-se de Amostra de Vinhaça de Cana de Açúcar com DQO
	Aproximada de 19g/L
	Contém Sulfato, Fosfato
Quantidade recebida	233g
Descrição / Embalagem	Líquido escuro em recipiente de vidro
Recebido(a) em:	27.01.2012
*Data do Pedido	26.01.2012

Resultados de ensaio

J8286 Perfil de açúcares

Método: Internal method, HPLC

Análise de laboratório parceiro acreditado Eurofins Analytik GmbH, Wiertz-Egger-Jörissen

Frutose	<0,5	* g/100 g
Glicose	<0,5	* g/100 g
Lactose	<0,5	* g/100 g
Maltose	<0,5	* g/100 g
Sacarose	<0,5	* g/100 g

* = menor que o limite de quantificação

Assinatura Assinado eletronicamente conforme "Medida Provisória 2.200-2" de 24/8/2001
 visite <http://www.eurofins.com.br/assinaturadigital/index.htm> para baixar uma chave de
 verificação

Edison de Fraia Jr e/ou Pedro Y. Sugueta
 Gerente Geral Gerente Técnico

Apêndice D – Figura D.2: Análise de açúcares por cromatografia líquida de alta eficiência em amostra de vinhaça (LOTE 2).



Eurofins do Brasil Análises de Alimentos Ltda
Rod. Eng. Ermênio O. Penteado, Km 57,7 s/n
Condomínio Industrial - Prédio 1
Bairro Tombadoro
13337-300 Indaiatuba
São Paulo
BRASIL
Tel: +55 19 2107 5500
Fax: +55 19 2107 5505
PABX: +55 19 2107 5500

FelipeBarelli@eurofins.com.br
www.eurofins.com.br

CAROLINA ZAMPOL LAZARO
attn: CAROLINA ZAMPOL LAZARO
AVENIDA JOÃO DAGNONE, 1100
JD. SANTA ANGELINA
13563-120 SÃO CARLOS, SP
BRASIL

Data do Relatório: 02.03.2012

Relatório de Ensaio: AR-12-GB-004995-01



Código da Amostra 691-2012-00003379

Dados da amostra	Trata-se de Amostra de Vinhaça de Cana de Açúcar com DQO Aproximada de 25g/L Contém Sulfato, Fosfato
Quantidade recebida	230g
Descrição / Embalagem	Líquido escuro em recipiente de vidro
Recebido(a) em:	27.01.2012
*Data do Pedido	26.01.2012

Resultados de ensaio

J8286 Perfil de açúcares

Método: Internal method, HPLC

Análise de laboratório parceiro acreditado Eurofins Analytik GmbH, Wiertz-Egger-Jörissen

Frutose	<0,5	* g/100 g
Glicose	<0,5	* g/100 g
Lactose	<0,5	* g/100 g
Maltose	<0,5	* g/100 g
Sacarose	<0,5	* g/100 g

* = menor que o limite de quantificação

Assinatura

Assinado eletronicamente conforme "Medida Provisória 2.200-2" de 24/8/2001
veja <http://www.eurofins.com.br/assinaturadigital/index.htm> para baixar uma chave de
verificação

Edison de Fraia Jr e/ou Pedro Y. Suguita
Gerente Geral Gerente Técnico

Apêndice E – Gráficos com os dados de produção acumulada de hidrogênio ajustados ao modelo modificado de Gompertz nos ensaios com as cepas isoladas. A) – ensaio C1, (B) – ensaio C5, (C) – ensaio CA

