

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

CAMILA ABREU BORGES DA SILVA RABELO

**Avaliação de consórcio microbiano obtido a partir de lodo de
estação de tratamento de efluentes de indústria de papel e celulose
visando à produção de H₂ a partir de celulose**

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos
2014

CAMILA ABREU BORGES DA SILVA RABELO

Avaliação de consórcio microbiano obtido a partir de lodo de estação de tratamento de efluentes de indústria de papel e celulose visando à produção de H₂ a partir de celulose

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

Orientadora: Profa. Dra. Maria Bernadete Amâncio Varesche

São Carlos
2014

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

R114a Rabelo, Camila Abreu Borges da Silva
Avaliação de consórcio microbiano obtido a partir de lodo de estação de tratamento de efluentes de indústria de papel e celulose visando à produção de H₂ a partir de celulose. / Camila Abreu Borges da Silva Rabelo; orientadora Maria Bernadete Amâncio Varesche. São Carlos, 2014.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação e Área de Concentração em Hidráulica e Saneamento -- Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2014.

1. fermentação. 2. homoacetogênese. 3. Clostridium. 4. ácido butírico. 5. Desulfovibrio. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Bacharel **CAMILA ABREU BORGES DA SILVA RABELO**.

Título da dissertação: "Avaliação de consórcio microbiano obtido a partir de lodo de estação de tratamento de efluentes de indústria de papel e celulose visando à produção de H_2 a partir de celulose".

Data da defesa: 09/05/2014

Comissão Julgadora:

Resultado:

Profa. Dra. **Maria Bernadete Amâncio Varesche**
(Orientadora)
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)

Aprovada

Profa. Dra. **Sandra Imaculada Maintinguer**
(Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"/UNESP-Araraquara)

Aprovada

Profa. Dra. **Simone Damasceno Gomes**
(Universidade Estadual do Oeste do Paraná/UNIOESTE)

Aprovada

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

Profa. Associada **Maria Bernadete A. Varesche Silva**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:
Prof. Titular **Denis Vinícius Coury**

*Para Marcim,
com amor.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida.

Aos meus pais, pelo amor com que me orientaram, pela educação, pelas oportunidades oferecidas, pela presença tão importante no meu dia-a-dia. Ao meu irmão pelo carinho, companheirismo e pela chatice. À Tia Nanci, Naná e tio Chico pelo apoio e pela torcida. Amo vocês!

Aos meus filhos, o colorido da minha vida, o equilíbrio do meu ser, obrigada!

Ao Marcim, por ter me ouvido, aconselhado, apoiado e compreendido em todos (quase todos) os momentos. Obrigada por fazer parte da minha vida.

À Waldomira, Néia, Vando, Jordana, Mari e Cullen por todo carinho e apoio. Aos meus sobrinhos, Raphael, Gabriel, Rayane, Isabella e Fernando.

À minha vó Juraci (*in memoriam*) pelos seus ensinamentos e exemplos. A cada dia que passa, percebo o quanto você sempre esteve certa.

À professora Maria Bernadete por ter aceitado ser minha orientadora, contribuindo para o meu desenvolvimento profissional e pessoal. Agradeço ainda por toda a disponibilidade e por ter me ajudado, permitindo-me voltar a vida acadêmica. Sou muito grata a você. Um sincero obrigado.

Obrigada também ao professor Rafael K. X. Bastos, que incitou toda esta minha história com o saneamento.

Às técnicas do LPB, à Janja, Isabel, Helô, Jú e Carol, pela ajuda tão capacitada e eficiente nas mais diferentes atividades. Isabel, obrigada pela paciência, termino esta fase ainda mais interessada na biomol. Aos funcionários do prédio da Engenharia Ambiental: Dona Rosa, Fernando, Silvana, Edson e Antônio.

Aos colegas do laboratório: Mara, Bruna, Regiane, Fabrício, Juliana, Eduardo, Carol Gil, Dagoberto, Inês, Paulo, Rachael, Leandro, Laís, Matheus, Tiago (Cebola), Tiago e Priscila. À Mari Carosi que tanto me ajudou no processamento de dados da biomol, obrigada! Aos estagiários da Livia, Maria Eduarda e Lucas que foram por um tempinho meus também.

Gostaria de agradecer especialmente à Livia Botta pela “co-orientação”, por tanto ter me auxiliado. Obrigada pelo seu apoio, disponibilidade, confiança, paciência e pelos momentos de “terapia”!

Às minhas amigas de mestrado: Laís, Andressa, Carla, Carol, Juliana e Karen por terem participado da minha vida nestes dois anos.

Às minhas amigas Renata, Rosane e Carol pelo apoio ativo e diário (mesmo de tão longe...).

À Universidade de São Paulo, à Escola de Engenharia de São Carlos e ao Departamento de Hidráulica e Saneamento. Ao corpo técnico e administrativo do departamento: Sá, Priscila, Rose e Lú.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro.

RESUMO

RABELO, C. A. B. S. **Avaliação de consórcio microbiano obtido a partir de lodo de estação de tratamento de efluentes de indústria de papel e celulose visando à produção de H₂ a partir de celulose.** 2014. 108 F. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

Ensaio em reator em batelada foram conduzidos para avaliar a produção biológica de hidrogênio a partir de diferentes concentrações de celulose (E1:2,0 g.L⁻¹; E2: 5,0 g.L⁻¹ e E3: 10,0 g.L⁻¹) em pH inicial de 6,8 a 37°C. O objetivo do trabalho foi analisar o lodo de estação de tratamento de efluentes de indústria de papel e celulose como inóculo para obtenção de um consórcio celulolítico e fermentativo. Os ensaios foram monitorados por 16 dias com análises de carboidratos, DQO, pH, ST, STV, biogás, ácidos orgânicos e álcoois, além de análises de caracterização filogenética do Domínio *Bacteria*. Nos três ensaios, a produção de hidrogênio foi detectada a partir do quarto dia, provavelmente devido ao tempo necessário para hidrólise da celulose. Os dados de produção de hidrogênio foram ajustados ao modelo de Gompertz modificado, sendo calculado o potencial máximo de produção de H₂ (*P*) de 1,23 mmol para E1, 3,14 mmol para E2 e 2,33 mmol para E3. Para os ensaios E1 e E2 observou-se rendimentos de H₂ semelhantes; ou seja, de 0,62 mmol H₂.g⁻¹ de celulose. Para o ensaio E3 observou-se 0,23 mmol H₂.g⁻¹ de celulose. Ácido butírico foi o principal ácido orgânico observado em 2,2, 1,8 e 2,2 g.L⁻¹ para E1, E2 e E3, respectivamente. A fase de diminuição da produção de H₂ foi acompanhada pela evolução de metano, ácido acético e sulfeto nos três ensaios. Na visualização microscópica de amostras dos ensaios foi possível averiguar a presença de variedade de formas e arranjos bacterianos corroborando para heterogeneidade do inóculo. Em relação à análise filogenética foram identificados, com mais de 95% de similaridade, gêneros de bactérias reconhecidamente produtoras de H₂ e associadas a ambiente com substratos lignocelulósicos, tais como, *Clostridium* sp., *Klebsiella* sp. e *Raoultella* sp., além de consumidoras de H₂ *Clostridium* sp., por homoacetogênese e *Desulfovibrio* sp. por sulfetogênese. A partir das análises dos resultados, foi possível afirmar que houve produção biológica de hidrogênio a partir de celulose como substrato e lodo de ETE industrial como inóculo.

Palavras-chave: fermentação, homoacetogênese, *Clostridium*, ácido butírico, *Desulfovibrio*.

ABSTRACT

RABELO, C. A. B. S. **Evaluation of microbial consortium obtained from sludge wastewater treatment of pulp and paper industry to the production of H₂ from cellulose.** 2014. 108 F. Dissertation (Master) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

Batch assays in anaerobic reactors were conducted to evaluate the biological production of hydrogen from different concentrations of cellulose (E1: 2.0 g.L⁻¹; E2: 5.0 g.L⁻¹ and E3: 10.0 g.L⁻¹) in initial pH of 6.8 at 37 ° C. The aim of this study was analyze the sludge of a treatment plant of pulp and paper industry wastewater as inoculum in the anaerobic reactors. The assays were monitored for 16 days by analyses of total soluble carbohydrates, COD, pH, TS, TVS, biogas and organic acids and alcohols. Phylogenetic characterization was carried out for microorganisms of the *Bacteria* Domain by cloning and sequencing analysis. The hydrogen production was detected on the fourth day of the incubation for the three experimental conditions, probably due to the period required for cellulose hydrolysis. Hydrogen production data were adjusted to the modified Gompertz model, and the maximum hydrogen production potential (*P*) were 1.23 mmol for E1, 3.14 mmol for E2 and 2.33 mmol for E3. Similar hydrogen yields were observed for assays E1 and E2; ie 0.62 mmol H₂.g⁻¹ of cellulose. For E3 the yield was 0.23 mmol H₂.g⁻¹ cellulose. Butyric acid was the major organic acid observed with 2.2, 1.8 and 2.2 g.L⁻¹ to E1, E2 and E3, respectively. Hydrogen depletion in the biogas was accompanied by the evolution of methane, acetic acid and sulfide in the three tests. By means of microscopic visualization of microorganisms samples it was possible to determine the presence of a variety of bacterial shapes and confirming the heterogeneity of the inoculum. Regarding phylogenetic analysis, there were identified, with more than 95% similarity, genera of bacteria known as hydrogen producers or related with environments associated with lignocellulosic substrates such as *Clostridium* sp. *Klebsiella* sp. and *Raoultella* sp., consuming genere were also detedted, such *Clostridium* sp. by homoacetogênese and *Desulfovibrio* sp. by sulfidogenesis.

Keywords: fermentation, homoacetogenesis, *Clostridium*, butyric acid, *Desulfovibrio*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1.	Percentual de produção de hidrogênio a partir de diferentes matérias-primas. Fonte dos dados: DAS, 2009; BALAT; KIRTAY, 2010.....	6
Figura 3.2.	Estrutura química da celulose (modificada de FERREIRA et al., 2009).....	10
Figura 3.3.	Esquema da hidrólise enzimática da celulose (modificado de ZHANG et al., 2006).....	11
Figura 3.4.	Diagrama representando a degradação anaeróbia da celulose. (modificado de LESCHINE, 1995).....	12
Figura 4.1.	Fluxograma experimental.....	17
Figura 4.2.	Reatores anaeróbios em batelada.....	22
Figura 5.1.	Gráfico da evolução de H ₂ , ajustado ao modelo de Gompertz, nos meios de cultivo Ho (HO et al., 2012) (A) e LGM 94 (ATLAS, 2005) (B).....	33
Figura 5.2.	Ensaio de produção de hidrogênio a partir de celulose.....	34
Figura 5.3.	Pressão parcial de H ₂ nos ensaios E1, E2 e E3.....	36
Figura 5.4.	Variação temporal de ácidos orgânicos em E1.....	40
Figura 5.5.	Variação temporal de ácidos orgânicos em E2.....	41
Figura 5.6.	Variação temporal de ácidos orgânicos em E3.....	41
Figura 5.7.	Variação temporal de carboidrato e H ₂ para os ensaios E1 (A); E2 (B) e E3 (C).	43
Figura 5.8.	Variação temporal de produção de H ₂ , CH ₄ , H ₂ S e ácido acético e para os ensaios E1 (A), E2 (B) e E3 (C)	45
Figura 5.9.	Diferença de coloração do meio dos reatores anaeróbios apresentando precipitação do sulfeto (B e C) e sem precipitação de sulfeto (A).....	49
Figura 5.10.	Variação temporal de DQO para os ensaios E1, E2 e E3.....	51
Figura 5.11.	Microscopia óptica do inóculo: (A e B) coloração de Gram de amostra do reator de reativação, (C) Amostra <i>in natura</i> do ensaio E2, (D) coloração de endósporos do ensaio E2 e coloração de Gram do ensaio E2 (E e F).....	53
Figura 5.12.	Dendograma baseado no coeficiente de similaridade de Pearson a partir dos padrões de bandas do DGGE do Domínio <i>Bacteria</i>	54

Figura 5.13.	Dendograma baseado no coeficiente de similaridade de Pearson a partir dos padrões de bandas do DGGE do Domínio <i>Archaea</i>	55
Figura 5.14.	Abundância relativa dos gêneros bacterianos identificados.....	56
Figura 5.15.	Árvore filogenética construída a partir de distâncias evolutivas inferidas utilizando o método Neighbor-Joining (SAITOU, NEI, 1987). A porcentagem de réplicas da árvore está apresentada perto dos ramos e foi calculada com base nos valores de bootstrap com 1000 réplicas (FELSENSTEIN, 1985). A análise evolutiva foi realizada utilizando o <i>software</i> MEGA 6 (TAMURA et al., 2013). Out-group: <i>Methanosarcina barkeri</i>	63
Figura 5.16.	Diagrama representando a degradação anaeróbia da celulose com os gêneros bacterianos identificados pelas análises de clonagem e sequenciamento do gene RNAr 16S.....	65
Figura 9.1.	Produção acumulada de hidrogênio (H - mmol) em função do tempo (t - dias), ajustada ao modelo de Gompertz nos ensaios com 2,0g.L ⁻¹ (E1); 5,0g.L ⁻¹ (E2) e 10,0g.L ⁻¹ (E3) de celulose.....	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1.	Substratos orgânicos para produção biológica de hidrogênio.....	7
Tabela 3.2.	Comparação dos rendimentos de produção de H ₂ a partir de substratos celulósicos e diferentes fontes de inóculo.....	13
Tabela 4.1.	Composição do meio de enriquecimento.....	18
Tabela 4.2.	Composição dos meios de cultivo, LGM 94, Del Nery e Ho.....	19
Tabela 4.3.	Composição da solução de vitaminas 2.....	20
Tabela 4.4.	Concentração de celulose e inóculo adotadas nos ensaios para produção de H ₂	23
Tabela 4.5.	Condições utilizadas na PCR.....	25
Tabela 4.6.	Condições utilizadas na PCR utilizando os <i>primers</i> 27F e 1492R.....	25
Tabela 4.7.	Componentes adicionados ao meio de cultivo LB para o plaqueamento de <i>E.coli</i> transformadas.....	26
Tabela 4.8.	Condições utilizadas na PCR com os <i>primers</i> M13F e M13R.....	26
Tabela 5.1.	Valores ajustados ao modelo de Gompertz.....	33
Tabela 5.2.	P , R_m e λ para os ensaios E1, E2 e E3.....	35
Tabela 5.3.	Rendimento de produção de H ₂ para E1, E2 e E3.....	38
Tabela 5.4.	Rendimentos de produção de H ₂ em reatores em batelada que utilizam celulose como substrato.....	39
Tabela 5.5.	Variação de pH inicial e final para os ensaios 1, 2 e 3.....	39
Tabela 5.6.	Quantidade de hidrogênio requerido para a formação de sulfeto.....	48
Tabela 5.7.	Quantidade de H ₂ requerido para formação de CH ₄ , ácido acético e H ₂ S.....	49
Tabela 5.8.	Sólidos Totais (ST), Fixos (STF) e Voláteis (STV) nos ensaios E1, E2 e E3.....	50
Tabela 5.9.	Balanco de DQO de E1, E2 e E3.....	51
Tabela 5.10.	Comparação da DQO medida com a DQO teórica para os ensaios E1, E2 e E3.....	52

Tabela 5.11.	Identidade das UTOs de acordo com GenBank.....	56
Tabela 5.12.	Resumo dos parâmetros obtidos dos ensaios de produção de H ₂ a partir de celulose.....	64
Tabela 9.1.	Concentração dos subprodutos orgânicos gerados nos ensaios E1...	80
Tabela 9.2.	Concentração dos subprodutos orgânicos gerados nos ensaios E2...	80
Tabela 9.3.	Concentração dos subprodutos orgânicos gerados nos ensaios E3...	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

λ	Período de duração da fase <i>Lag</i>
A/M	Relação alimento/microrganismo
DGGE	Eletroforese em gel de gradiente desnaturante
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DQO	Demanda Química de Oxigênio
E1	Ensaio de produção de H ₂ com 2,0 g.L ⁻¹ de celulose
E2	Ensaio de produção de H ₂ com 5,0 g.L ⁻¹ de celulose
E3	Ensaio de produção de H ₂ com 10,0 g.L ⁻¹ de celulose
EESC	Escola de Engenharia de São Carlos
ETE	Estação de Tratamento de Efluentes
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
LPB	Laboratório de Processos Biológicos
M	Concentração molar
PCR	Reação em cadeia de polimerase
<i>P</i>	Potencial máximo de produção de hidrogênio
pH	Potencial Hidrogeniônico
R ²	Coefficiente de determinação
R _m	Velocidade máxima de produção de hidrogênio
RNA	Ácido ribonucléico
SSF	Sólidos Suspensos Fixos
SST	Sólidos Suspensos Totais
SSV	Sólidos Suspensos Voláteis
ST	Sólidos totais
ST	Sólidos Totais
STF	Sólidos totais fixos
STV	Sólidos totais voláteis
t	tempo

UASB

Reator anaeróbio de manta de lodo

USP

Universidade de São Paulo

LISTA DE SÍMBOLOS

μm	Micrômetro
d	Dia
g	Gramma
h	Hora
L	Litro
mg	Miligrama
min	Minutos
mL	Mililitro
mmol	Milimol
°C	Graus celsius
rpm	Rotações por minuto
t	Tempo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. Objetivo geral	3
2.2. Objetivos específicos	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1. Hidrogênio como fonte alternativa de energia.....	5
3.2. Resíduos de celulose como substrato	9
3.3. Produção biológica de H ₂ a partir de resíduos de celulose.....	12
4. MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1. Esquema operacional	17
4.2. Substrato	18
4.3. Inóculo	18
4.4. Reativação do inóculo.....	18
4.5. Ensaio para escolha do meio de cultivo	19
4.6) Ensaio para produção de H ₂ a partir de celulose.....	22
4.7. Análise de carboidratos.....	23
4.8. Análises físico-químicas	23
4.9. Análises Cromatográficas	23
4.10. Análises microbiológicas.....	24
4.10.1. Exames Microscópicos	24
4.10.2. PCR/DGGE.....	24
4.10.3. Clonagem e sequenciamento do gene RNAr 16S.....	25
4.11. Ajuste dos dados experimentais.....	27
4.12. Balanço de massa em termos de DQO	28
5) RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1. Escolha do meio de cultivo.....	31
5.2. Reativação do inóculo.....	31
5.3. Ensaio de produção de H ₂	34
5.3.1) Ácidos orgânicos e álcoois	39
5.3.2) Sólidos Totais e Voláteis	49
5.4. Análises microbiológicas.....	52

5.4.1. Exame de microscopia óptica	52
5.4.2. PCR/DGGE.....	54
5.4.3. Clonagem e sequenciamento do gene RNAr 16S.....	55
5.5) Análise comparativa dos ensaios de produção de H ₂	63
6) CONCLUSÕES	67
7) RECOMENDAÇÕES	69
8) REFERÊNCIAS BIBLOGRÁFICAS	71
9) APÊNDICE	79

1. INTRODUÇÃO

A demanda mundial por energia tem aumentado de forma exponencial, as reservas de combustíveis têm diminuído e a queima de combustíveis fósseis tem sérios efeitos negativos sobre o ambiente por causa da emissão de CO₂. Em resposta a tais percepções, a busca de novas fontes de energia sustentável em substituição aos combustíveis fósseis tem sido foco de diversas pesquisas (KAPDAN e KARGI, 2006; LYND et al., 2008). Desse modo, tem-se como possibilidade o uso de hidrogênio como fonte de energia, o qual pode ser obtido a partir de processos físico-químicos e biológicos.

Os processos físico-químicos como, por exemplo, a hidrólise de hidrocarbonetos e a dissociação térmica direta da molécula de água, são bem conhecidos, entretanto não apresentam custo-benefício satisfatório devido à alta demanda energética. Já os processos biológicos têm despertado crescente interesse, pois estes processos são geralmente operados à temperatura e pressão ambientes, ocasionando menor consumo de energia e balanços energéticos favoráveis (DAS, VEZIROGLU, 2008; DAS, 2009).

Os processos biológicos de produção de H₂ incluem a biofotólise direta ou indireta da água, processos foto-fermentativos, processos fermentativos e processos híbridos (KAPDAN, KARGI, 2006; WANG, WAN, 2009; KIRTAY, 2011). Dentre estes, aqueles em que estão envolvidas bactérias fermentativas são atrativos, devido principalmente à maior produção de H₂, quando comparada aos outros processos biológicos, além da possibilidade de utilização de diferentes resíduos orgânicos como substrato (MATHEWS, WANG, 2009).

Na fermentação, substratos ricos em matéria orgânica são convertidos em compostos mais simples, como ácidos orgânicos voláteis, álcool, H₂ e CO₂ (MATHEWS, WANG, 2009). O baixo custo e a disponibilidade de substratos são requisitos para ter um impacto significativo sobre os desafios de energia e sustentabilidade (LYND et al., 2008). Nesse sentido, resíduos de celulose representam uma alternativa sustentável, uma vez que têm baixo custo de obtenção, e são renováveis e abundantes. (DEMAIN, 2009).

Para a utilização da celulose como substrato é indispensável o uso de um inóculo que promova a conversão fermentativa da celulose em H₂, com a mínima (ou nenhuma) adição de celulases exógenas ao processo metabólico, uma vez que as enzimas, ainda, são importantes em termos do processamento destes resíduos e (LYND et al., 2008).

O uso de resíduos celulósicos como substrato para produção de H₂ tem sido foco de pesquisas no Laboratório de Processos Biológicos do Departamento de Hidráulica e Saneamento da Escola de Engenharia de São Carlos – Universidade de São Paulo (LPB –

EESC – USP). Rendimentos satisfatórios de H₂ têm sido obtidos a partir de papel (BOTTA et al., 2012) e celulose em pó (RATTI et al., 2013). Botta et al. (2012) utilizaram papel (0,5 g.L⁻¹) como substrato e fluido de rúmen como inóculo em reatores anaeróbios em batelada e obtiveram rendimentos de H₂ de 42 mmol.g⁻¹ de papel. Ratti et al. (2013) utilizaram celulose como substrato (10 g.L⁻¹) e lixiviado de aterro sanitário como inóculo. Nesse último caso, os autores obtiveram 12,6 mmol de H₂.g⁻¹ de celulose. Entretanto, nos trabalhos supracitados, foi relatada a necessidade do uso da enzima celulase para a hidrólise dos substratos celulósicos, uma vez que, provavelmente, as bactérias celulolíticas foram eliminadas quando os inóculos foram submetidos ao pré-tratamento térmico.

Deste modo, o objetivo deste trabalho foi obter a produção de H₂ a partir de celulose como substrato, sem adição de enzima celulase. Para tanto, utilizou-se como inóculo o lodo da estação de tratamento de efluentes (ETE) de indústria de papel e celulose. O inóculo foi escolhido por se tratar de um lodo anaeróbio, proveniente de lagoa de tratamento, misto e passível de conter bactérias celulolíticas e fermentativas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

- Avaliar o lodo biológico da estação de tratamento de efluentes (ETE) de indústria de papel e celulose como fonte de inóculo para obtenção de consórcio celulolítico e fermentativo visando à produção de H₂.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a produção de hidrogênio a partir de diferentes concentrações de celulose;
- Avaliar a formação de açúcares solúveis nos reatores em batelada;
- Avaliar a produção de ácidos orgânicos e álcoois nos reatores em batelada;
- Caracterizar e comparar filogeneticamente o consórcio microbiano gerador e consumidor de hidrogênio.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Hidrogênio como fonte alternativa de energia

Os combustíveis alternativos têm sido foco de diversas pesquisas devido, principalmente, ao aumento da demanda por energia limpa que minimiza a geração de impactos ambientais. Dentre os combustíveis alternativos, o hidrogênio é interessante, não só como fonte de energia, mas também como matéria-prima utilizada para a produção de produtos químicos, hidrogenação de gorduras e óleos na indústria alimentar, produção de dispositivos eletrônicos de processamento de aço e também para a dessulfurização e reformulação da gasolina nas refinarias (KAPDAN, KARGI, 2006).

Os métodos de produção de hidrogênio podem ser divididos em função das principais matérias-primas utilizadas - combustíveis fósseis, água e biomassa. Com a utilização de combustíveis fósseis, é possível obter hidrogênio por meio da reforma a vapor do gás natural, oxidação parcial de hidrocarbonetos pesados e gaseificação do carvão. Já com a utilização de água como substrato, os processos de obtenção de hidrogênio são eletrólise da água, foto-eletrólise e termoquímicos. A produção biológica de hidrogênio, a gaseificação da biomassa, a reforma a vapor do etanol e a reforma em fase líquida são os métodos possíveis para produção de hidrogênio quando se utiliza biomassa como substrato (KAPDAN, KARGI, 2006; DAS, VEZIROGLU, 2008).

O percentual de produção de hidrogênio a partir de diferentes matérias primas é variável (Figura 3.1). A maioria do hidrogênio é produzida a partir de fontes não renováveis, como o petróleo, gás natural e carvão. Quase a metade de todo o hidrogênio produzido é obtido a partir de processos térmicos catalíticos e gaseificação utilizando gás natural como matéria-prima (40%), os óleos pesados e nafta compõem a segunda maior fonte (30%), seguido pelo carvão (18%), e apenas 4% é gerado da água a partir da eletrólise e 1% de biomassa. Em suma, verifica-se que os processos baseados em combustíveis fósseis são responsáveis por 95% da produção global de hidrogênio (DAS, 2009; BALAT, KIRTAY, 2010).

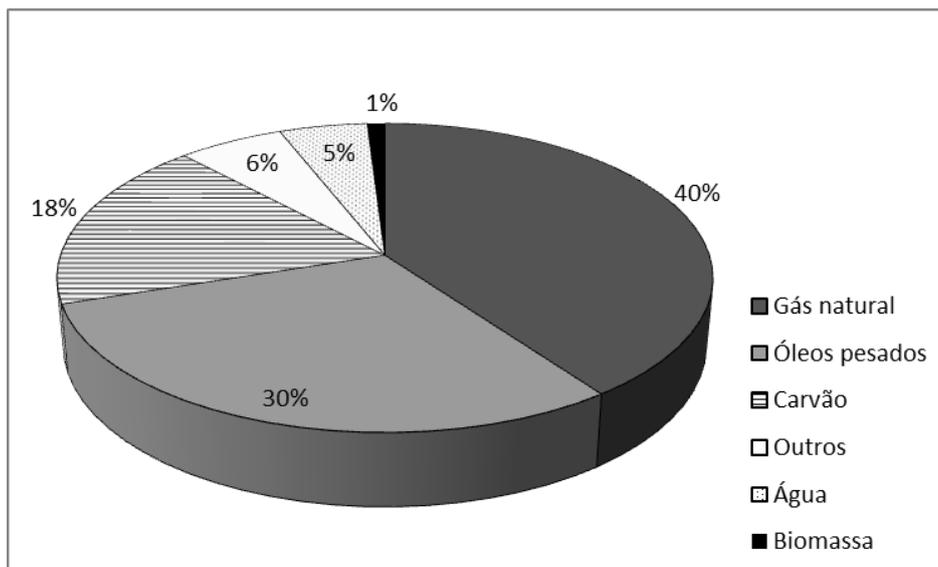


Figura 3.1: Percentual de produção de hidrogênio a partir de diferentes matérias-primas. Fonte dos dados: DAS, 2009; BALAT; KIRTAY, 2010.

A utilização de materiais residuais como substrato e a operação que ocorre, geralmente, em temperatura ambiente e pressão atmosférica, é uma possibilidade atrativa em termos de produção biológica de hidrogênio (DAS, 2009). Por meio dessa alternativa é possível obter produção descentralizada de energia, em pequena escala, em locais de disponibilidade de biomassa, evitando assim custos adicionais com o transporte (KOTAY, DAS, 2008).

O biohidrogênio pode ser produzido por meio da biofotólise direta da água utilizando algas verdes, biofotólise indireta da água por cianobactérias, fotofermentação de compostos orgânicos por meio de bactérias fotossintéticas, fermentação de compostos orgânicos por bactérias fermentativas e sistemas híbridos utilizando bactérias fotossintéticas e fermentativas. Tanto bactérias anaeróbias facultativas, quanto anaeróbias obrigatórias podem ser responsáveis pela produção fermentativa de hidrogênio (DAS, 2009; DAS, VEZIROGLU, 2008; MATHEWS, WANG, 2009; KIRTAY, 2011).

Na fermentação de compostos orgânicos, ocorre a degradação da matéria orgânica em H_2 , CO_2 e ácidos orgânicos de cadeia curta. Pela via do acetato (Equação 1) ou butirato (Equação 2), 2 moles de H_2 são gerados concomitantemente com 1 mol do ácido (GADOW, et al., 2013).



Largo espectro de substratos pode ser utilizado nesta via fermentativa, incluindo substratos contidos em resíduos, o que facilita e favorece a sua reciclagem (DAS, VEZIROGLU, 2008; DAS, 2009; KIRTAY, 2011). Resíduos líquidos e materiais celulósicos insolúveis são também passíveis de serem utilizados como substratos para produção de hidrogênio (NANDI, SENGUPTA, 1998; KIRTAY, 2011).

A Tabela 3.1 apresenta pesquisas recentes conduzidas com o propósito de produzir hidrogênio a partir de diferentes substratos orgânicos.

Tabela 3.1: Substratos orgânicos para produção biológica de hidrogênio.

Referência	Inóculo	Substrato	Rendimento de H ₂
Chen e Lin, 2003	Lodo de ETE	Sacarose	4,52 mol H ₂ .mol ⁻¹ sacarose
Fernandes, 2008	Cultura mista a partir de fermentação natural	Esgoto sanitário Vinhaça Glicerina Sacarose	6,0 mmol H ₂ .g ⁻¹ DQO 24,9 mmol H ₂ .g ⁻¹ DQO 6,0 mmol H ₂ .g ⁻¹ DQO 12,8 mmol H ₂ .g ⁻¹ DQO
Liang et al., 2010	Lodo de AnSBR	Glicose	1,36 mol H ₂ .mol ⁻¹ glicose
Maintinguer, 2011	Cultura mista de reator UASB	Xilose	0,8 mol H ₂ .mol ⁻¹ xilose
Peixoto, 2011	Cultura mista acidogênica	Água residuária de parboilização de arroz Vinhaça	1,1 mmol H ₂ .g ⁻¹ DQO 0,9 mmol H ₂ .g ⁻¹ DQO
Botta, 2012	Cultura mista de rúmex	Papel + celulase	42 mmol H ₂ .g ⁻¹ papel
Lazaro, 2012	Cultura mista de UASB	Vinhaça de cana-de-açúcar	10,5 mmol H ₂ .g ⁻¹ carboidrato

Chen e Lin (2003) avaliaram o desempenho de Reator Contínuo de Tanque Agitado (CSTR), a 35°C, para produção de hidrogênio com sacarose como substrato (20 g DQO.L⁻¹) e inóculo proveniente de tanque de aeração da estação de tratamento de esgoto de Taichung (Taiwan). Os autores concluíram que produção de gás de hidrogênio aumentou de 4,9 para 26,9 L H₂.L⁻¹.d⁻¹, com diminuição do TDH de 13,3 h para 3 h, mas, diminuiu para 20,8 L H₂.L⁻¹.d⁻¹, com TDH de 2 h. Sob condição estacionária, em TDH de 13,3 h, a taxa de produção de hidrogênio foi de 4,52 mol H₂.mol⁻¹ sacarose.

Diferentes águas residuárias foram testadas no trabalho de Fernandes (2008) utilizando reatores anaeróbios de Leito Fixo de Fluxo Ascendente e inóculo fermentativo. Os substratos

testados possibilitaram a geração de H₂, sendo que a efetividade foi diretamente relacionada com a disponibilidade de matéria orgânica facilmente biodegradável e as condições nutricionais. Os rendimentos de H₂ obtidos para os diferentes substratos foram os seguintes: 24,8, 12,8, 6,0 e 6,0 mmol.g⁻¹ de DQO para vinhaça, sacarose, esgoto sanitário, e glicerina, respectivamente

Liang et al. (2010) investigaram o desenvolvimento de grânulos bacterianos produtores de hidrogênio em reator anaeróbio operado em batelada sequencial (AnSBR) com glicose (6,94 g/L) como fonte de carbono. Pré-tratamento térmico (80°C por 20 minutos) e subsequente tratamento ácido (pH 2,0 durante 24 horas) foram realizados no lodo suspenso do reator no início da operação. No 35º dia de operação do reator, o lodo foi submetido a outro tratamento térmico. Os autores isolaram e identificaram três espécies de *Clostridium*: *C. celerecrescens*, *C. pasteurianum* e *C. acetobutylicum* nos grânulos produtores de hidrogênio. O rendimento de hidrogênio obtido foi de 1,36 mol/mol glicose.

Maintinguer et al. (2011) obtiveram hidrogênio a partir de diferentes concentrações de xilose (630,0; 1341,0; 1848,0 e 3588,0 mg/L) metabolizada por inóculo proveniente de lodo de reator UASB, usado no tratamento de dejetos de suinocultura. O lodo foi pré-tratado a quente (90°C por 15 minutos) e mantido em pH inicial de 5,5. Foram utilizados reatores anaeróbios em batelada a 37°C. Os autores identificaram, por meio da clonagem e sequenciamento do inóculo enriquecido, bactérias semelhantes a *Clostridium*, *Klebsiella* e *Burkholderia*. Além disso, foi observado que as concentrações de xilose utilizadas não inibiram o crescimento microbiano e a produção de hidrogênio, sendo que o maior rendimento de produção foi observado para 3.588 mg xilose/L (0,8 mol H₂/mol xilose).

No trabalho de Peixoto (2011), o hidrogênio foi produzido em reatores em batelada com inóculo acidogênico e água residuária de parboilização de arroz (5,3 g.L⁻¹ de DQO) e vinhaça (2,1 g.L⁻¹ de DQO) como substratos. Os rendimentos de produção de H₂ foram de 1,1 e 0,9 mmol.g⁻¹ de DQO para água residuária de parboilização de arroz e vinhaça, respectivamente.

Lazaro (2012) estudou a produção de hidrogênio a partir de vinhaça da cana-de-açúcar, utilizando reatores em batelada. O inóculo utilizado foi oriundo de lodo granulado de reator anaeróbio e de consórcio de bactérias mesofílicas produtoras de hidrogênio, ambos os consórcios submetidos ao pré-tratamento térmico (90°C por 10 minutos). A produção de hidrogênio foi avaliada a partir de diferentes concentrações de vinhaça a 37°C e 55°C. O potencial de produção do gás aumentou de 4,3 mmol para 28,4 mmol de H₂ com o aumento da concentração da DQO de vinhaça de 2 para 12 g.L⁻¹, em temperatura mesofílica (37°C). Em

temperatura termofílica (55°C), também foi observada produção de hidrogênio em todas as concentrações de vinhaça utilizadas, sendo que o potencial de produção de hidrogênio (5 e 6,7 mmol de H₂ para 2 e 12 g.L⁻¹ de DQO de vinhaça, respectivamente) foi menor que o observado para os ensaios a 37°C.

De acordo com Das (2009), os relatos das velocidades de produção H₂, estabilidade e eficiência desses processos estão muito aquém para a comercialização. O maior gargalo dos processos de produção para a comercialização do biohidrogênio é a utilização de estirpes microbianas capazes de degradar diferentes substratos carbonáceos presentes nos resíduos, gerando grandes quantidades de H₂.

3.2. Resíduos de celulose como substrato

A biomassa, como um produto da fotossíntese, é o recurso renovável mais versátil que pode ser utilizado para a produção sustentável de hidrogênio (NATH, DAS, 2003). A utilização destes materiais é uma opção econômica, ambientalmente correta e sustentável para produção de hidrogênio. Todavia, para a utilização desse resíduo, necessita-se, ainda, de muito entendimento e a busca de bactérias celulolíticas provenientes de diferentes inóculos, com a finalidade de obter a hidrólise da celulose em açúcares solúveis. Isso pode ser obtido a partir da adição de enzimas, por conseguinte, até certo ponto inviável economicamente (CHENG, CHANG, 2011).

As fontes de energia de biomassa mais importantes são as seguintes: madeira e resíduos de madeira, resíduos agrícolas e seus subprodutos, resíduos sólidos urbanos, resíduos de processamento de alimentos, plantas aquáticas e algas (BALAT, KIRTAY, 2010).

A produção de hidrogênio a partir dessa biomassa é economicamente competitiva cujas vantagens são as seguintes: (i) independência de importação de petróleo, (ii) produto líquido, o biogás, permanece dentro do país, (iii) nível estável de preços e (iv) o balanço de CO₂ pode ser melhorada em cerca de 30% (DEMIRBAS, 2008).

A estrutura química e os principais componentes orgânicos da biomassa celulósica são extremamente importantes no desenvolvimento de processos para a produção de combustíveis e de produtos químicos derivados. A composição química da biomassa varia muito mas, em geral, a celulose é o principal constituinte (BALAT, 2009).

Por causa da dificuldade de hidrólise da celulose, o uso da biomassa como substrato para produção de H₂ tem sido limitado (LYND et al., 2002) e em poucos estudos é elucidado o entendimento do processo (GADOW, 2013).

A celulose é um polímero linear constituído por unidades D-glicose unidas entre si por ligações glicosídicas β (1 \rightarrow 4) (ZHANG, LYND, 2004). Esta estrutura (Figura 3.2) possibilita a formação de ligações de hidrogênio intra e intermoleculares, acarretando na agregação das cadeias celulósicas em “fibras elementares” com alto grau de cristalinidade. Estes agregados conferem elevada resistência à tensão, tornando a celulose insolúvel em grande número de solventes e explica, pelo menos em parte, a sua resistência à degradação microbiana (ZHANG et al., 2006; DEMAIN, 2009; CANILHA, et al., 2012).

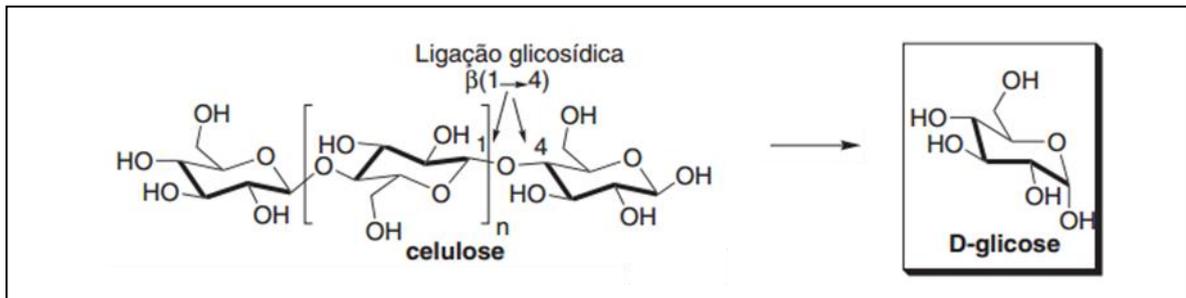


Figura 3.2: Estrutura química da celulose (modificado de FERREIRA et al., 2009).

Uma das características mais importantes da celulose como substrato para os microrganismos é a sua insolubilidade. Sendo assim, a degradação deste polímero ocorre fora da célula, em associação com o envelope celular ou extracelular. Uma vez que os produtos da degradação da celulose estejam disponíveis como fonte de carbono, eles podem ser utilizados por outros microrganismos que habitam o mesmo ambiente formando, desta forma, a base das interações microbianas do meio (LESCHINE, 1995). O mecanismo amplamente aceito para hidrólise enzimática da celulose envolve ações sinérgicas de endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidases (ZHANG, LYND, 2004; WILSON, 2009).

As etapas do processo de hidrólise ocorrem simultaneamente (Figura 3.3). Primeiramente, a hidrólise por endoglucanases e exoglucanases ocorre na superfície do substrato sólido liberando açúcares solúveis, com grau de polimerização superior a 6, para a fase líquida. Esta etapa de despolimerização é o passo limitante para todo o processo de hidrólise de celulose (JOGER et al., 2001; ZHANG et al., 2006). A hidrólise secundária, que ocorre principalmente na fase líquida, envolve a hidrólise de celobiose em glicose por β -glicosidases (ZHANG et al., 2006). A ação das enzimas β -glicosidases, além de finalizar a despolimerização, também contribui para a taxa global do processo consumindo a celobiose, que é um inibidor de endo e exoglucanases (OLSEN et al., 2010).

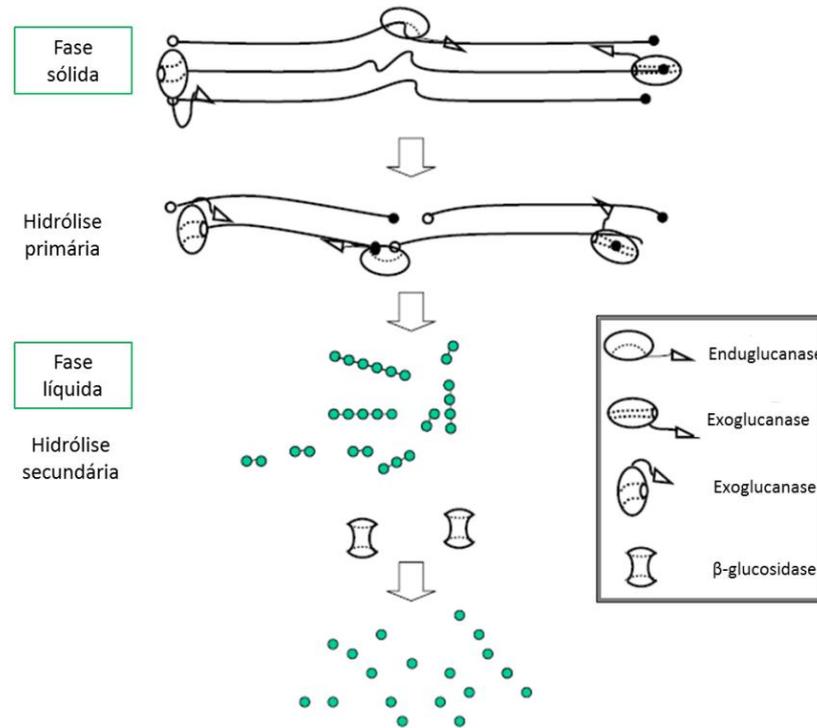


Figura 3.3: Esquema da hidrólise enzimática da celulose (modificado de ZHANG et al., 2006).

Microrganismos produtores de celulases são encontrados em diversos grupos taxonômicos, em sua maioria bactérias e fungos. Tais microrganismos desempenham papel importante na biosfera e fazem parte do ciclo do carbono por meio da reciclagem da celulose (BÉUIN, AUBERT, 1994).

Muitas bactérias são capazes de promover a bioconversão dos substratos celulósicos em unidades de fácil assimilação para seu metabolismo. É provável que alguns dos polímeros diferentes que se encontram presentes nas paredes das células das plantas sejam degradados por diferentes microrganismos (WILSON, 2011). Lynd et al. (2002) relatam a capacidade celulolítica de três grupos fisiológicos principais do domínio *Bacteria*: (i) bactérias anaeróbias fermentativas e Gram-positivas (*Clostridium*, *Ruminococcus* e *Caldicellulosiruptor*) e Gram negativas (*Butyrivibrio*, *Acetivibrio* e *Fibrobacter*); (ii) bactérias Gram-positivas aeróbias (*Cellulomonas* e *Thermobifida*); e (iii) outras bactérias aeróbias (*Cytophaga* e *Sporocytophaga*). Além destas bactérias, destacam-se como produtoras de celulases: *Cellulosimicrobium cellulans* (LO et al., 2009); *Bacillus* sp. (SUTO, TOMITA, 2001) e *Pseudomonas* sp. (CHENG, CHANG, 2011). Não há citações de microrganismos celulolíticos do domínio *Archaea*.

Diferentemente da degradação aeróbia da celulose, uma comunidade fisiologicamente diversa é responsável pela degradação anaeróbia desse composto (Figura 3.4). Por meio do

processo fermentativo ocorre a formação de CO_2 , H_2 , ácidos orgânicos e álcoois. O H_2 é utilizado pelos microrganismos homoacetogênicos e metanogênicos na produção de acetato e CH_4 , respectivamente. As bactérias acetogênicas fermentam ácidos orgânicos, como ácido propiônico e butírico, além de álcoois, e produzem ácido acético, CO_2 e H_2 . Estas bactérias acetogênicas crescem muito lentamente e a fermentação de ácidos orgânicos é usualmente a etapa limitante na degradação anaeróbia da celulose (LESCHINE, 1995).

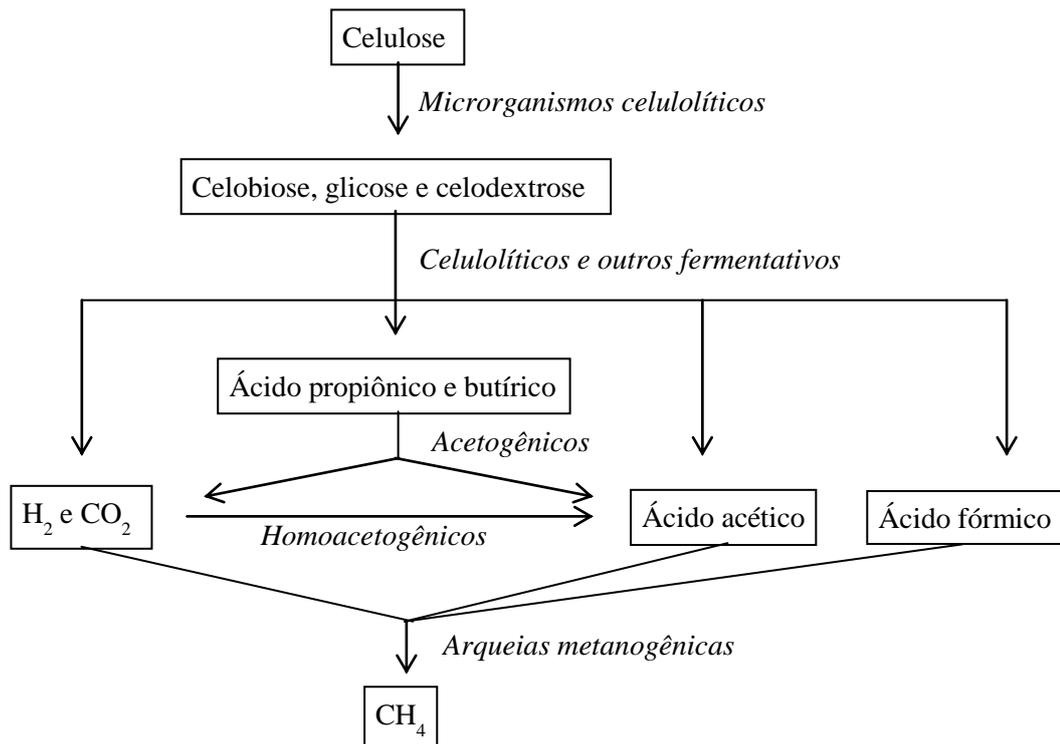


Figura 3.4: Diagrama representando a degradação anaeróbia da celulose (modificado de LESCHINE, 1995).

Para a produção de H_2 a partir da hidrólise e fermentação da celulose, a utilização de inóculos mistos têm sido considerada por conter maior variedade de microrganismos e maior potencial de obter bactérias celulolíticas e fermentativas em sinergismo (CHU et al., 2011). Além disso, o uso de culturas mistas e naturais torna o processo mais simples, sob o ponto de vista da operação e controle, além de permitir a utilização de uma fonte mais ampla de substratos (LAY, 2001).

3.3. Produção biológica de H_2 a partir de resíduos de celulose

Analisando os resultados das pesquisas pode-se observar que ainda não há um acordo sobre as condições ideais de pH, temperatura, requerimentos nutricionais para a produção

biológica de H₂ a partir de celulose. Como inóculo, em algumas pesquisas de produção de H₂ foram considerados o uso de culturas mistas (LIN, HUNG, 2008; REN et al. 2010), co-cultivos com culturas puras (GENG et al., 2010), adição de celulase exógena (RATTI et al., 2013) e também a separação da hidrólise da celulose e fermentação dos açúcares solúveis (LAKSHMIDEVI, MUTHUKUMAR, 2010; CHENG, CHANG, 2011) (Tabela 3.2).

Tabela 3.1: Comparação dos rendimentos de produção de H₂ a partir de substratos celulósicos e diferentes fontes de inóculo

Inóculo	Substrato (g.L ⁻¹)	T (°C)	pH	Rendimento de H ₂	Referência
Lodo anaeróbio	Celulose 12,5	37	7	2,2 mmol.g ⁻¹ de celulose	Lay, 2001
Esterco de gado	Celulose 10	55	7,8	2,8 mmol.g ⁻¹ de celulose	Lin, Hung, 2008
Co-cultivo de <i>C.acetobutylicum</i> e <i>E.harbinense</i>	Celulose 10	37	5	8,1 mmol.g ⁻¹ de celulose	Wang et al., 2008
Esterco de gado	Celulose 10	37	6,8	5,6 mmol.g ⁻¹ de celulose	Ren et al., 2010
Co-cultivo de <i>C.thermocellum</i> e <i>C.thermopalmarium</i>	Papel de filtro 4,5	55	5,8	1,4 mol.mol ⁻¹ de glicose	Geng et al., 2010
Hidrólise por <i>T.reesei</i> e fermentação por <i>E.aerogens</i>	Efluente industrial 22	35	7	2,0 mol.mol ⁻¹ de açúcares	Lakshmi devi, Muthukumar (2010)
Hidrólise por <i>Pseudomonas</i> sp. e fermentação por <i>Clostridium pasteurianum</i>	Bagaço de cana 17	37	6	0,96 mol.mol ⁻¹ de glicose	Cheng, Chang (2011)
Lixiviado + celulase	Celulose 10	37	7	12,6 mmol H ₂ .g ⁻¹ de celulose	Ratti et al., 2013

Lay (2001) estudou a produção de H₂ a partir de diferentes concentrações de celulose (12,5 a 50,0 g.L⁻¹ de celulose) e inóculo misto de digestor anaeróbio. O reator em batelada foi operado a 37°C e pH inicial de 7,0. O inóculo foi submetido ao pré-tratamento térmico que suprimiu, eficientemente, as bactérias hidrogenotróficas. O melhor rendimento de produção de H₂ (2,18 mmol.g⁻¹ de celulose) foi obtido com 12,5 g.L⁻¹ de celulose.

Lin e Hung (2008) optaram pelo uso de um inóculo microbiano misto obtido de esterco de gado para produção de H₂ a partir de celulose em reatores em batelada. O experimento foi conduzido a 55°C e valores de pH de 5,5 a 9,0 foram testados. O inóculo foi cultivado em meio de enriquecimento por quatro dias. Este procedimento foi mais eficiente para favorecimento das bactérias produtoras de H₂ e inibição das arqueias metanogênicas do

que o pré-tratamento térmico. O pH que melhor favoreceu o cultivo das bactérias produtoras de H₂ foi entre 7,6 a 8,0. O rendimento de H₂ obtido sob estas condições e com 10 g.L⁻¹ de celulose foi de 2,8 mmol H₂.g⁻¹ de celulose. A diversidade de bactérias do inóculo obtido nos reatores foi analisada por PCR/DGGE e algumas bandas do gel de DGGE foram recortadas, clonadas e sequenciadas. Foi constatada similaridade com os gêneros *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Clostridium* e *Streptococcus*.

Wang et al. (2008) relataram rendimento de 8,1 mmol de H₂.g⁻¹ de celulose, para tanto, os autores utilizaram co-cultivo de *Clostridium acetobutylicum* X9 com *Ethanoigenens harbinense* B49 em reatores em batelada operados a 37°C e pH 5,0. Quando utilizaram apenas *C. acetobutylicum* X9 para produção de H₂ a partir de 10,0 g.L⁻¹ de celulose, o rendimento foi de 3,6 mmol de H₂.g⁻¹ de celulose.

Diferentes concentrações de celulose (5, 10, 15, 20 e 25 g.L⁻¹) foram estudadas para produção de H₂ com cultura mista enriquecida de esterco de gado como inóculo (Ren et al., 2010). A produção de H₂ foi avaliada em reatores em batelada, a 37°C e pH 6,8. A produção cumulativa de H₂ foi crescente de 828,0 mL com 5 g.L⁻¹ para 1.251,0 mL com 10 g.L⁻¹ de celulose, sendo que concentrações maiores de celulose não resultaram em maior concentração de H₂. O maior rendimento obtido por estes autores foi de 5,6 mmol H₂.g⁻¹ de celulose com 10,0 g.L⁻¹ de celulose. Por meio do uso de inóculo obtido a partir de esterco de gado verificou-se a conversão de celulose em H₂. Além disso, quando foi realizado o enriquecimento da cultura ocorreu a eliminação de bactérias hidrogenotróficas sem a necessidade de pré-tratamentos.

O uso de co-cultivo de *Clostridium thermocellum*, que é uma bactéria celulolítica e produtora de H₂, com *C. thermopalmarium*, não celulolítica e produtora de H₂, foi considerado por Geng et al. (2010) para produção de H₂ em reatores em batelada, operados a 55°C e pH 5,8. Os autores relataram rendimento de 1,36 mol H₂.mol⁻¹ de equivalente de glicose a partir de 4,5 g.L⁻¹ de papel de filtro.

Lakshmi e Muthukumar (2010) optaram por separar o processo de produção de H₂ a partir de celulose em duas etapas: a hidrólise enzimática do efluente de indústria de papel e celulose e posterior produção de hidrogênio a partir do hidrolisado. Para a hidrólise enzimática foi utilizada celulase obtida de *Trichoderma reesei*, o qual foi cultivado em reatores em batelada, a 29°C com glicose, xilose e arabinose como substratos (22 g.L⁻¹). Para fermentação do hidrolisado (com 22 g.L⁻¹ de açúcares), os autores utilizaram cultura pura de *Enterobacter aerogenes* em reatores em batelada operados a 35°C e pH 7,0 e obtiveram rendimento máximo de 2,03 mol H₂/mol açúcar.

Cheng e Chang (2011) também optaram pela produção de hidrogênio a partir de materiais celulósicos com a hidrólise e fermentação acontecendo separadamente. Os autores utilizaram bagaço de cana-de-açúcar como substrato, o qual foi hidrolizado por *Pseudomonas* sp. A hidrólise foi conduzida a 45°C e pH 6,0 e, após 162 horas, o hidrolisado consistia de 13,2 g.L⁻¹ de glicose e 3,8 g.L⁻¹ de xilose. Posteriormente, o substrato hidrolizado foi submetido a fermentação em reatores de batelada a 37°C e pH 6,0 com *Clostridium pasteurianum*. O rendimento obtido foi de 0,96 mol H₂.mol⁻¹ de glicose.

Ratti et al. (2013) estudaram a produção de H₂ a partir de diferentes concentrações de celulose (2,5, 5,0 e 10,0 g.L⁻¹) em reatores em batelada e lixiviado como inóculo acrescido de celulase comercial, a 37°C e pH 7,0. Os autores obtiveram para 10 g.L⁻¹ de celulose, rendimento de 12,6 mmol de H₂.g⁻¹ de celulose. Tal resultado foi atribuído à adição da enzima celulase que potencializou a utilização da celulose como substrato para produção de H₂. Bactérias fermentativas similares a *Clostridium* sp foram identificadas por meio da clonagem e sequenciamento do gene RNAr 16S.

Conforme apresentado nesta revisão, diversas pesquisas têm sido realizadas a partir de substratos celulósicos com resultados significativos de produção de H₂. Para tanto, os pesquisadores têm considerado o uso de culturas puras como inóculo, co-cultivos e adição de celulase. Com base nestes estudos, neste trabalho objetivou-se a produção de H₂, com celulose como substrato, porém sem enzimas exógenas para potencializar a hidrólise da celulose e sem pré-tratamentos do inóculo a fim de não eliminar bactérias celulolíticas.

Para isso, buscou-se uma fonte de inóculo diferente daquelas já estudadas no grupo de pesquisa do LPB, ou seja, um inóculo oriundo da ETE de uma indústria de papel e celulose. A produção de H₂ a partir de celulose como substrato, mesmo sem grandes valores de rendimentos de H₂, já pode ser considerado resultado satisfatório para o grupo de pesquisa, o que significa a manutenção e atividade de bactérias celulolíticas em um inóculo também fermentativo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Esquema operacional

O trabalho foi dividido em duas etapas diferentes e subsequentes (Figura 4.1): (1) definição do meio de cultivo e (2) ensaios de produção de hidrogênio a partir de diferentes concentrações de celulose. Cada etapa foi procedida de reativação do inóculo objetivando enriquecimento das populações de bactérias do inóculo.

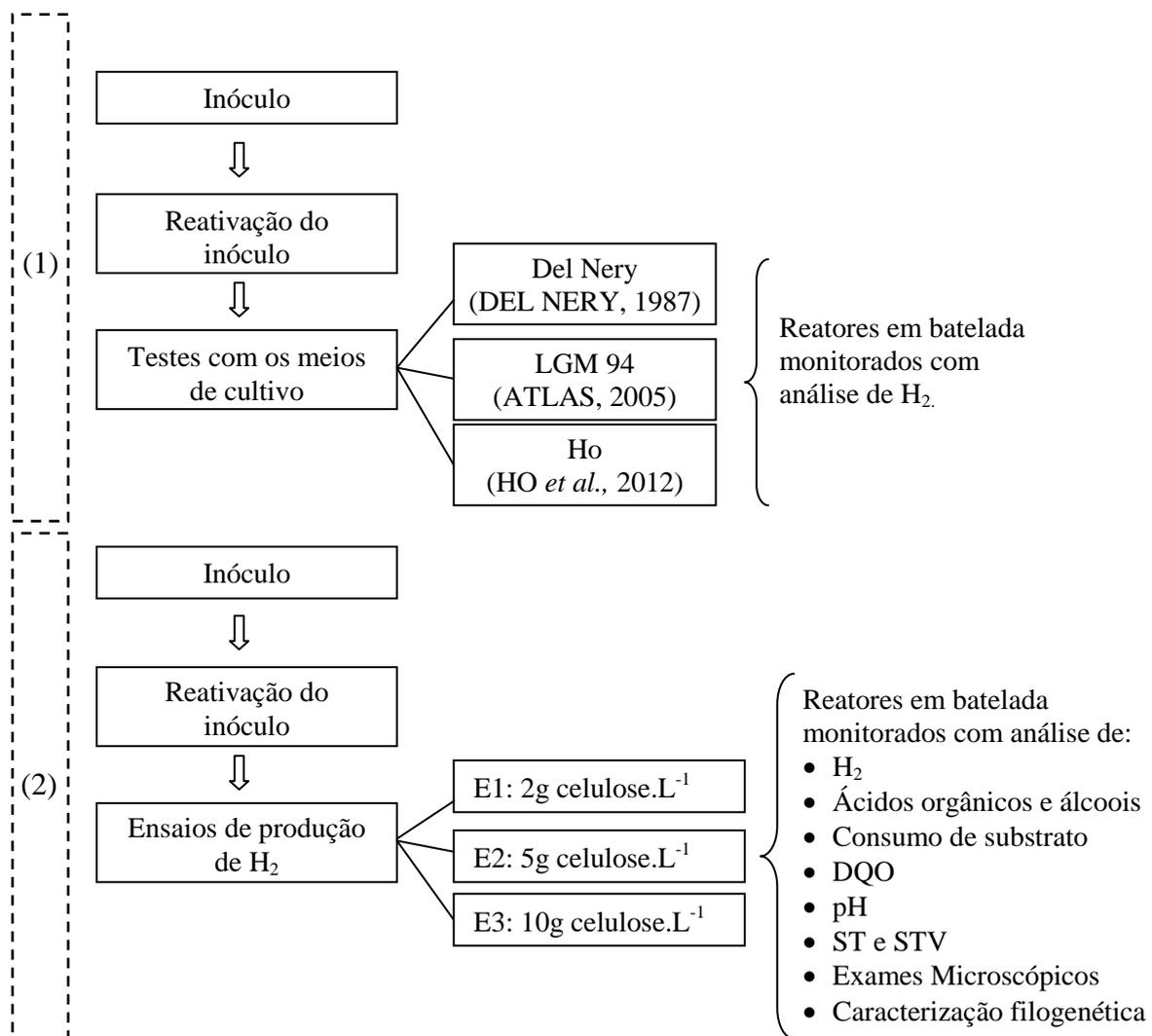


Figura 4.1: Fluxograma experimental.

4.2. Substrato

Celulose microcristalina em pó com partículas com 20µm (Sigma-Aldrich) foi usada como substrato nos reatores anaeróbios em batelada para avaliar a produção de hidrogênio.

4.3. Inóculo

O inóculo utilizado nos ensaios foi proveniente do lodo da Lagoa Aerada Facultativa da Estação de Tratamento de Efluentes (ETE) da Indústria Suzano Papel e Celulose S.A., localizada em Limeira, SP. Essa ETE é composta por sistemas de Lagoas Aeradas Facultativas onde ocorre sedimentação parcial de lodo no fundo da lagoa, processando uma fase anaeróbia (MINEGATTI, 2010).

O lodo foi coletado no fundo da lagoa anaeróbia com amostrador de sedimentos, transferido para frascos plásticos de 5 L e acondicionados em caixa térmica com gelo reciclável, durante o transporte. Uma vez no laboratório, o lodo foi estocado sob refrigeração a 4°C.

4.4. Reativação do inóculo

Antes da montagem dos reatores de produção de hidrogênio, o inóculo era submetido a reativação em meio de cultivo rico em nutrientes (HO et al., 2012) (Tabela 4.1) com a finalidade de permitir o enriquecimento de todas as populações bacterianas do inóculo. Para tanto, o meio de cultivo foi preparado em água previamente fervida e submetida à atmosfera de N₂/CO₂ (70%/30%), durante 20 minutos. Após a água esfriar e atingir temperatura de 37°C, os componentes do meio de cultivo eram adicionados e homogeneizados e o pH ajustado para 6,8 com soluções de HCl 1M ou NaOH 1M.

Tabela 4.1: Composição do meio de enriquecimento.

Composição	Concentração (g.L ⁻¹)
Glicose	10
Extrato de levedura	10
Triptona	5
Água ultra-purificada	1000 mL

O meio de cultivo era, então, acondicionado em Frascos de Duran[®] mantendo-se 40% de meio reacional e 60% de *headspace*. Adicionou-se 10% do volume do meio reacional de inóculo e, após a inoculação, os reatores eram submetidos à atmosfera gasosa de N₂/CO₂ (70%/30%), durante 20 minutos, de forma a manter o ambiente anaeróbio. Após a troca gasosa, os reatores foram fechados com tampa de butila e rosca plástica e incubados a 37°C.

O crescimento celular foi monitorado indiretamente com análises diárias de H_2 até a constatação da fase exponencial de crescimento.

Constatado o início da fase exponencial, que aconteceu com seis dias, o ensaio de reativação foi finalizado e o inóculo foi centrifugado e utilizado nos ensaios seguintes, tanto de escolha do meio de cultivo quanto de produção de H_2 .

4.5. Ensaio para escolha do meio de cultivo

Três meios de cultura foram avaliados visando escolher aquele que melhor favorecesse o crescimento de bactérias celulolíticas e fermentativas. Os seguintes meios de cultura foram testados: LGM 94 (ATLAS, 2005), Del Nery (DEL NERY, 1987) e Ho (HO et al., 2012) (Tabela 4.2).

Tabela 4.2: Composição dos meios de cultivo, LGM 94, Del Nery e Ho.

Composição	LGM 94 (g.L ⁻¹)	Del Nery (g.L ⁻¹)	Ho (g.L ⁻¹)
Ácido aminobenzóico	-	0,00004	-
Ácido nitrilotriacético	0,015	-	-
Biotina	-	0,00001	-
CaCl ₂	-	-	0,04
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,061	0,00412	-
COCl ₂ .6H ₂ O	0,001	0,00008	-
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,0001	-	-
Extrato de levedura	1,0	-	0,5
FeCl ₃	-	-	0,02
FeCl ₃ .6H ₂ O	-	0,0005	-
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,021	0,005	-
H ₃ BO ₃	0,0001	-	-
K ₂ HPO ₄	0,296	0,0026	8,6
KAl(SO ₄) ₂ .12H ₂ O	0,0001	-	-
KCl	-	-	0,02
KH ₂ PO ₄	0,18	0,01072	4,2
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,12	-	0,04
MnSO ₄ .H ₂ O	0,005	-	-
Na ₂ HPO ₄ .H ₂ O	-	0,00552	-
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,0001	-	-
NaCl	0,01	-	-
NaHCO ₃	2,1	-	-
NH ₄ Cl	0,68	-	2,0
NH ₄ SO ₄	0,15	-	-
NiSO ₄ .6H ₂ O	-	0,001	-
SeO ₂	-	0,0003	-
Triptona	1,0	-	-
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,001	-	-
Celulose	2,0	2,0	2,0
Solução de vitaminas 1	-	1 mL	-
Solução de vitaminas 2	5 mL	-	-
Solução de vitamina B12	-	1 mL	-

Os três meios de cultivo foram preparados no momento da inoculação e não foram submetidos à esterilização. Para o preparo dos meios foi utilizada água previamente fervida, mantida à atmosfera de N₂/CO₂ (70%/30%) por 20 minutos e resfriada a 37°C.

Os reatores anaeróbios foram montados em frascos de Duran[®] de 1L e a celulose foi adicionada em cada frasco antes do meio de cultivo e do inóculo, garantindo assim a correta concentração em cada reator.

O meio de cultivo LGM 94 (ATLAS, 2005) foi modificado pela adição de extrato de levedura e triptona (conforme Chu et al., 2011) e exclusão de resazurina e cisteína HCl. Para o preparo de 1 L de meio adicionou-se ácido nitriloacético em 0,5 L de água e ajustou-se o pH para 6,5 com NaOH 1M, a fim de solubilizar o sulfato de ferro II (FeSO₄.7H₂O). Os demais componentes e o restante da água, com exceção da solução de vitaminas, foram adicionados e o pH ajustado para 6,8 com soluções de HCl 1M ou NaOH 1M. Assepticamente, adicionou-se 5,0 mL da solução de vitaminas 2. Quinhentos mililitros do meio de cultivo foram transferidos para frascos de Duran[®] de 1L que foram mantidos fechados até o momento da inoculação.

A solução de vitaminas 2 do meio de cultivo LGM 94 (ATLAS, 2005) foi preparada dissolvendo-se os componentes listados na Tabela 4.3 em água ultra-purificada. A solução resultante foi esterilizada por filtração em membrana *Millipore* com membrana de poro 0,22 µm, previamente esterilizada em autoclave a 121°C, 1 atm por 20 minutos. Depois de esterilizada, a solução foi distribuída em frascos de antibióticos (30 mL), sob fluxo de N₂ (100%) e condições assépticas. Os frascos foram fechados com tampas de butila, lacrados e armazenados sob refrigeração a 4°C.

Tabela 4.3: Composição da Solução de vitaminas 2.

Composição	Concentração (mg.L ⁻¹)
Piridoxina-HCl	10,0
DL - pantotenato de cálcio	5,0
Ácido lipóico	5,0
Ácido nicotínico	5,0
Ácido p-aminobenzóico	5,0
Riboflavina	5,0
Tiamina-HCl	5,0
Biotina	2,0
Ácido fólico	2,0
Vitamina B12	0,1
Água ultra-purificada	1000 mL

Fonte: Atlas (2005)

O meio de cultivo Del Nery (DEL NERY, 1987) foi preparado adicionando-se os componentes em água, com exceção das soluções de vitamina 1 e vitamina B12. O pH foi corrigido para 6,8 com soluções de HCl 1M e NaOH 1M e, então, adicionou-se assepticamente as soluções de vitaminas. Quinhentos mililitros do meio de cultivo foram transferidos para frascos de Duran[®] de 1L que foram mantidos fechados até o momento da inoculação.

A solução de vitaminas 1 foi preparada de acordo com Widdel e Pfennig (1984), dissolvendo-se 10 mg de solução de biotina e 40 mg de ácido *p*-aminobenzóico em água ultra-purificada. A solução resultante foi esterilizada por filtração em membrana *Millipore* com membrana de poro 0,22 µm, previamente esterilizada em autoclave a 121°C, 1 atm por 20 minutos. Depois de esterilizada, a solução foi distribuída em frascos de antibióticos (30 mL), sob fluxo de N₂ (100%) e condições assépticas. Os frascos foram fechados com tampas de butila, lacrados e armazenados sob refrigeração a 4°C.

Para a solução de vitamina B12 do meio de cultivo Del Nery (DEL NERY, 1987), dissolveu-se 8 mg desse reagente em 200 mL de água ultra-purificada. A solução foi esterilizada por filtração em membrana *Millipore* com membrana de poro 0,22 µm, previamente esterilizada em autoclave a 121°C, 1 atm por 20 minutos. Depois de esterilizada, a solução foi distribuída em frascos de antibióticos (30 mL), sob fluxo de N₂ (100%) e condições assépticas. Os frascos foram fechados com tampas de butila, lacrados e armazenados sob refrigeração a 4°C.

O meio de cultivo Ho (HO et al., 2012) foi preparado com a solubilização dos componentes em água previamente fervida, mantida à atmosfera de N₂/CO₂ (70%/30%) por 20 minutos e resfriada a 37°C e o pH foi ajustado para 6,8 com soluções de HCl 1M e NaOH 1M. Quinhentos mililitros do meio de cultivo foram transferidos para frascos de Duran[®] de 1L que foram mantidos fechados até o momento da inoculação.

Após o preparo de cada meio de cultivo procedeu-se à inoculação. Cinquenta mililitros do inóculo foram centrifugados durante oito minutos, a 4°C e 8500 rpm (RATTI et al., 2013). O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi cuidadosamente ressuspendido com o próprio meio de cultivo e adicionado no reator.

Após a inoculação, os reatores foram submetidos por 20 minutos em atmosfera gasosa de N₂/CO₂ (70%/30%) e foram fechados com tampa de butila e rosca plástica e incubados a 37°C (Figura 4.2). Para cada meio de cultivo foram montados reatores em triplicatas, os quais foram monitorados diariamente com análise de produção de hidrogênio (cromatografia gasosa).

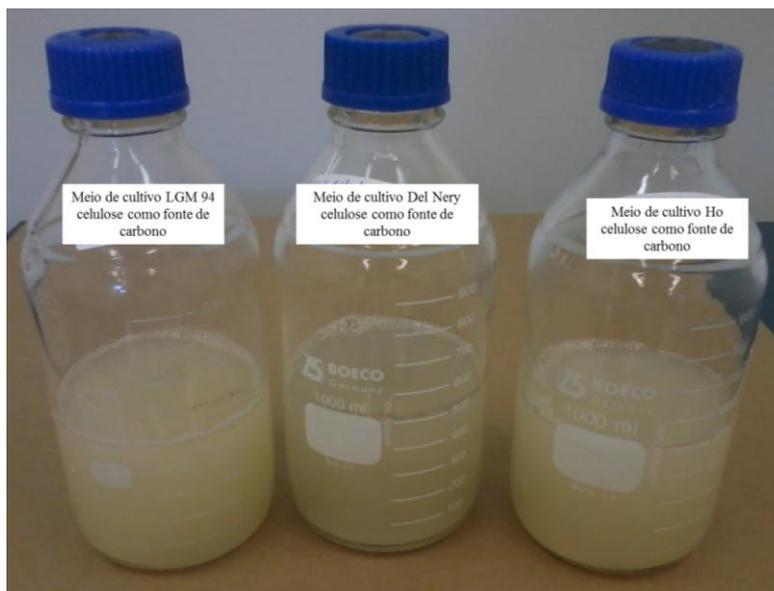


Figura 4.2: Reatores anaeróbios em batelada.

4.6) Ensaios para produção de H₂ a partir de celulose

Três ensaios foram realizados em triplicatas de reatores anaeróbios em batelada para produção de hidrogênio com diferentes concentrações de celulose, E1 com 2,0 g.L⁻¹ de celulose, E2 com 5,0 g.L⁻¹ de celulose e E3 com 10,0 g.L⁻¹ de celulose e meio de cultivo LGM 94 (ATLAS, 2005) modificado.

Os ensaios foram realizados em frascos de Duran[®] de 1L, sendo 500 mL de volume reacional e 500 mL de *headspace* (N₂/CO₂ – 70%/30%). Aos frascos de Duran[®] foram adicionados em ordem: 1) respectiva concentração de celulose de cada ensaio, 2) 500 mL de meio de cultivo LGM 94 (ATLAS, 2005), com pH inicial de 6,8, preparado conforme descrito no item 4.5 e 3) inóculo previamente enriquecido e centrifugado (conforme item 4.5).

A proporção A/M foi mantida constante nos três ensaios de produção de H₂ a partir de celulose, afim de que este parâmetro não influenciasse na comparação dos resultados das análises dos reatores. A concentração do inóculo adicionada foi calculada conforme análise de STV (Sólidos Totais Voláteis), obedecendo a proporção 1,4.

Com base em estudos anteriores de produção biológica de H₂ que adicionaram 10% do volume líquido do reator em inóculo (REN et al., 2010; BOTTA et al., 2012; RATTI et al., 2013), no ensaio E1 (2,0 g.L⁻¹ de celulose) esta proporção foi mantida. Ou seja, adicionou-se também 10% (v/v) de inóculo, que correspondeu a 50 mL, e de acordo com a análise de STV (Sólidos Totais Voláteis) obteve-se que este volume correspondia a 1,4 g.L⁻¹. Desta forma, estabeleceu-se a relação A/M (2,0/1,4) de 1,4. Como os demais ensaios possuíam maior

concentração de celulose (alimento), a quantidade de inóculo (microrganismo) adicionada foi maior para manter a relação 1,4 (Tabela 4.4).

Tabela 4.4: Concentração de celulose e de inóculo adotadas nos ensaios para produção de H₂

Ensaio	Meio de cultivo	Temperatura	Celulose (g.L ⁻¹)	Inóculo (g.L ⁻¹)
E1	LGM 94 modificado	37°C	2,0	1,4
E2			5,0	3,4
E3			10,0	6,9

Os reatores foram incubados a 37°C e monitorados com análises de carboidratos, DQO, pH, ST, STV, sulfeto, cromatografia gasosa, cromatografia líquida, e análises microbiológicas. Para as análises realizadas no meio líquido, as amostras foram previamente filtradas em membrana de acetato de celulose com poro de 0,2 mm.

Além dos três ensaios de produção de H₂, foi conduzido um ensaio controle submetido às mesmas condições operacionais dos ensaios de produção de H₂ com celulose. Entretanto, no ensaio controle não foi adicionada celulose a fim de averiguar se a tripton e o extrato de levedura adicionados no meio de cultivo serviriam de substrato para a fermentação. Os resultados das análises de carboidratos do ensaio controle foram descontados dos resultados dos ensaios de produção de H₂, uma vez que estes carboidratos não foram oriundos da degradação da celulose.

4.7. Análise de carboidratos

Análises em duplicatas de amostras dos reatores em batelada foram realizadas indiretamente por meio do método de fenol-ácido sulfúrico de Dubois et al. (1956), adaptado por Herbert et al., (1971), utilizando glicose como padrão.

4.8. Análises físico-químicas

As análises de demanda química de oxigênio (DQO), sólidos totais (ST), sólidos totais voláteis (STV), sulfeto (H₂S) e a aferição do pH foram realizadas segundo Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 2005). Todas essas análises foram realizadas em duplicatas.

4.9. Análises Cromatográficas

A composição do biogás no *headspace* foi determinada por cromatografia gasosa. O equipamento utilizado foi da marca Shimadzu, modelo GC-2010 com detector de condutividade térmica (TCD). O sistema utilizava gás argônio como carreador. As

temperaturas de operação do injetor, do detector e da coluna foram de 30°C, 200°C e 300°C, respectivamente. A amostra (0,5 mL) foi retirada dos reatores pressurizados com auxílio de uma seringa *gastight* com trava.

A determinação de ácidos voláteis e álcoois foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando-se cromatógrafo SHIMADZU® equipado com bomba LC-10ADVP, amostrador automático SIL-20A HT, forno CT-20^a, dois detectores ligados em série, sendo um detector ultra-violeta com arranjo de diodos do modelo SDP-M10 e outro detectos por índice de refração RID-10A, além do controlador SCL-10AVP. A coluna utilizada foi AMICEX® HPX-87H (300 mm x 7,8 mm, BioRad) e software Class-VP (SHIMADZU®) para analisar os resultados. Os ácidos foram detectados pelo SDP-M10 AVP e os álcoois pelo RID-10A. Foi utilizado ácido sulfúrico 0,005M como fase móvel e as condições operacionais da coluna foram fluxo de 0,5mL.min⁻¹ e 43°C. Para o preparo da amostra, anteriormente à injeção no cromatógrafo, 80 µL de ácido sulfúrico 2M foi adicionado à 2,0 mL da amostra a ser analisada e esta solução foi filtrada em membrana de acetato de celulose com poro de 0,2 mm.

As análises foram realizadas em duplicata.

4.10. Análises microbiológicas

4.10.1. Exames Microscópicos

Os exames microscópicos foram realizados por meio de luz comum em microscópio Olympus BX60-FLA, com amostra a fresco, com amostra submetida a coloração de Gram (DSM, 1991) e coloração de endósporos pela técnica de Wirtz-Conklin (modificada por SCHAEFFER, MACDONALD, 1933).

4.10.2. PCR/DGGE

A avaliação da similaridade da comunidade microbiana do Domínio *Bacteria* e *Archaea* foi realizada pela técnica do PCR/DGGE com amostra proveniente de reator de reativação e dos reatores de produção de hidrogênio.

Para tanto, foi realizada a extração do DNA conforme Griffiths et al. (2000). A partir do DNA extraído das amostras, foi realizada a amplificação através da reação de polimerização em cadeia (PCR) com *primers* específicos 968FGC-1401R (NUBEL et al., 1996) para *Bacteria* e 1100 FGC-1400R (KUDO et al., 1997) para *Archaea*. As condições de amplificação utilizadas para a PCR estão descritas na Tabela 4.5.

Tabela 4.5: Condições utilizadas na PCR.

<i>Primer</i>	Pré-Desnaturação	Nº de ciclos	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Final da extensão	Resfriamento
968FGC-1401R	94°C/5 mim	35	94°C/45 seg	55°C/45 seg	72°C/60 seg	72°C/5 min	4°C
1100FGC-1400R	94°C/5 mim	35	94°C/60 seg	55°C/60 seg	72°C/60 seg	72°C/7 min	4°C

Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de gradiente desnaturante – DGGE. Esta técnica permite a separação dos fragmentos de DNA de mesmo tamanho, porém com sequência de nucleotídeos diferentes. A separação desses fragmentos ocorre de acordo com o grau de desnaturação da dupla hélice de DNA, sob ação de géis de poli(acrilamida com gradiente crescente do agente desnaturante. Neste estudo, o gel foi preparado com gradiente desnaturante (formamida e uréia) nas concentrações de 45% e 65%. O sistema utilizado foi *DGGE D Code™ – Universal Mutation Detection System* (Bio Rad, Inc., Hercules, California). As condições durante a eletroforese foram: temperatura constante de 60°C, 75 V por 16 horas. O gel foi corado com solução TAE 1X (tampão Tris-Acetato-EDTA) contendo 1 g.mL⁻¹ de brometo de etídeo por 10 minutos. O aparelho utilizado para leitura do padrão de bandas do gel foi transiluminador UV (Stratagene – Eagle Eye TM III), sob exposição a luz UV (254 nm). O dendograma foi construído usando software Bionumerics versão 2.5, com coeficiente de similaridade de Correlação de Pearson.

4.10.3. Clonagem e sequenciamento do gene RNAr 16S

A clonagem e sequenciamento da população bacteriana foi realizada ao final do experimento com amostras do ensaio E2 (5,0 g.L⁻¹ de celulose. O DNA foi extraído segundo protocolo de Griffiths et al. (2000). Os fragmentos do gene RNAr 16S foram obtidos pela amplificação por PCR, usando como molde o DNA genômico extraído diretamente da amostra. Os *primers* utilizados para a reação de PCR foram 27F e 1492R (BLACKALL, 1994) e as condições de amplificação utilizadas para a PCR estão descritas na Tabela 4.6.

Tabela 4.6: Condições utilizadas na PCR

<i>Primer</i>	Pré-Desnaturação	Nº de ciclos	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Final da extensão	Resfriamento
27F 1492R	94°C/5 mim	30	94°C/60 seg	50°C/45 seg	72°C/105 seg	72°C/7 min	4°C

Na clonagem foi usado o vetor plasmidial pGEM e os produtos da PCR, a transformação foi em células competentes de *E. coli*. Primeiramente, procedeu-se a adenilação dos fragmentos, utilizando 3 μL do produto da PCR, 1 μL de tampão MgCl_2 , 1 μL de dATP, 1 μL de Taq polimerase e 4 μL de água ultra-purificada e esterilizada, depois de homogeneizados foram incubados a 70°C por 30 minutos.

Para ligação do DNA ao vetor pGEM foram utilizados 5 μL de Rapid Ligation Buffer 2X, 1 μL de vetor pGEM, 2 μL do produto de PCR adenilado, 1 μL T4 DNA ligase e 1 μL de água ultra-purificada e esterilizada, depois de homogeneizados foram incubados a temperatura ambiente por uma hora.

Para realização da transformação, 2 μL do produto da ligação foram misturados com as células competentes, que se encontravam em banho de gelo. As células (em tubos de ensaio) foram aquecidas em banho-maria a 42°C durante 50 segundos, sem agitação. Posteriormente, o tubo foi agitado manualmente e mantido em banho de gelo por dois minutos, seguido da adição de 200 μL de meio Lauria-Bertani (LB). Após a adição do meio de cultivo, foram incubados por 45 minutos, sob agitação (150 rpm).

Após este período, 50, 100, 120, 150 μL do produto de transformação foram semeados em placas de Petri, contendo meio de cultivo LB sólido acrescido de antibiótico, indutor e substrato de β -galactosidase (Tabela 4.7). As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas.

Tabela 4.7: Componentes adicionados ao meio de cultivo LB para o plaqueamento de *E.coli* transformadas

Componentes	Concentração (mg.L^{-1})
Ampicilina	50 mg.mL^{-1}
IPTG	23 mg.mL^{-1}
X-Gal	40 mg.mL^{-1}

Após o período de incubação, as placas foram retiradas da estufa e colocadas na geladeira por uma hora para intensificação da cor azul das colônias que não foram transformadas. A partir das colônias transformadas, que sem a coloração azul, o DNA de interesse foi recuperado por meio da aplicação por PCR, usando o set de primers M13F e M13R (CHUN, 1995). As condições de amplificação utilizadas para a PCR estão descritas na Tabela 4.8.

Tabela 4.8: Condições utilizadas na PCR

Primer	Pré-Desnatura ção	Nº de ciclos	Desnatura ção	Anelamen to	Exten são	Final da extensão	Resfria mento
M13F M13R	94°C/1 min	25	94°C/60 seg	55°C/60 seg	72°C/105 seg	72°C/7 min	4°C

Os produtos da PCR foram enviados para sequenciamento na empresa MACROGEN Inc. (http://www.macrogen.com/eng/business/seq_overview.html), Seoul, Korea.

Com as sequências obtidas, os vetores retirados por meio dos softwares DNASTAR Lasergene SeqMan Pro e BioEdit versão 7.2.5. A busca por sequências similares foi realizada utilizando as ferramentas do Ribossomal Database Project (*decipher find chimeras*, alinhamento, *complete linkage clustering*, sequências representativas, *RDP classifier*, *dereplicate* - <http://rdp.cme.msu.edu/>), ferramenta básica de alinhamento (*Basic Local Alignment Search Tool - BLAST*) e pesquisas no *National Center for Biotechnology Information sequence database* (NCBI-database) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Desta forma, foi possível agrupar as sequências obtidas em unidades taxonômicas operacionais (UTO).

A construção da árvore filogenética foi realizada pelo método de Neighbor-Joining (SAITOU, NEY, 1987), utilizando o programa MEGA versão 6.0 (TAMURA et al., 2013). Nessa etapa foi aplicado o método de Bootstrap com 1000 réplicas, para estimar a confiabilidade na topologia da árvore filogenética (FELSENSTEIN, 1985). O limite de confiança adotado foi de 99% para o nível taxonômico de Espécie e de 88% para o nível taxonômico de Gênero.

4.11. Ajuste dos dados experimentais

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

A partir da equação de Gompertz modificada é possível estimar o Potencial de Produção de H₂ (P), Velocidade máxima de Produção de H₂ (R_m) e Tempo de Fase Lag (λ). Na equação de Gompertz modificada (Equação 3), H representa os valores de produção acumulada de H₂ e t o tempo. Os gráficos com o ajuste estão apresentados no APÊNDICE I.

$$H(t) = P \cdot \exp \left\{ - \exp \left[\frac{R_m \cdot e}{P} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (3)$$

Sendo,

P = potencial de produção de hidrogênio (mmol);

R_m = taxa máxima de produção de hidrogênio (mmol.dia⁻¹);

λ = período da fase *lag* (dia) e

$e = 2,718281828$

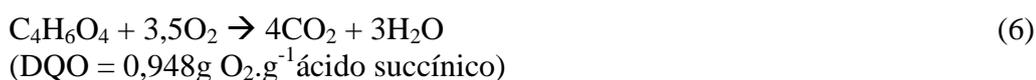
O rendimento de H₂ foi calculado a partir da relação entre o potencial máximo de produção (mmol) e a celulose adicionada (g). Para o cálculo do volume de H₂ considerou-se as condições normais de temperatura e pressão (CNTP), sendo 1 mmol de gás equivalente a 22,4 mL.

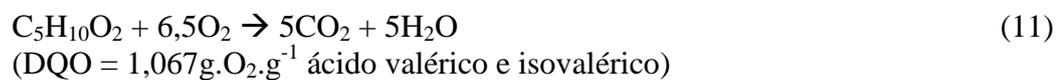
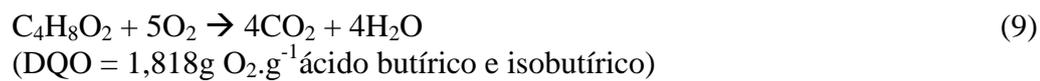
4.12. Balanço de massa em termos de DQO

Para o balanço de massa foram utilizados os valores das análises de DQO inicial e DQO final solúveis e os valores teóricos calculados. Para o cálculo da DQO teórica levou-se em consideração a concentração de carboidratos solúveis (na forma de hexose), o extrato de levedura adicionado ao meio de cultivo e principais ácidos orgânicos analisados (málico, succínico, acético, propiônico e iso-propiônico, butírico e iso-butírico, valérico e caprótico), de acordo com a equação (4):

$$\begin{aligned} \text{DQO}_{\text{teórica}} = & \text{DQO}_{\text{HMal}} + \text{DQO}_{\text{HSuc}} + \text{DQO}_{\text{HAc}} + \text{DQO}_{\text{HProp}} + \text{DQO}_{\text{HCBut}} + \\ & \text{DQO}_{\text{HCap}} + \text{DQO}_{\text{HVal}} + \text{DQO}_{\text{carboidratos}} + \text{DQO}_{\text{ext.levedura}} + \text{DQO}_{\text{triptona}} \end{aligned} \quad (4)$$

Foram utilizadas as seguintes equações e seus respectivos coeficientes de conversão para o cálculo da DQO_{teórica} (Equações 5 a 12):





A DQO do extrato de levedura foi considerada igual a 1,0 g.L⁻¹ de acordo com Botta et al. (2012).

A DQO da triptona foi medida e averiguou-se 1,0 g.L⁻¹.

5) RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Reativação do inóculo

Houve intenso crescimento celular e produção de biogás nos reatores de reativação, evidenciado pela turvação do meio e formação de bolhas no interior do reator, respectivamente. Os dados de produção de H₂ foram ajustados ao modelo de Gompertz modificado (R^2 igual a 0,986). Sob tais condições obteve-se os seguintes valores: potencial máximo de produção de hidrogênio (P) de 15,36 mmol de H₂, velocidade máxima de produção (R_m) de 0,68 mmol H₂.dia⁻¹, e duração da fase *Lag* de 4,43 dias.

Neste estudo, por meio da estratégia de reativação do inóculo fazendo-se o uso de glicose como substrato observou-se crescimento de bactérias fermentativas produtoras de hidrogênio, cujo rendimento obtido foi de 17,2 mL H₂.g⁻¹ de glicose. Wang e Wan (2008) estudaram o efeito da concentração de glicose como substrato na produção fermentativa de H₂ em reatores em batelada a 35°C e pH 7,0. Os autores utilizaram como inóculo cultura mista obtida de digestor anaeróbio, a qual foi submetida a pré-tratamento térmico e obtiveram também rendimento de 17 mL H₂.g⁻¹ de glicose. Desse modo verificou-se que o meio de cultura foi eficaz para promover o crescimento do inóculo nas condições operacionais estudadas.

Após o período de fase *Lag* e início da fase exponencial de crescimento bacteriano, ou seja, com seis dias, o ensaio foi finalizado e o inóculo reativado transferido para os ensaios de produção de H₂ a partir de celulose.

5.2. Escolha do meio de cultivo

Os meios de cultura descritos na literatura para o cultivo de bactérias celulolíticas contém, geralmente, em sua composição uma ou mais vitaminas, sais de potássio, sódio, cálcio e fosfato, solução traço de metais, amônia como fonte de nitrogênio e cisteína ou sulfeto como fonte de enxofre (GIAJ-LEVRA, 1991). Não obstante, esses compostos também fizeram parte da composição dos meios de cultivo, LGM 94 (ATLAS, 2005), Del Nery (DEL NERY, 1987) e Ho (HO et al., 2012) escolhidos para testar o crescimento de bactérias celulolíticas e fermentativas.

Verificou-se que as condições nutricionais do meio de cultivo Del Nery não favoreceram a produção de H₂. Provavelmente, sob tais condições não ocorreu o crescimento das bactérias celulolíticas e fermentativas.

Para os reatores confeccionados com os meios de cultivo LGM 94 (ATLAS, 2005) e Ho (HO et al., 2012) verificou-se crescimento bacteriano, por meio da turvação da fase líquida e produção de H_2 a partir do quarto dia de incubação. Verificaram-se diferenças marcantes na composição destes meios de cultivo em relação ao meio de cultura descrito por Del Nery (DEL NERY, 1987), entre elas: (a) concentração de cálcio (0,01 g) dez vezes maior em Ho (HO et al., 2012) e 20 vezes maior (0,02 g de Ca) em LGM 94 (ATLAS, 2005), (b) concentração de ferro era sete (0,007 g) e quatro vezes (0,004 g) maior em Ho (HO et al., 2012) e LGM 94 (ATLAS, 2005), respectivamente, em comparação ao meio Del Nery (DEL NERY, 1987) (0,001 g de Fe), (c) a fonte de magnésio ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) e nitrogênio (NH_4Cl) fizeram parte da composição dos meios de cultivo Ho (HO et al., 2012) e LGM 94 (ATLAS, 2005), (d) Os sais fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4) e fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) foram reportados em meios de cultivo usados na produção de H_2 a partir de compostos celulolíticos (LAY, 2001; LIN, HUNG, 2008; LO et al., 2009; GENG et al., 2010; GUO et al., 2010; REN et al., 2010; CHU et al., 2011). No meio de cultivo Ho (HO et al., 2012) era adicionado 8,6 g de K_2HPO_4 e 4,2 g de KH_2PO_4 , 3.000 vezes e 100 vezes a mais, respectivamente, do que no meio Del Nery (DEL NERY, 1987). Enquanto, para o meio de cultivo LGM 94 (ATLAS, 2005) era adicionado 0,296 g de K_2HPO_4 (390 vezes) e 0,18 g de KH_2PO_4 (17 vezes a mais), respectivamente, quando comparado ao Del Nery (DEL NERY, 1987) (0,0026 g de K_2HPO_4 e 0,011 g de KH_2PO_4).

Estes fatores nutricionais nos meios de cultivo Ho (HO et al., 2012) e LGM 94 (ATLAS, 2005) favoreceram o enriquecimento das bactérias celulolíticas e fermentativas provenientes do inóculo .

Os resultados de produção de hidrogênio, oriundos dos meios de cultivos Ho (HO et al., 2012) e LGM 49 (ATLAS, 2005), foram ajustados ao modelo de Gompertz modificado, com coeficiente de correlação (R^2) igual a 0,999 e 0,996, respectivamente (Figura 5.1).

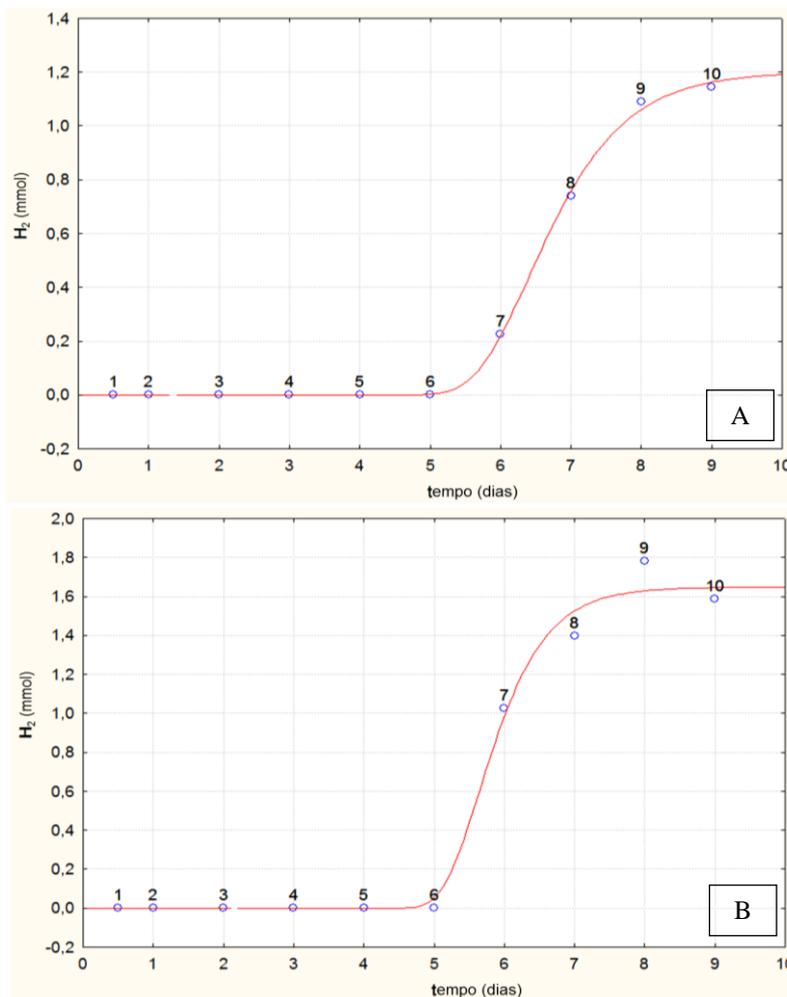


Figura 5.1: Gráfico da evolução de H₂, ajustado ao modelo de Gompertz, nos meios de cultivo Ho (HO et al., 2012) (A) e LGM 94 (ATLAS, 2005) (B).

Conforme mostrado na Tabela 5.1, obteve-se maior produção de H₂ (P) para a condição nutricional do meio de cultivo LGM 94 (ATLAS, 2005) (1,65 mmol) e também maior velocidade de produção de hidrogênio (R_m) (1,89 mmol H₂.dia⁻¹), quando comparado ao meio de cultivo Ho (HO et al., 2012), de 1,20 mmol e 1,30 mmol H₂.dia⁻¹. O menor período de fase *Lag* (λ) (5,65 dias) também foi obtida para o meio de cultivo LGM 94 (ATLAS, 2005). Esses resultados foram usados para eleger o meio de cultivo LGM 49 para os ensaios de produção de H₂ a partir de celulose.

Tabela 5.1: Valores ajustados ao modelo de Gompertz

Meio de cultivo	P (mmol)	R_m (mmol H ₂ .dia ⁻¹)	λ (dia)
Ho (HO et al., 2012)	1,20	1,30	6,41
LGM 94 (ATLAS, 2005)	1,65	1,89	5,65

Foi realizado ensaio controle com o meio de cultivo LGM 94. Nesse ensaio o sistema foi submetido às mesmas condições operacionais dos ensaios para produção de H_2 , porém, não houve a adição de celulose como fonte de carbono. A produção de H_2 manteve-se abaixo do limite de detecção da curva analítica. Assim, sob tais condições, foi constatado que o extrato de levedura e triptona não serviram de substrato para produção de hidrogênio. Botta et al. (2012) também realizaram teste controle para averiguar a utilização do extrato de levedura e da triptona como substratos para produção de H_2 . Os ensaios foram realizados com reatores em batelada, utilizando inóculo proveniente de rúmem. Os autores também constataram que não houve produção significativa de H_2 . Assim, os resultados dos referidos autores corroboram com o ensaio controle do presente estudo.

5.3. Ensaios de produção de H_2

Os reatores anaeróbios em batelada de produção de hidrogênio foram monitorados durante de 16 dias (Figura 5.2). A produção de hidrogênio a partir de celulose como substrato iniciou-se após o quarto dia de operação para as três condições testadas. Foi observado rápido aumento da concentração de hidrogênio entre o quarto e o oitavo dia para os ensaios E1 e E3 e entre quarto e o décimo dia para o ensaio E2. Utilizando celulose como substrato e inóculo misto, Lay (2001) também relatou a produção de hidrogênio após o quarto dia de ensaio. Este hiato entre o início do ensaio até o início da produção de hidrogênio pode ser resultante do tempo necessário para a conversão enzimática da celulose em açúcares solúveis e a conversão catabólica destes açúcares em hidrogênio, ácidos orgânicos e álcoois (FOND et al., 1983).

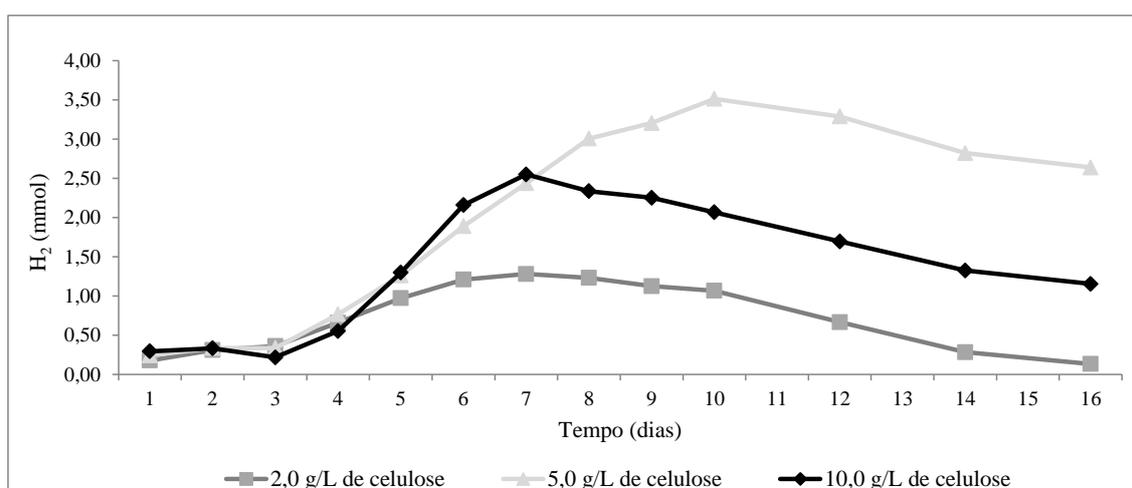


Figura 5.2: Ensaios de produção de hidrogênio a partir de celulose.

Os dados de evolução da produção de hidrogênio foram ajustados ao modelo de Gompertz modificado, com coeficiente de correlação (R^2) de 0,962, 0,973 e 0,972 para os

ensaios E1, E2 e E3, respectivamente. O potencial máximo de produção de H₂ (P), velocidade máxima de produção (R_m) e período de duração de fase *lag* (λ) estão listados na Tabela 5.2.

Tabela 5.2: P , R_m e λ para os ensaios E1, E2 e E3.

Ensaio	P (mmol)	R_m (mmol H ₂ .dia ⁻¹)	λ (dia)
E1	1,23	0,62	2,87
E2	3,14	0,65	4,67
E3	2,32	1,25	4,37

Por meio da aplicação do modelo de Gompertz modificado verificou-se que os valores de potencial máximo de produção de hidrogênio teóricos obtidos para os ensaios E1, E2 e E3 (1,23 mmol, 3,14 mmol e 2,32 mmol) foram consistentes com os valores máximos de produção obtidos nos ensaios práticos (1,28 mmol, 3,51 mmol e 2,55 mmol, para E1, E2 e E3, respectivamente).

Apesar do aumento da concentração de celulose de 2,0 para 5,0 g.L⁻¹, os valores de R_m foram similares para estes ensaios, ou seja, 0,62 e 0,65 mmol.dia⁻¹, respectivamente. Observou-se valores crescentes para R_m quando aumentou-se a concentração de celulose para 10 g.L⁻¹ (1,25 mmol.dia⁻¹), quando comparado com E2 (0,65 mmol.dia⁻¹) e E1 (0,62 mmol.dia⁻¹). O aumento da velocidade ocorreu, provavelmente, pela maior disponibilidade de substrato em E3. RATTI et al. (2013) estudaram a produção de H₂ a partir de diferentes concentrações de celulose (2,5, 5,0 e 10,0 g.L⁻¹) em reatores em batelada e lixiviado de aterro sanitário como inóculo acrescido de celulase comercial, a 37°C e pH 7,0. Os autores também obtiveram maior valor de velocidade de produção de H₂ (2,3 mmol.h⁻¹) para 10 g.L⁻¹ de celulose, quando comparado a 5,0 g.L⁻¹ de celulose (0,9 mmol.h⁻¹) e 2,0 g.L⁻¹ de celulose (0,8 mmol.h⁻¹).

Em contrapartida, o potencial máximo de produção de H₂ não seguiu a mesma tendência. Enquanto a velocidade foi crescente para os ensaios E1 (0,62 mmol H₂.dia⁻¹), E2 (0,65 mmol H₂.dia⁻¹) e E3 (1,25 mmol H₂.dia⁻¹), verificou-se potencial menor para a condição que continha maior concentração de celulose; ou seja de 2,32 mmol de H₂ para E3 (com 10,0 g.L⁻¹ de celulose). Verificou-se que para as condições do ensaio E1 e E2, em que houve aumento da concentração de celulose de 2,0 g/L para 5,0 g/L, respectivamente, que ocorreu maior disponibilidade de substrato e maior concentração de microrganismos, para a mesma relação alimento/microrganismo (1,4), por conseguinte maior potencial máximo de produção de hidrogênio 3,14 mmol para E2 (com 5,0 g.L⁻¹ de celulose) e 1,23 mmol para E1 (com 2,0 g.L⁻¹ de celulose). No entanto, sob as condições do ensaio E3, o aumento da concentração de celulose (10,0 g.L⁻¹) não foi favorável à produção de hidrogênio no reator.

A rápida evolução de hidrogênio, ocasionada pela maior velocidade de produção detectada no ensaio E3, pode ter levado ao aumento da pressão parcial de hidrogênio no *headspace*, que é conhecidamente prejudicial aos microrganismos do consórcio microbiano (VALDEZ-VAZQUEZ et al., 2005). Valdez-Vazquez et al. (2005) realizaram experimentos em batelada para produção de H₂ utilizando papel como substrato e lodo de digestor anaeróbico como inóculo. Os autores consideraram duas condições, uma sem despressurização do *headspace* e a outra com a despressurização do *headspace*. De acordo com os autores, a despressurização do *headspace* dos reatores foi efetiva para dobrar a quantidade de H₂ produzido; ou seja, de 34 mmol de H₂ para os reatores submetidos à despressurização e 17 mmol de H₂ para aqueles sem despressurização. No presente estudo não foi considerada a despressurização do *headspace*, o que pode ter contribuído para a inibição da fermentação biológica no ensaio E3.

No ensaio E3, o aumento da pressão parcial de H₂ ocorreu em menor intervalo de tempo (sete dias) em relação aos outros dois ensaios (onze e oito dias para E1 e E2, respectivamente). Pode-se observar que a partir do sétimo dia de monitoramento foi detectada pressão parcial em E3 acima de 1,60 atm (pressão máxima medida pelo barômetro). No ensaio E2, a pressão parcial foi de 1,60 atm a partir do oitavo dia de monitoramento e para o ensaio E1, a pressão parcial máxima foi de 1,52 atm no décimo dia de monitoramento (Figura 5.3).

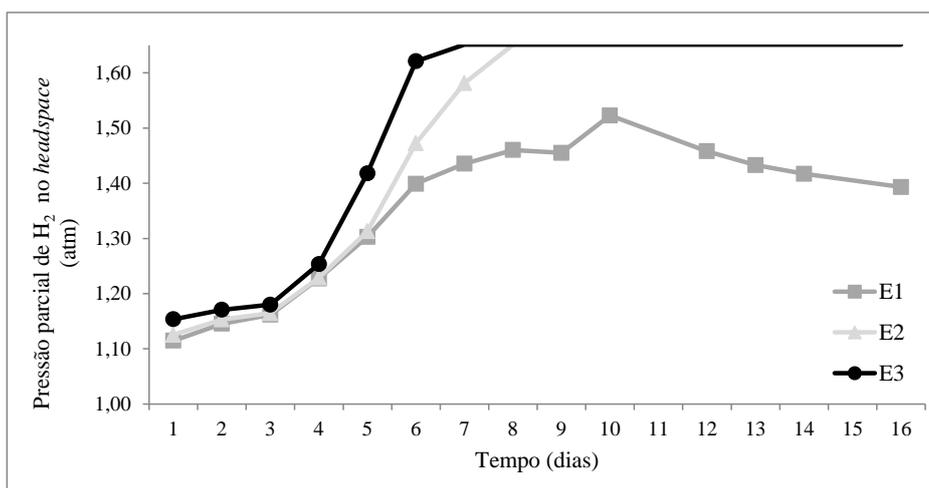


Figura 5.3: Pressão parcial de H₂ nos ensaio E1, E2 e E3.

Além do aumento da pressão parcial, a redução dos valores de pH pode também ter contribuído para a diminuição do potencial de produção de H₂ no ensaio E3 (2,32 mmol). A produção de H₂ ocorre simultaneamente à produção de ácidos orgânicos, levando ao acúmulo

desses produtos no meio líquido. A produção biológica de H₂ é decorrente da ação das enzimas hidrogenase e nitrogenase (KOTAY, DAS, 2008) que são afetadas diretamente pelo pH do meio (LAY, 2001) e inibidas em pH baixo (DABROCK, 1992). Morimoto et al. (2004) demonstraram que a produção de hidrogênio a partir de glicose iniciada em pH neutro foi reduzida com a diminuição do pH e cessou em pH 4. No presente estudo, não foi observada redução expressiva do pH (de 6,8 para 5,4 no ensaio E3, de 6,8 para 6,0 no ensaio E2 e de 6,8 para 6,1 no ensaio E1, após 16 dias de monitoramento) devido à característica tamponante do meio de cultivo, entretanto o acúmulo de ácidos orgânicos, que resultou na diminuição do pH, pode ter sido prejudicial às populações fermentativas do consórcio microbiano.

O tempo de duração da fase *lag* nos três experimentos pôde ter sido em função da adaptação do inóculo à nova fonte de carbono (celulose), em substituição a glicose usada na fase de reativação. Em E1, a concentração de celulose foi menor (2,0 g.L⁻¹) do que os demais ensaios. Desse modo, supõe-se que este fator tenha contribuído com o menor tempo de adaptação das bactérias deste ensaio, o que resultou em menor período de fase *Lag* (2,87 dias). Nas condições de E2 e E3, com 5,0 e 10,0 g.L⁻¹ de celulose, respectivamente, observou-se período semelhante de fase *Lag*; ou seja de 4,67 e 4,37 dias, respectivamente.

Os períodos de duração da fase *Lag* obtidos nos ensaios foram semelhantes àqueles apresentados por Lay (2001), de 3,74 a 4,26 dias. O autor avaliou a produção de H₂ em reatores em batelada operados a 37°C, pH 7,0 com celulose (12,5 g.L⁻¹ a 50,0 g.L⁻¹). O inóculo utilizado foi obtido a partir de lodo anaeróbio de digestor alimentado com resíduos sólidos.

O período de fase *Lag* a partir de celulose hidrolisada com celulase exógena para a produção de H₂ é bem menor, da ordem de poucas horas (LAKSHMIDEVI, MUTHUKUMAR, 2010; BOTTA, 2012; RATTI et al., 2013). Ratti et al. (2013) obtiveram valores de 4,6 a 5,1 horas de duração de fase *Lag* em reatores em batelada operados a 37°C e pH 7,0, com celulose (2,5 a 10,0 g.L⁻¹) e lixiviado de aterro sanitário como fonte de inóculo. A adição de celulase no meio libera rapidamente carboidratos solúveis prontamente disponíveis para fermentação e o período de fase *lag* prevalece bem menor (BOTTA, 2012).

Para o cálculo de rendimento de H₂ (Tabela 5.3), houve necessidade de considerar CNTP, uma vez que, a partir do sétimo dia de monitoramento para o ensaio E3 e do oitavo dia para o ensaio E2, a pressão dos reatores estava superior ao limite máximo de detecção do barômetro (1,60 atm).

Tabela 5.3: Rendimento de produção de H₂ para E1, E2 e E3.

Ensaio	Rendimento	
	mmol H ₂ .g ⁻¹ de celulose	mL H ₂ .g ⁻¹ de celulose
E1	0,62	13,78
E2	0,63	14,07
E3	0,23	5,22

Apesar do valor de potencial de produção de hidrogênio para o ensaio E1 ter sido menor (1,23 mmol) verificou-se que o rendimento nessa condição foi equivalente àquele do ensaio E2 (0,62 e 0,63 mmol H₂.g⁻¹ de celulose para E1 e E2, respectivamente). Para o ensaio E3 verificou-se o menor rendimento dentre os ensaios realizados; ou seja, 0,23 mmol H₂.g⁻¹ de celulose. Este resultado de baixo rendimento pode ter sido reflexo da concentração de celulose adotada (10,0 g.L⁻¹).

Lay (2001) relatou que o rendimento de celulose diminuiu com o aumento da concentração de celulose e a intensidade da mistura do sobrenadante é um importante fator que influencia a transferência do substrato, principalmente celulose, para fermentação. Lay et al. (2000) relataram que o aumento da velocidade de agitação dos reatores em batelada de 100 a 700 rpm favoreceu o aumento de 2,3 vezes na produção de H₂. No presente estudo, os reatores foram mantidos em repouso e a transferência de substratos para as células suspensas pode ter ficado comprometida, principalmente nos reatores com maior concentração de celulose.

Para a condição E3 (10,0 g.L⁻¹ de celulose) verificou-se maior velocidade de produção de hidrogênio (1,25 mmol H₂.dia⁻¹) e baixo rendimento (0,23 mmol H₂.g⁻¹ de celulose). Provavelmente, sob tais condições, ocorreram efeitos adversos à produção de hidrogênio, tais como, acúmulo de celobiose, a qual pode inibir as celulasas e comprometer toda a fermentação (LESCHINE, 1995), baixo pH ocasionado pelo acúmulo de ácidos (DABROCK, 1992) ou aumento da pressão no *headspace* (VALDEZ-VAZQUEZ et al., 2005).

Pode-se observar na Tabela 5.4 comparação dos valores de rendimento de produção de H₂ (mmol.g⁻¹ de celulose) do presente estudo com valores disponíveis na literatura, os quais consideraram celulose como substrato e diferentes fontes de inóculo. O rendimento de H₂ obtido no presente estudo foi inferior à média encontrada em estudos similares. Entretanto, vale ressaltar que o inóculo utilizado nos reatores foi oriundo de uma cultura mista (diferentemente de Wang et al., 2008), sem pré-tratamentos (diferentemente de Lay, 2001 e Logan et al., 2002) que favoreceu a permanência de bactérias celulolíticas nos reatores de produção de H₂.

Tabela 5.4: Rendimentos de produção de H₂ em reatores em batelada que utilizam celulose como substrato.

Inóculo	Celulose (g.L ⁻¹)	pH	Rendimento (mmol H ₂ .g ⁻¹ de celulose adicionada)	Referência
Lodo de reator anaeróbio precedido de pré-tratamento	12,5	7,0	2,2	Lay, 2001
Cultura mista precedida de pré-tratamento	4,7	6,0	0,02	Logan et al., 2002
<i>C. acetobutylicum</i> e <i>Ethanoigenens harbinense</i>	10,0	5,0	8,1	Wang et al., 2008
<i>C. acetobutylicum</i>	10,0	7,0	3,6	
Cultura mista enriquecida obtida de esterco de gado	5,0	6,8	7,4	Ren et al., 2010
	10,0		5,6	
Cultura mista obtida de lodo de ETE industrial	2,0	6,8	0,62	Presente estudo
	5,0		0,63	
	10,0		0,23	

5.3.1) Ácidos orgânicos e álcoois

A conversão fermentativa de celulose em H₂ foi acompanhada pela formação de variedade de ácidos orgânicos (cítrico, málico, succínico láctico, fórmico, acético, propiônico, iso-butírico, butírico, iso-valérico, valérico e caprótico) e álcoois.

Verificou-se baixa produção de etanol, ou seja, de 29,8, 12,4 e 17,1 mg.L⁻¹ nos ensaios E1, E2 e E3, respectivamente, após 16 dias de operação. A via de produção de hidrogênio pelos microrganismos pode alterar de acidogênica para alcoólica durante o período de incubação, principalmente quando o pH é reduzido a 4,5 ou menos (LIN, HUNG, 2008). Neste estudo, a pequena variação de pH (de 6,8 a 6,1 no ensaio E1, de 6,8 a 6,0 no ensaio E2 e de 6,8 a 5,4 no ensaio E3) observada durante o período operação foi insuficiente para contribuir com a mudança da rota metabólica de acidogênica para alcoólica (Tabela 5.5). O meio de cultura LGM 94 (ATLAS, 2005) utilizado continha 2,1 g/L de bicarbonato de sódio (NaHCO₃). Tal composto tem ação tamponante, atenuando as variações de pH no sistema (GADOW, et al. 2013).

Tabela 5.5: Variação de pH inicial e final para os ensaios 1, 2 e 3.

Ensaio	pH inicial	pH final
E1	6,8	6,1
E2		6,0
E3		5,4

A variação temporal dos produtos intermediários gerados nos reatores encontra-se detalhada no APÊNDICE II.

No ensaio E1, a concentração de ácido acético foi crescente durante todo experimento, obtendo-se $1.101,9 \text{ mg.L}^{-1}$ após 16 dias de operação. A produção de ácido butírico foi crescente e significativa a partir do terceiro dia de ensaio, obtendo-se $2.161,5 \text{ mg/L}$ após 16 dias de operação. Em relação ao ácido propiônico observou-se $383,4 \text{ mg.L}^{-1}$ no início do experimento, provavelmente, oriundo do inóculo. Após 16 dias de operação observou-se $568,9 \text{ mg.L}^{-1}$ desse ácido orgânico. Observou-se para o ácido capróico aumento considerável de $16,1$ para $466,1 \text{ mg/L}$ (Figura 5.4). Na condição nutricional do ensaio E1 observou-se 45% de ácido butírico, 22,9% de ácido acético e 11,8% de ácido propiônico.

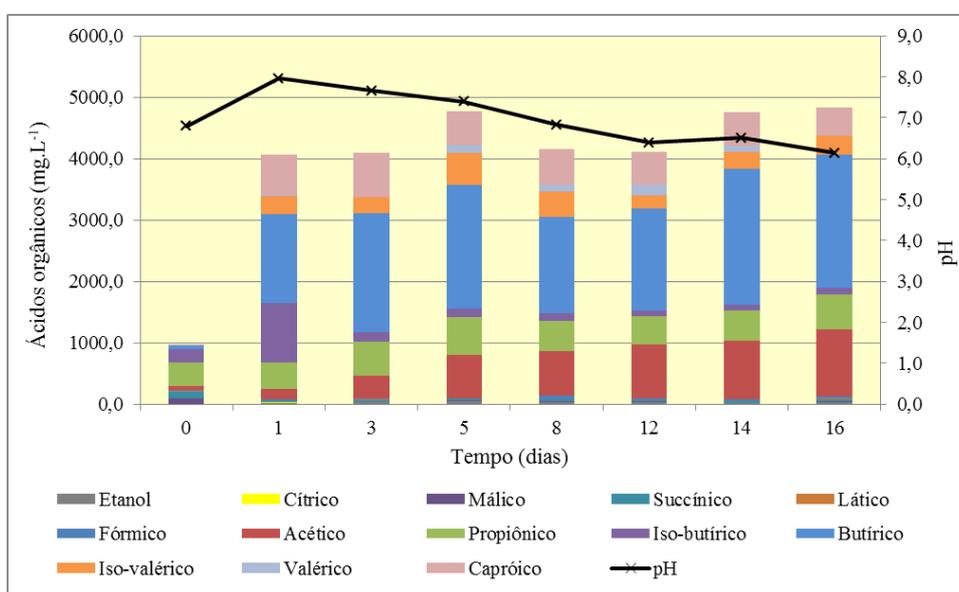


Figura 5.4: Variação temporal de ácidos orgânicos em E1.

Ao final do ensaio E2, após 16 dias de operação verificou-se 37,4% de ácido butírico e 28,9% de ácido acético, seguidos do ácido iso-valérico (14,4%). Verificou-se para o ácido capróico valores crescentes até o 14º dia de ensaio (de $25,2$ a $841,1 \text{ mg.L}^{-1}$). Entretanto, no último dia de operação verificou-se $351,0 \text{ mg.L}^{-1}$ (Figura 5.5).

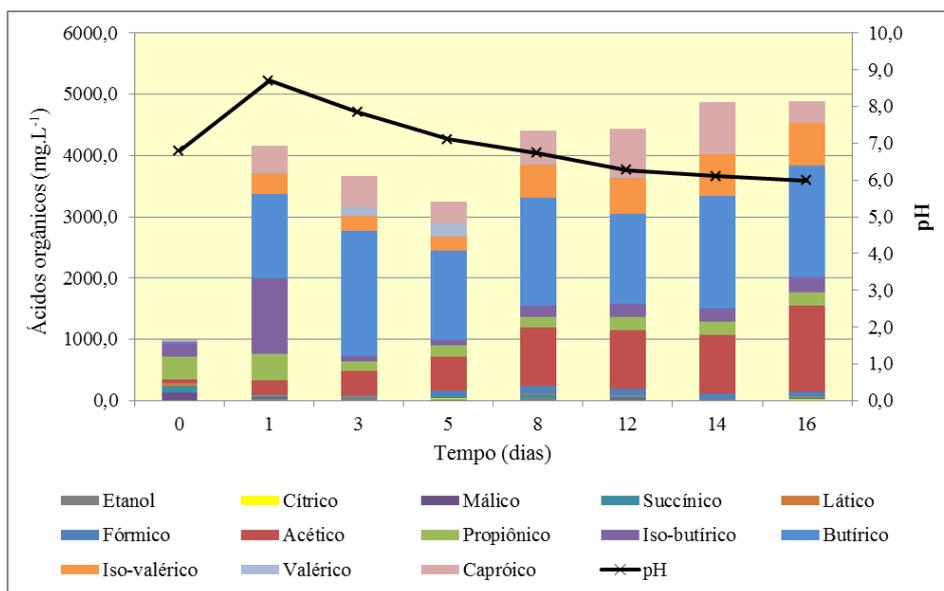


Figura 5.5: Variação temporal de ácidos orgânicos em E2.

No ensaio com maior concentração de celulose ($10,0 \text{ g.L}^{-1}$) observou-se maior concentração de ácido butírico ($2.211,9 \text{ mg.L}^{-1}$), seguido de ácidos acético ($1.213,3 \text{ mg.L}^{-1}$) e caprótico ($801,7 \text{ mg.L}^{-1}$) (Figura 5.6).

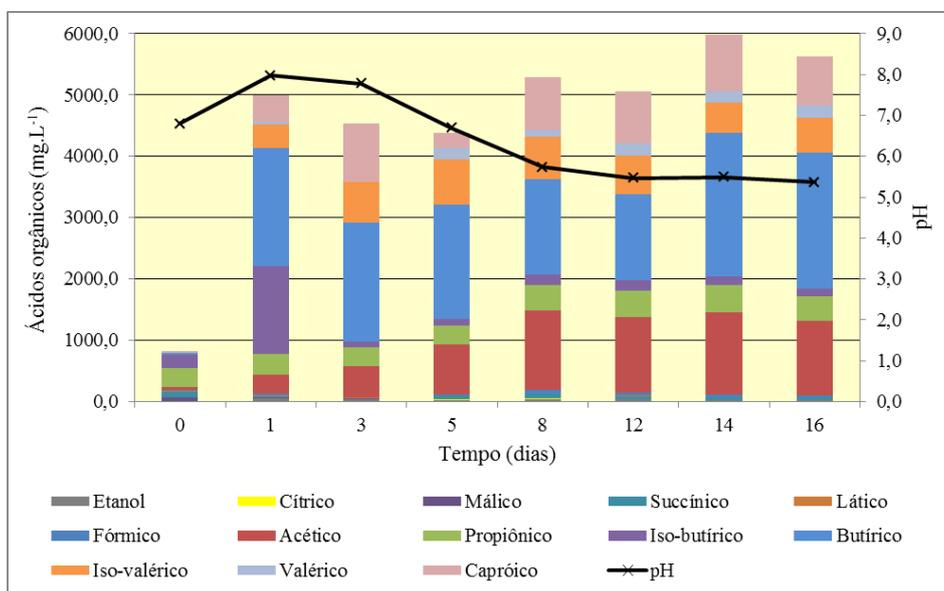
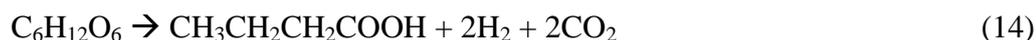
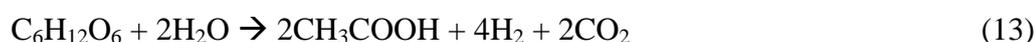


Figura 5.6: Variação temporal de ácidos orgânicos em E3.

Assim, para as três condições estudadas, verificou-se predomínio dos ácidos butírico e acético em relação aos ácidos orgânicos resultantes da fermentação da celulose. A presença destes ácidos na fermentação de materiais lignocelulósicos tem sido amplamente reportada (CHU et al., 2011; GADOW et al., 2013; RATTI et al., 2013).

Os valores de ácido acético e butírico dos três ensaios foram semelhantes aqueles relatados por Lay (2001), que utilizou 12,5 g.L⁻¹ de celulose e inóculo misto pré-tratado proveniente de lodo de digestor anaeróbico. O autor relatou 2,0 g.L⁻¹ de ácido butírico e 1,0 g.L⁻¹ de ácido acético. Especificamente, nesse trabalho verificou-se 2,1, 1,8 e 2,2 g.L⁻¹ de ácido butírico e 1,1, 1,4 e 1,2 g.L⁻¹ de ácido acético e para os ensaios E1, E2 e E3, respectivamente.

Ácido acético e butírico são produtos solúveis desejáveis do ponto de vista da produção de hidrogênio. A partir da fermentação de hexoses em ácido acético (Equação 13) e ácido butírico (Equação 14) tem-se rendimentos teóricos de 4 moles e 2 moles H₂. mol hexose⁻¹, respectivamente.



Baixos rendimentos de H₂ estão associados com outros sub-produtos, tais como, ácido propiônico e ácido láctico (SKONIECZNY, YARGEAU, 2009; CHU et al., 2011). Etanol e butanol também são indesejáveis no processo, pois implicam em menor rendimento teórico de H₂ (GOTTSCHALK, 1986). No presente estudo, as concentrações de etanol não foram expressivas. Verificou-se 0,030, 0,012 e 0,017 g.L⁻¹ de etanol para os ensaios E1, E2 e E3, respectivamente.

O maior percentual de ácido butírico em E1, E2 e E3 foi de 45,0%, 37,4% e 39,4% ao final da operação, respectivamente. A rota metabólica de formação de H₂ a partir da formação de ácido butírico é típica de espécies do gênero *Clostridium* (CHEN et al., 2005). Especificamente, nesse trabalho verificou-se que 90% das bactérias identificadas por clonagem e sequenciamento do gene RNAr 16S foram semelhantes ao gênero *Clostridium*.

De acordo com a análise de carboidratos solúveis, verificou-se a relação entre produção de H₂ e produção e consumo de carboidratos (Figura 5.7). Para a amostra oriunda do ensaio controle (sem celulose), obteve-se 87,3 mg.L⁻¹ de açúcares solúveis. Este valor foi subtraído dos resultados das amostras iniciais de cada ensaio de produção de H₂. Desta forma, os resultados relatados de concentração de carboidratos solúveis nos ensaios de produção de H₂ são referentes à degradação da celulose.

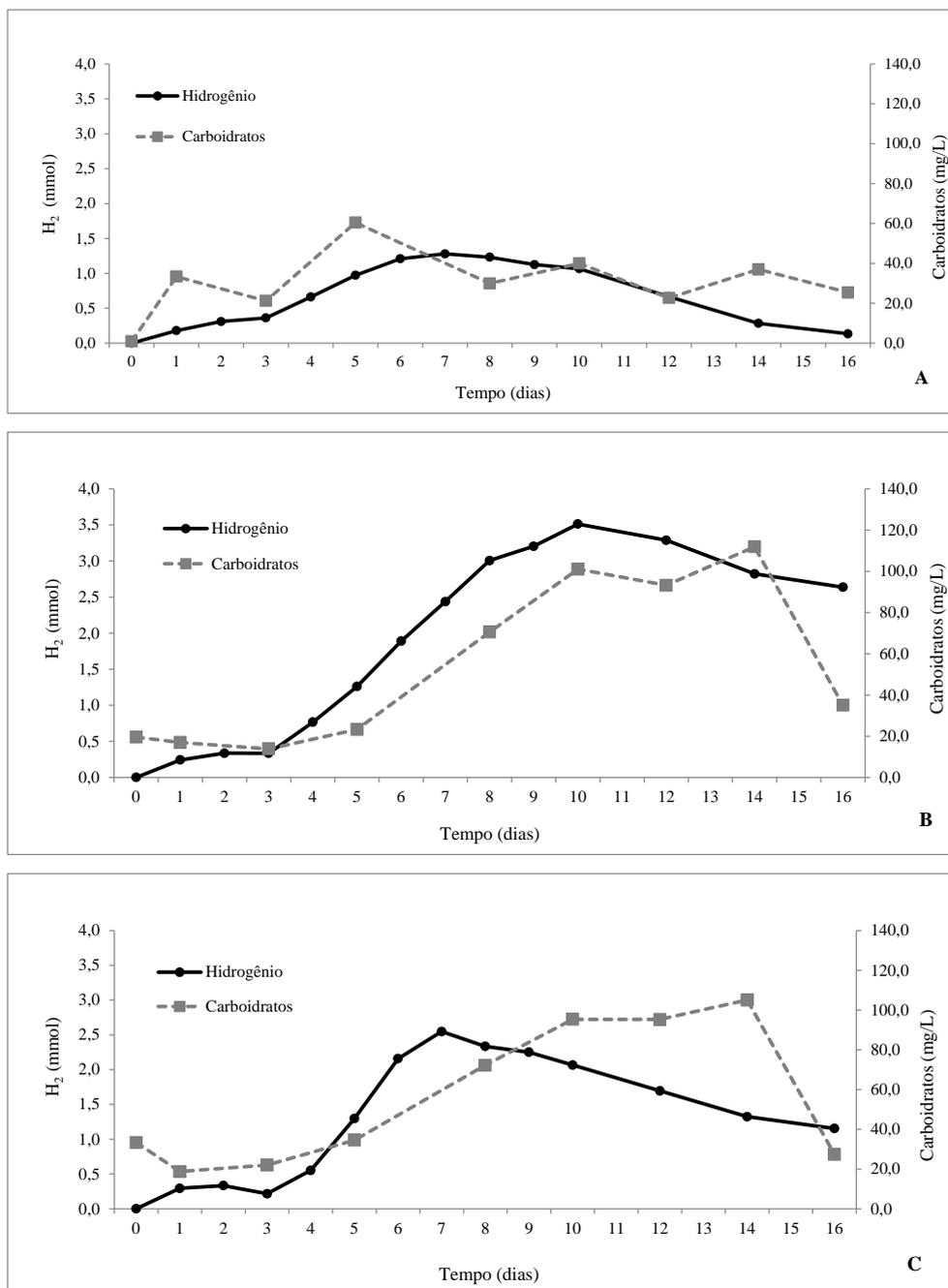


Figura 5.7: Variação temporal de carboídrato e H_2 para os ensaios E1 (A); E2 (B) e E3 (C).

No ensaio E1 ($2,0 \text{ g.L}^{-1}$ de celulose) verificou-se constante liberação e consumo de carboídratos solúveis, chegando ao valor máximo de $60,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de carboídratos no meio líquido após cinco dias de operação. Ao final do ensaio verificou-se $25,4 \text{ mg.L}^{-1}$ de carboídratos, o que equivaleu a 63,0% de consumo. No ensaio E2 ($5,0 \text{ g.L}^{-1}$ de celulose), e no ensaio E3 ($10,0 \text{ g.L}^{-1}$ de celulose) observaram-se $111,9 \text{ mg.L}^{-1}$ e $105,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de açúcares solúveis, respectivamente, após o 14º dia de ensaio. No final dos ensaios, a concentração residual foi de $35,1 \text{ mg.L}^{-1}$ e $27,3 \text{ mg.L}^{-1}$, tendo consumo de 68,5% e 77,0%, respectivamente.

A produção de hidrogênio manteve-se bem alinhada à liberação de açúcares solúveis, principalmente nos ensaios E2 e E3. Destaca-se que a produção de hidrogênio foi maior em períodos com maior concentração de açúcares no meio.

Os resultados de consumo de carboidratos solúveis nos três ensaios (63% em E1, 68,5 em E2 e 77% em E3) estão dentro da média de estudos que utilizam substratos celulósicos para produção de H₂ apresentados na literatura. Lay (2001) relatou quase 100% de consumo de celulose para 12,5 a 50 mg.L⁻¹. Botta (2012) utilizou papel como substrato para produção de H₂ e obteve 56 a 65% de consumo dos carboidratos solúveis com 0,5 a 4,0 g.L⁻¹ de papel. Ratti et al. (2013) obtiveram consumo de carboidratos solúveis de 41,4, 28,4 e 44,7% para as concentrações de celulose de 2,5, 5,0 e 10,0 g.L⁻¹, respectivamente. Nos dois últimos casos foi adicionado celulase para hidrólise do material celulósico, o que não ocorreu nesse trabalho, uma vez que buscou-se obtenção de consórcio de bactérias celulolíticas e fermentativas. Desse modo, por meio dos resultados obtidos, é possível inferir sobre a obtenção desse consórcio de bactérias anaeróbias nas condições estudadas, uma vez que constatou-se produção e consumo de carboidratos, além de ácidos orgânicos e hidrogênio.

Todavia, para os três ensaios, verificou-se diminuição da produção de hidrogênio acompanhado da evolução de metano, ácido acético e sulfeto (Figura 5.8). Portanto, além das bactérias celulolíticas, outras bactérias fizeram parte desse consórcio, tais como, arqueias metanogênicas, bactérias consumidoras de hidrogênio e bactérias redutoras de sulfato (BRS).

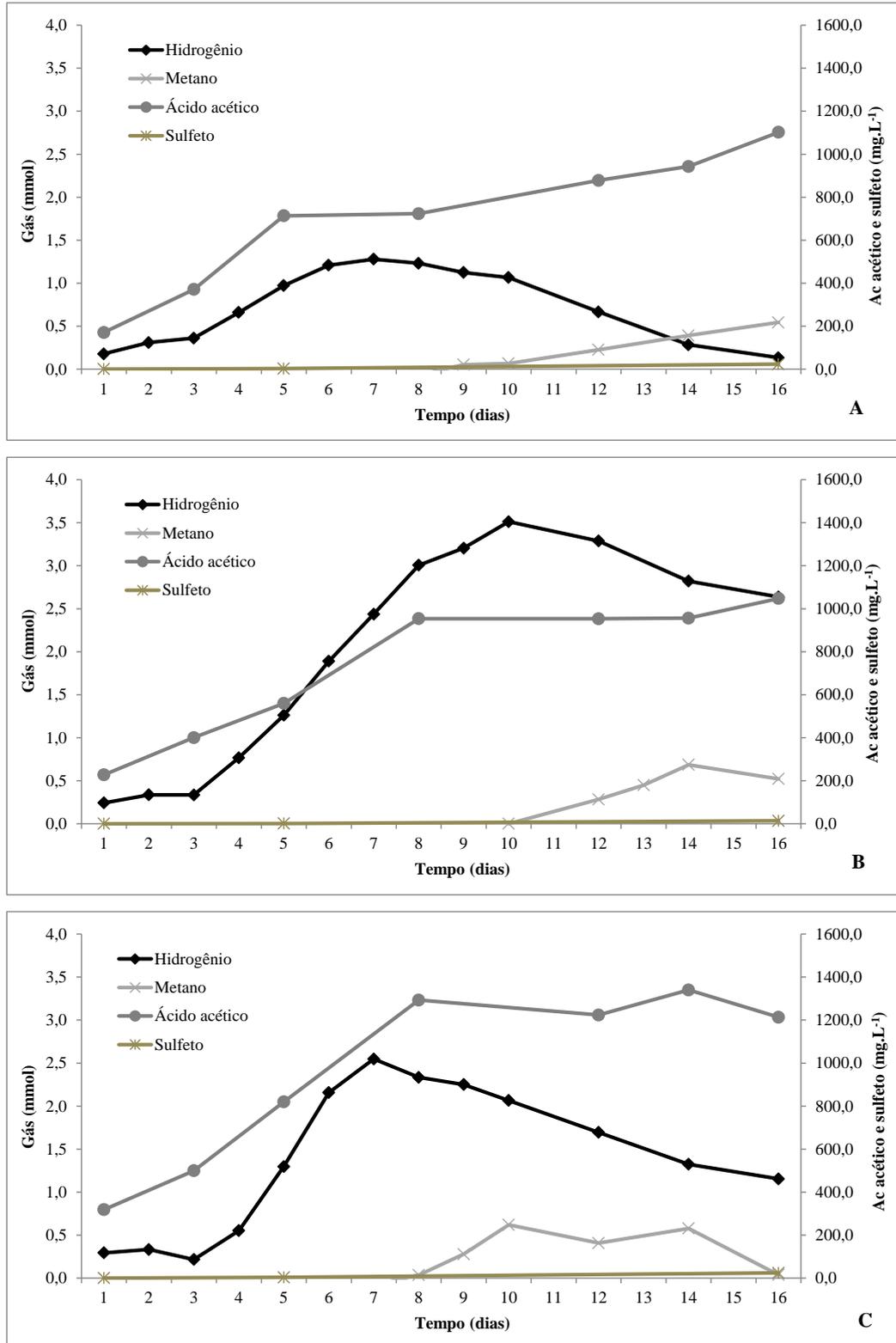


Figura 5.8: Variação temporal de produção de H_2 , CH_4 , H_2S e ácido acético e para os ensaios E1 (A), E2 (B) e E3 (C).

Observou-se para o ensaio E1, evolução do hidrogênio até o oitavo dia de monitoramento, atingindo 1,28 mmol. O declínio da produção de hidrogênio foi acompanhado

de concentrações crescentes de ácido acético observando-se até 1.101,9 mg.L⁻¹ ao final do ensaio. A produção de metano iniciou no nono dia de monitoramento e, no final do ensaio, observou-se 0,54 mmol. Em relação ao sulfeto verificou-se no 16º dia de operação, produção de 23,1 mg.L⁻¹.

A evolução do hidrogênio no ensaio E2 foi até o décimo dia de monitoramento, atingindo 3,51 mmol. Na fase de declínio do gás houve início da produção de metano, de 0,68 mmol no 14º dia de operação. A produção de ácido acético foi crescente desde o início do ensaio observando-se 1.047,47 mg.L⁻¹ após 16 dias de operação. Em relação ao sulfeto observou-se 13,9 mg.L⁻¹ após 16 dias de operação.

No ensaio E3 verificou-se evolução de hidrogênio até o sétimo dia, ou seja, de 2,55 mmol. A concentração de ácido acético também foi crescente durante este período, observando-se 1.293,24 mg.L⁻¹ no sétimo dia e mantendo-se em 1.213,32 mg.L⁻¹ no final do ensaio. Observou-se produção de metano no oitavo dia e 0,58 mmol após 14 dias de operação. Observou-se 24,2 mg.L⁻¹ de sulfeto ao final do experimento.

Nos três ensaios a diminuição da produção de hidrogênio foi acompanhada do aumento das concentrações de metano, ácido acético e sulfeto, fornecendo, desta forma, indícios de que a formação destes produtos ocorreu a partir de reações de metanogênese hidrogenotrófica, homoacetogênese e sulfetogênese, respectivamente.

No presente estudo, os experimentos foram conduzidos objetivando a produção de H₂, não podendo, desta forma, afirmar sobre as quantidades de H₂ que foram destinados para rotas específicas de consumo do gás. Entretanto, de acordo com as estequiometrias das reações, calculou-se a quantidade teórica de H₂ que poderia ser destinada para formação de cada produto: metano, ácido acético e sulfeto. Os valores calculados elucidam a diminuição de H₂ nos ensaios E1, E2 e E3.

A metanogênese é a via mais comum de consumo de H₂ em sistemas anaeróbios (KRAEMER, BAGLEY, 2008) e a mais estudada (SAADY, 2013). A produção de metano a partir de CO₂ e H₂ é realizada por microrganismos metanogênicos hidrogenotróficos (OLIVA, 1997) de acordo com a Equação 15:



Considerando que quatro moles de H₂ são necessários para formação de um mol de CH₄ e que a produção de CH₄ nos ensaios E1, E2 e E3 foi de 0,54, 0,68 e 0,58 mmol,

respectivamente, a quantidade de H₂ disponível para a formação do CH₄ deveria ser de 2,16, 2,72 e 2,32 mmol, respectivamente.

A variação temporal da produção de CH₄ encontra-se detalhada no APÊNDICE III.

A utilização de um inóculo misto sem pré-tratamento pode ter sido responsável pela crescente produção de metano e consequente diminuição de hidrogênio. Tais evidências também foram relatadas por Lay (2001) e Gadow et al. (2013) que também utilizaram mistos em reatores anaeróbios.

Chu et al. (2011) avaliaram a produção de hidrogênio a partir de substrato lignocelulósico com inóculo misto. Os autores procederam pré-tratamento térmico (100°C/15 minutos) que foi eficaz na inibição de arqueias metanogênicas e, conseqüentemente, não obtiveram consumo de hidrogênio.

No presente estudo, desconsiderou-se a etapa de pré-tratamentos no inóculo por causa das características físico-químicas em que o inóculo estava submetido, as quais acreditava-se, serem capazes de inibir o desenvolvimento das arqueias metanogênicas. O inóculo foi oriundo do lodo da ETE industrial, onde foi submetido a variações ocasionais de pH e temperatura oriundas da rotina industrial. Entretanto, verificou-se que estas variações em que o inóculo esteve submetido não foram suficientes para inibir as arqueias metanogênicas.

Além da metanogênese deve-se considerar também a homoacetogênese, a qual têm sido subestimada, embora possa ocorrer o tempo todo durante a fermentação (SAADY, 2013).

A homoacetogênese é a formação do ácido acético por microrganismos homoacetogênicos via redução do CO₂ com H₂, conforme a Equação 16 (SAADY, 2013). Bactérias do gênero *Clostridium* estão relacionadas com esta via de consumo de hidrogênio (RYAN et al., 2008).

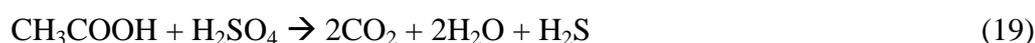


De acordo com a reação apresentada, quatro moles de H₂ podem ser usados para a formação de um mol de ácido acético. Para o cálculo da quantidade de ácido acético que poderia ser formada a partir da homoacetogênese, considerou-se o período de declínio de H₂, ou seja, a partir do oitavo dia para E1 e E3 e 12º dia para E2. Antes deste período, a evolução do hidrogênio pode ter sido dada pela fermentação via ácido acético, onde a produção de ácido acético foi acompanhada pela produção de H₂.

Assim sendo, 25,2 mmol de H₂ podem ter sido destinados para a produção de ácido acético em E1, 6,8 mmol em E2 e 3,1 mmol em E3. Em E1, com 2,0 g.L⁻¹ de celulose,

observou-se maior quantidade de H₂ potencialmente destinada à produção de ácido acético. De acordo com Voolapalli e Stuckey, 1998 (apud SAADY, 2013) bactérias homoacetogênicas predominam em meios com pouca disponibilidade de nutrientes, comprometendo o rendimento de H₂.

Destaca-se também que a redução desassimilatória do sulfato é a mais importante fonte de H₂S em sistemas anaeróbios, sendo realizada pelas BRS. Neste processo, o sulfeto não é totalmente utilizado na síntese celular e fica disponível no meio. O processo de redução do sulfato pode ocorrer com quatro diferentes substratos orgânicos: ácido butírico (Equação 17), ácido propiônico (Equação 18), ácido acético (Equação 19) e hidrogênio (Equação 20) (KALYUZHNYI et al., 1998).



No monitoramento dos reatores do presente estudo verificou-se que a produção dos ácidos butírico, acético e propiônico aumentaram ao longo do tempo, não podendo, desta forma terem sido usados na redução desassimilativa de sulfato. Todavia, o hidrogênio, com certeza foi usado na sulfetogênese. Assim, de acordo com a estequiometria da reação da redução do sulfato calculou-se a quantidade de hidrogênio necessária para formação do sulfeto presente no final dos ensaios (Tabela 5.6).

Tabela 5.6: Quantidade de hidrogênio requerido para a formação de sulfeto

Ensaio	H ₂ S (mg.L ⁻¹)	H ₂ requerido para formação do H ₂ S (mmol)
E1 (2g celulose/L)	23,1	2,7
E2 (5g celulose/L)	13,9	1,6
E3 (10g celulose/L)	24,2	2,8

A variação temporal da produção de H₂S encontra-se detalhada no APÊNDICE IV.

A formação do sulfeto pode, também, induzir à precipitação de metais não alcalinos, reduzindo a sua disponibilidade para os microrganismos (ISA et al., 1986). Além do sulfeto presente em solução, foi observada a precipitação do sulfeto. Os reatores ficaram escuros com

pequenos precipitados pretos, característicos de precipitação de sulfetos metálicos (Figura 5.9).

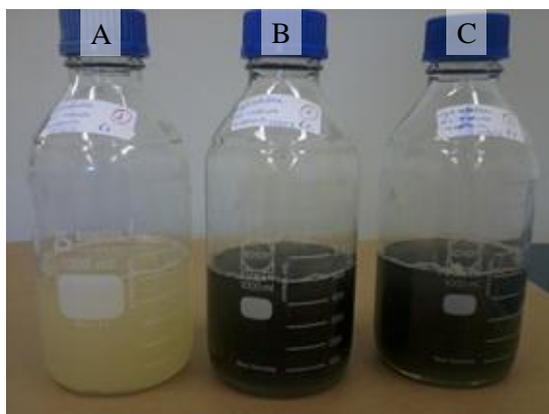


Figura 5.9: Diferença de coloração do meio dos reatores anaeróbios apresentando precipitação do sulfeto (B e C) e sem precipitação de sulfeto (A).

As BRS podem crescer em ampla gama de sub-produtos da fermentação como doadores de elétrons (SAADY, 2013). A inibição destes microrganismos têm sido alcançada com valores de pH menores que 6,0 (LIN, CHEN, 2006). No caso específico desse trabalho o valor de pH no início do processo foi 6,8 e no final foram de 6,1, 6,0 e 5,4 para os ensaios E1, E2 e E3, respectivamente. Desse modo, ocorreu favorecimento de tais populações.

Parte do H_2 gerado nos reatores foi convertida em CH_4 , ácido acético e H_2S (Tabela 5.7).

Tabela 5.7: Quantidade de H_2 requerido para formação de CH_4 , ácido acético e H_2S .

Ensaio	H_2 requerido (mmol)			Total
	CH_4	CH_3COOH	H_2S	
E1	2,2	25,2	2,7	30,1
E2	2,7	6,8	1,6	11,1
E3	2,3	3,1	2,8	8,2

No cálculo teórico da quantidade de H_2 que pode ter sido destinado à formação de CH_4 , ácido acético e H_2S , pode-se observar que para o ensaio E1 30,1 mmol de H_2 seria consumido para formação dos respectivos produtos. Em E2, seria 11,1 mmol e em E3 8,2 mmol. Em todos os ensaios, os resultados de H_2 requerido para homoacetogênese foram os mais significativos, ou seja, 83,7% no ensaio E1, 61,3% no ensaio E2 e 37,8% no ensaio E3.

5.3.2) Sólidos Totais e Voláteis

De acordo com os resultados das análises de sólidos (Tabela 5.8), pôde-se observar que, inicialmente, houve aumento de sólidos totais, decorrente do aumento dos sólidos fixos,

na medida em que se aumentou a concentração de celulose. Nas amostras finais, seguiu-se a mesma tendência, ou seja, para o ensaio E3, com maior concentração de celulose (10,0 g.L⁻¹) obteve-se 14,6 g.L⁻¹ de sólidos totais. Na condição E2 (5,0 g.L⁻¹ de celulose) obteve-se 9,2 g.L⁻¹ e em E1 (2,0 g.L⁻¹ de celulose) obteve-se 6,0 g.L⁻¹ de sólidos totais.

Tabela 5.8: Sólidos Totais (ST), fixos (STF) e Voláteis (STV) nos ensaios E1, E2 e E3.

Ensaio	ST (g.L ⁻¹)		STF (g.L ⁻¹)		STV (g.L ⁻¹)	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
E1	5,6	6,0	3,6	1,7	2,0	4,3
E2	8,6	9,2	6,8	4,6	1,8	4,6
E3	13,2	14,6	11,4	11,4	1,8	3,2

Os valores obtidos de sólidos totais voláteis foram maiores no final do experimento (4,3, 4,6 e 3,2 g.L⁻¹ em E1, E2 e E3, respectivamente), quando comparados aos valores iniciais (2,0 g.L⁻¹ em E1 e 1,8 g.L⁻¹ em E2 e E3) refletindo o crescimento bacteriano, uma vez que os valores de sólidos totais voláteis correspondem à biomassa presente nos reatores.

Não foi possível obter uma relação constante de STV/ST com os dados obtidos das análises de sólidos dos ensaios, conforme esperado. A relação diminuiu de acordo com o aumento da concentração de celulose no meio, obtendo-se 35,7, 20,9 e 13,6% no início dos ensaios E1, E2 e E3, respectivamente. Ao final do experimento, obteve-se para STV/ST 71,5, 50,0 e 21,9% em E1, E2 e E3, respectivamente. Infere-se que a análise de sólidos realizada tenha ficado comprometida devido principalmente à insolubilidade da celulose residual.

Por meio da hidrólise enzimática da celulose ocorreu a formação de matéria carbonácea solúvel, tais como, ácidos orgânicos que por sua vez justifica a DQO solúvel crescente ao longo dos três ensaios (Figura 5.10).

Observou-se para DQO inicial resultados similares nos três ensaios, o que era esperado, pois a quantidade de matéria solúvel inicial foi semelhante, variando-se apenas a matéria não solubilizada como a celulose e inóculo. Assim, observou-se 2,0; 2,3 e 2,4 g.L⁻¹ de DQO solúvel para os ensaios E1, E2 e E3, respectivamente. Ao final dos ensaios observou-se 4,7 g.L⁻¹, 6,9 g.L⁻¹ e 9,3 g.L⁻¹ de DQO, respectivamente.

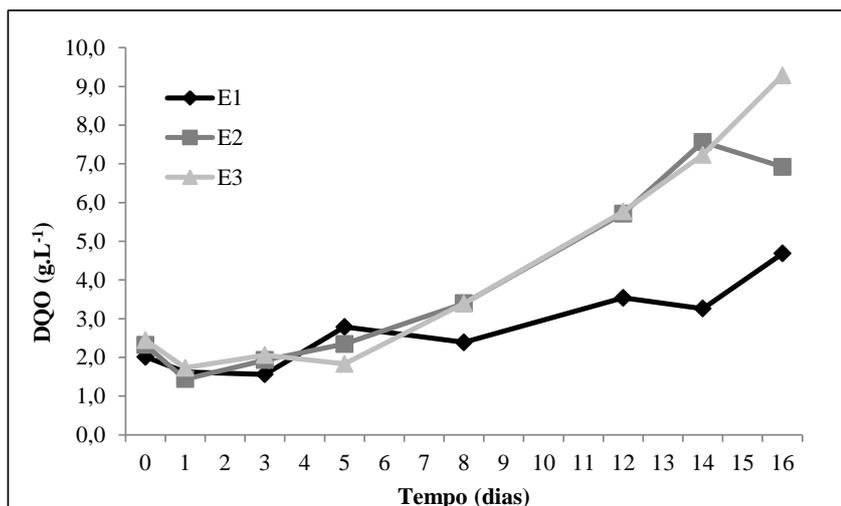


Figura 5.10: Variação temporal de DQO medida para os ensaios E1, E2 e E3.

De acordo com os valores da DQO calculada, pode-se observar que os ácidos que mais se destacaram no somatório da DQO calculada inicial foi o ácido propiônico, correspondendo a $0,6 \text{ g.L}^{-1}$ de DQO em E1 e E2 e $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ de DQO em E3, seguido do ácido butírico, com $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ de DQO em E1 e E2 e $0,4 \text{ g.L}^{-1}$ de DQO em E3. No cálculo da DQO final, os maiores valores obtidos foram com o ácido butírico, $4,1$, $3,7$ e $4,3 \text{ g.L}^{-1}$ de DQO para os ensaios E1, E2 e E3, respectivamente (Tabela 5.9).

Tabela 5.9: Balanço de DQO de E1, E2 e E3.

Compostos	DQO teórica calculada (g.L^{-1})					
	E1		E2		E3	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
Extrato de levedura	1,0	-	1,0	-	1,0	-
Triptona	1,0	-	1,0	-	1,0	-
Ac. Málico	0,06	0,004	0,09	0,003	0,04	0,001
Ac. Succínico	0,1	0,04	0,1	0,03	0,09	0,04
Ac. Acético	0,06	1,2	0,06	1,1	0,05	1,3
Ac. Propiônico	0,6	0,9	0,6	0,3	0,5	0,6
Ac. Butírico	0,5	4,1	0,5	3,7	0,4	4,3
Ac. Capróico	0,04	1,0	0,06	0,8	0,07	1,8
Ac. Valérico	0	0,6	0	1,4	0,02	1,6
Glicose	0,09	0,03	0,1	0,04	0,1	0,03
Total	3,4	7,8	3,5	7,4	3,3	9,7

Comparando-se a DQO inicial e teórica dos três ensaios (Tabela 5.10) pode-se observar que a relação DQO medida/DQO calculada variou de 0,6 a 0,9. A melhor relação calculada foi para as amostras finais dos ensaios E2 e E3 (0,9).

Tabela 5.10: Comparação da DQO medida com a DQO teórica para os ensaios E1, E2 e E3.

DQO (g.L ⁻¹)	E1		E2		E3	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
Medida	2,0	4,7	2,3	6,9	2,4	9,3
Calculada	3,4	7,8	3,5	7,4	3,3	9,7
DQO_{medida}/DQO_{calculada}	0,6	0,6	0,7	0,9	0,7	0,9

Valores próximos a 1,0 indicam que os resultados obtidos com as análises de ácidos orgânicos e carboidratos solúveis foram responsáveis pela DQO medida de cada ensaio. Pode-se observar que os valores da DQO calculada foram maiores do que a DQO medida, o que ocorreu mais acentuadamente nas amostras finais, para o ensaio E1, onde a DQO medida foi de 4,7 enquanto que a DQO calculada foi de 7,8 g.L⁻¹. No ensaio E2, a DQO medida foi de 6,9 enquanto que a DQO calculada foi de 7,4 g.L⁻¹ e no ensaio E3 a DQO medida foi de 9,3 e a DQO calculada foi de 9,7 g.L⁻¹. Esta diferença entre os valores da DQO medida e da DQO calculada pode ser decorrente de compostos insolúveis formados ao longo dos ensaios que não foram mensurados no presente estudo.

5.4. Análises microbiológicas

5.4.1. Exame de microscopia óptica

A microscopia óptica foi realizada em amostras oriundas do reator de reativação e do ensaio E2 (5,0 g.L⁻¹ de celulose) de produção de hidrogênio (Figura 5.11).

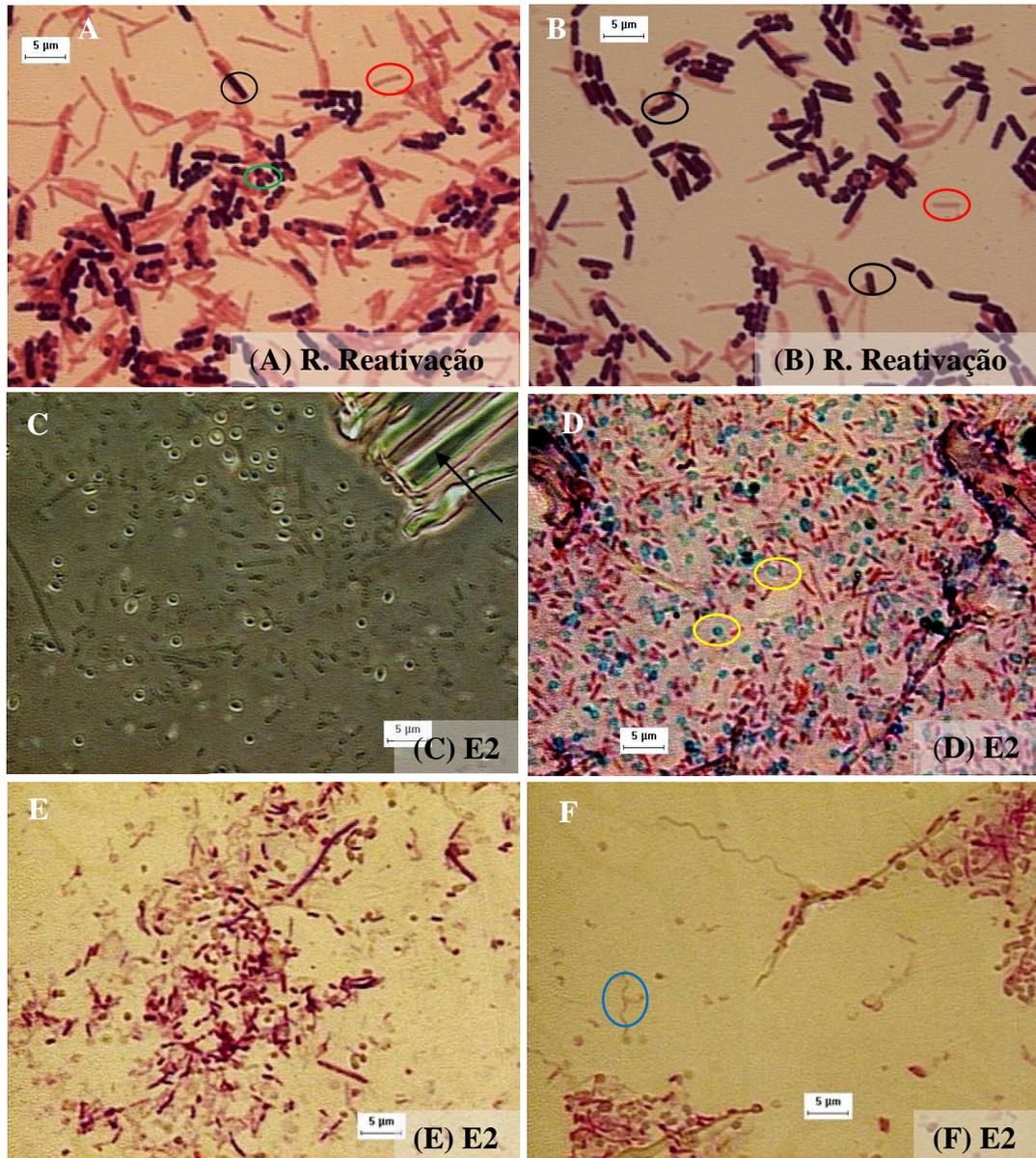


Figura 5.11: Microscopia óptica do inóculo: (A e B) coloração de Gram de amostra do reator de reativação, (C) Amostra *in natura* do ensaio E2, (D) coloração de endósporos do ensaio E2 e coloração de Gram do ensaio E2 (E e F).

A coloração de Gram (DSM, 1991) foi realizada em amostras do reator de reativação e pôde-se observar (Figura 5.11, A e B) bacilos Gram-positivos simples (circulados de preto), duplos e em cadeias; cocos Gram-positivos (circulados de verde) em arranjos duplos e em cadeias e bacilos Gram-negativos (circulados de vermelho). O enriquecimento e reativação da amostra procedeu-se a fim de favorecer toda população presente, o que foi comprovado com a observação de diversidade de formas e arranjos bacterianos.

Ao final do experimento foi realizada a observação microscópica em amostras do ensaio E2. Nesse ensaio observou-se maior potencial de produção e rendimento de hidrogênio

em relação aos demais ensaios. Por meio da observação da amostra do ensaio E2 *in natura* (Figura 5.11, C) foi possível observar bacilos simples e em arranjos e endósporos localizados perto do substrato celulósico (seta). A presença de endósporos (circulados de amarelo) foi comprovada pela coloração de endósporos (SCHAEFFER, MACDONALD, 1933), na qual foram visualizados verde-azulados, associados com o substrato celulósico (Figura 5.11, D).

A coloração de Gram (DSM, 1991) foi também realizada nas amostras ao final do ensaio E2 (Figura 5.11, E e F) e a diferenciação em Gram-positivas e negativas foi comprometida pela idade da cultura, certamente já em fase estacionária e declínio. Entretanto, foi possível observar a diversidade de morfologias bacterianas no reator E2, sendo observados bacilos simples, duplos e em cadeias, cocos e espiroquetas (circulados de azul).

5.4.2. PCR/DGGE

Análises de PCR/DGGE foram realizadas ao final de cada experimento com amostras provenientes do reator de reativação (sem celulose) e dos ensaios E1, E2 e E3 a fim de comparar a estrutura da comunidade microbiana em relação às concentrações crescentes de celulose no meio. A análise foi realizada para comparar, tanto as populações do Domínio *Bacteria* (Figura 5.12), quanto *Archaea* (Figura 5.13).

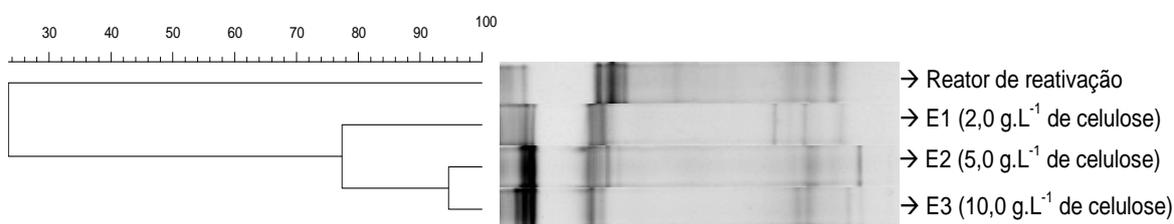


Figura 5.12: Dendrograma baseado no coeficiente de similaridade de Pearson a partir dos padrões de bandas do DGGE do Domínio *Bacteria*.

Para a análise do Domínio *Bacteria*, pôde-se observar maior similaridade entre os ensaios com maior concentração de celulose, ou seja, para as populações bacterianas de E2 e E3 (com 5,0 e 10,0 g.L⁻¹ de celulose) observou-se coeficiente de similaridade de 95%. Entre os três ensaios, E1, E2 e E3, com diferentes concentrações de celulose, a similaridade foi de 77%.

A porcentagem de similaridade entre os ensaios E1, E2 e E3 e o reator de reativação foi de 23%. Esta divergência na similaridade da comunidade bacteriana encontrada entre o reator de reativação (sem celulose) e os demais ensaios (com celulose) corrobora a observação de que o substrato celulósico influenciou na estrutura das populações de bactérias.

Ainda, que os ensaios E1, E2 e E3 tenham sido conduzidos com inóculo oriundo do mesmo reator de reativação, a concentração da celulose pareceu ter favorecido certas populações de bactérias em detrimento de outras, ou seja, quanto maior a concentração de celulose, mais semelhantes foram as populações entre si.

A análise de similaridade para o Domínio *Archaea* pareceu não ter tanta relação com a concentração de celulose, mas sim com a quantidade de inóculo em cada reator.

Similaridade de 94% foi observada entre as populações dos ensaios E1 e E2 que possuíam 1,4 e 3,4 g.L⁻¹ de inóculo, respectivamente (Figura 5.13). Enquanto, similaridade de 50% foi observada para o ensaio E3 (com 6,9 g.L⁻¹ de inóculo) com a amostra do reator de reativação.

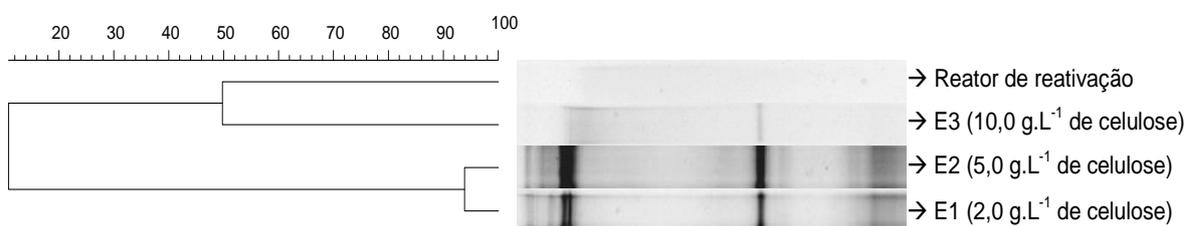


Figura 5.13: Dendrograma baseado no coeficiente de similaridade de Pearson a partir dos padrões de bandas do DGGE do Domínio *Archaea*.

Em relação aos microrganismos do Domínio *Archaea* destacam-se aqueles capazes de produzir CH₄ a partir de H₂ e CO₂, frequentemente presentes em inóculos naturais mistos e sem pré-tratamento (SAADY, 2013). Ao final dos três ensaios foi averiguada presença de metano (de 0,5 a 0,7 mmol de CH₄) que, aliada à análise de DGGE, supõe-se ter sido devido a presença de tais arqueias metanogênicas.

5.4.3. Clonagem e sequenciamento do gene RNAr 16S

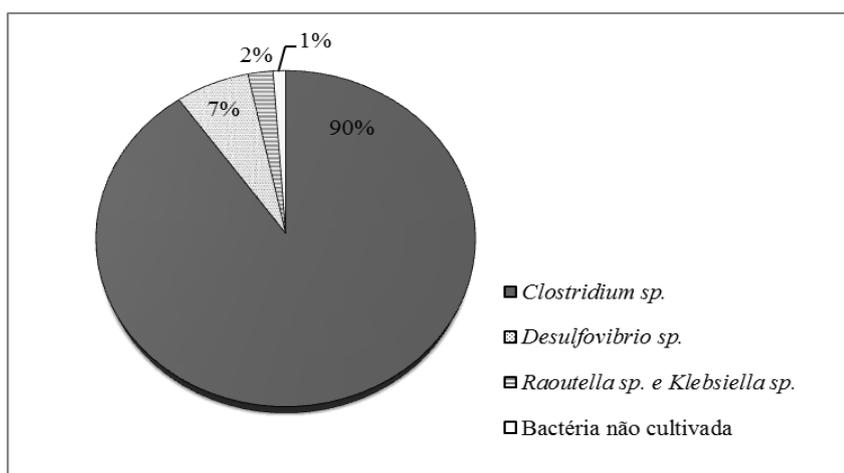
A população microbiana do ensaio E2 (5,0 g.L⁻¹ de celulose) foi caracterizada e identificada pela clonagem e sequenciamento do gene RNAr 16S. A clonagem da população resultou em 92 clones, os quais foram agrupados em seis UTOs (Unidades Taxonômicas Operacionais). Os clones analisados possuíam entre 943 e 1.371 pares de bases.

As sequências preditas foram submetidas à busca de identidade e similaridade utilizando a base de dados do GenBank disponível em www.ncbi.nlm.nih.gov (Tabela 5.11).

Tabela 5.11: Identidade das UTOs de acordo com GenBank.

UTO	Nº de clones	Acesso	Similaridade (%)	Microrganismo	Referência
1	67	AY353957	99	<i>Clostridium amygdalium</i>	Parshina et al., 2003
		FN813488	99	<i>Clostridium</i> sp.	Suresh, 2010*
		EU862317	97	<i>Clostridium</i> sp.	Jayasinghearachchi et al., 2010
2	10	GU931389	94	<i>Clostridium</i> sp.	Jeon et al., 2010
3	6	HM801879	98	<i>Clostridium</i> sp.	Ramachandran et al., 2011
4	6	FJ823916	98	<i>Desulfovibrio</i> sp.	Borole et al., 2009
5	1	AB826036	93	Bactéria não cultivada	Wang e Zhang, 2013*
6	2	HQ242731	99	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	Yang, 2010*
		FJ587229	99	<i>Raoultella</i> sp.	Marone, 2008*
		EU256398	99	<i>Klebsiella</i> sp.	Li et al., 2007*

A análise das sequências das UTOs 1, 3, 4 e 6 foram comparadas com as seqüências depositadas no GenBank e foram similares a *Clostridium* (OTU 1 e 3), *Desulfovibrio* (OTU 4), *Raoultella* (OTU 6) e *Klebsiella* (OTU 6) (Figura 5.14).

**Figura 5.14: Abundância relativa dos gêneros bacterianos identificados.**

A população identificada se restringiu aos Filos *Firmicutes* e *Proteobacteria*, pertencentes ao Domínio *Bacteria*.

O filo *Firmicutes* inclui representantes fenotipicamente diversificados e está organizado em três classes *Bacilli*, *Clostridia* e *Erysipelotrichia*, com pelo menos 26 famílias e 223 gêneros (SCHLEIFER, 1984). A classe *Clostridia* é composta por três ordens, *Clostridiales*, *Halanaerobiales* e *Thermoanaerobacterales*, sendo *Clostridiales* a principal por incluir bactérias pertencentes ao gênero *Clostridium* com 190 espécies (RAINEY, 1984). As bactérias do gênero *Clostridium* são bactérias aeróbias facultativas ou anaeróbias estritas. Alguns membros são termófilos e/ou halófilos, normalmente são quimiorganotróficos, algumas espécies são quimioautotróficas ou quimiolitotróficas. Podem metabolizar carboidratos, álcoois, aminoácidos, purinas esteroides ou outros compostos orgânicos (RAINEY, et al., 1984). No metabolismo fermentativo, *Clostridium* sp. produz gás hidrogênio, álcoois e ácidos orgânicos, principalmente butírico (LIN, HUNG, 2008).

Nesse trabalho foram identificadas bactérias pertencentes ao filo *Proteobacteria* e incluídas em duas famílias *Enterobacteriaceae* (classes *Deltaproteobacteria*) e *Desulfovibrionaceae* (classe *Gammaproteobacteria*).

São relatados 44 gêneros na família *Enterobacteriaceae*, entre eles *Klebsiella* sp. e *Raoultella* sp (BRENNER, FARMER, 1984). São bactérias Gram negativas, entretanto não apresentam motilidade. Na fermentação da glicose produzem principalmente ácido, 2,3-butanodiol e gás, com mais destaque para CO₂ do que H₂. Possui a capacidade de utilizar D-celobiose (produto da hidrólise incompleta da celulose) como fonte de carbono. Estas bactérias podem ser isoladas de espécimes clínicos, solos, águas ou plantas (GRIMONT, GRIMONT, 1984).

A família *Desulfovibrionaceae* inclui bactérias Gram-negativas, não formadoras de endósporos e estritamente anaeróbias. O receptor final de elétrons destas bactérias é o sulfato, que é reduzido a sulfeto. A oxidação da matéria orgânica é incompleta, levando a formação de acetato (KUEVER, et al., 1984). O gênero *Desulfovibrio*, pertencente a esta família, tem sua morfologia alterada pela idade da cultura ou pelo meio de crescimento, mas, em geral, são bacilos retos, curvos ou espirilos com flagelos lofotríquios. Além das características gerais, algumas espécies de *Desulfovibrio* podem apresentar crescimento quimiolitotrófico, usando H₂ como doador de elétrons e assimilando acetato, CO₂ ou extrato de levedura como fonte de carbono (KUEVER, et al., 1984).

A UTO 1, representada pela maioria dos clones (67), foi classificada com 99% de similaridade a *Clostridium amigdaliium* (AY353957), cuja sequência foi depositada por

Parshina et al. (2003). Os autores isolaram a bactéria a partir de lodo de reator UASB usado no tratamento de fécula de batata. Esta espécie bacteriana possui forma de bacilos retos ou ovais, simples, duplos ou em cadeias. São bactérias anaeróbias, mas aerotolerantes. A celobiose está entre os substratos utilizados como fonte de carbono e os produtos produzidos durante a fermentação são, principalmente, etanol, acetato, H₂ e CO₂ (PARSHINA et al., 2003).

Clostridium amigdalyum foi isolada de uma mistura de água e óleo oriunda de dutos de petróleo por Jayasinghearachchi et al. (2010). Os autores utilizaram esta bactéria em reatores em batelada para produção de H₂, utilizando xilana como fonte de carbono, pH 7,5 e 37°C, e obtiveram rendimento de 40 mmol de H₂.g⁻¹ de xilana. A xilana é o principal polissacarídeo componente das hemiceluloses e podem corresponder entre 20 a 35% do peso seco de fibras de eucalipto (WONG et al., 1998) que por sua vez é a matéria prima responsável por mais de 80% da produção brasileira de celulose (BRACELPA, 2013). Desta forma, é provável que este carboidrato faça parte da composição da matéria orgânica do efluente da ETE cujo lodo da lagoa facultativa foi usado como inóculo para este estudo. Desse modo, *C. amigdalyum* faziam parte do inóculo obtido a partir de lodo de ETE industrial.

O gênero *Clostridium* também foi identificado em outros acessos da OTU 1 (FN813488 e EU862317), OTU 2 (GU931389) e OTU 3 (HM801879).

As espécies do gênero *Clostridium* são, em sua maioria, bacilos Gram-positivos e podem ser encontradas nos mais diversos habitats, como em fezes e estrume, lodo de esgoto, água doce e sedimentos marinhos, lagos salgados e em várias partes do corpo humano. A maioria das espécies apresentam ótimo crescimento em pH 6,5 a 7,0 e temperatura de 30 a 37°C (RAINEY, et al., 1984).

No presente estudo, as condições impostas aos ensaios, pH 6,8 e 37°C, podem ter favorecido o crescimento de espécies de *Clostridium* presentes no lodo de ETE industrial. As concentrações acentuadas de ácido butírico (1,2, 1,8 e 2,2 g.L⁻¹ nos ensaios E1, E2 e E3, respectivamente), em relação aos demais ácidos analisados, obtidas ao final dos ensaios podem atestar o metabolismo de *Clostridium* nos reatores. Ho et al. (2012) também identificou bactérias do gênero *Clostridium* a partir de clonagem e sequenciamento de bandas do DGGE em ensaio de produção de H₂ a partir de substratos celulósicos utilizando lodo de esgoto como inóculo.

Dez clones foram agrupados na OTU 2 e identificados como *Clostridium* sp. com 94% de similaridade. A sequência (GU931389) foi depositada no Banco de Dados do NCBI por Jeon et al. (2010), os quais trabalharam com produção de ácido hexanóico a partir de D-

galactitol. Para alcançar o objetivo, os autores isolaram bactérias a partir de um reator produtor de hidrogênio inoculado com lodo de uma estação de tratamento de esgoto doméstico. Tal qual o presente trabalho, *Clostridium* foi obtido a partir de uma cultura mista enriquecida para produção de H₂.

Três clones, agrupados na OTU 3, apresentaram 98% de similaridade com *Clostridium* sp. (HM801879). Esta sequência foi depositada no Banco de Dados do NCBI por Ramachandran et al. (2011) que isolaram espécies de *Clostridium* a partir de uma solução estoque de celobiose. Os autores utilizaram a espécie bacteriana em reatores em batelada para produção de H₂ a partir de celobiose (2,0 g.L⁻¹) e obtiveram rendimento de H₂ de 14,2 mmol.L⁻¹ de cultura. É provável que nos reatores do presente estudo, celobiose também estivesse presente contribuindo como fonte de carbono para produção de H₂.

Clostridium spp. são bactérias dominantes no processo fermentativo de produção de H₂ (ZHANG et al., 2006; MAINTINGUER et al., 2011, RATTI et al., 2013), Maintinguer et al. (2011) identificou *Clostridium* sp. em reatores em batelada alimentado com xilose e inóculo obtido de lodo de reator UASB usado no tratamento de resíduos de suinocultura. Os autores submeteram o inóculo ao pré-tratamento térmico, operaram os reatores a 37°C e pH 5,5, e obtiveram 0,8 mol de H₂.mol⁻¹ de xilose com 3,6 g.L⁻¹ de xilose. Além de *Clostridium* sp., os autores identificaram também bactérias semelhantes a *Klebsiella* sp., tal qual o presente trabalho.

Clostridium spp. também são relacionadas com o metabolismo homoacetogênico (SAADY, 2013), traduzindo a sua versatilidade na utilização de substratos. No presente estudo, foi averiguado o metabolismo homoacetogênico a partir do aumento de concentrações de ácido acético conjuntamente ao declínio de H₂. Espécies de *Clostridium* identificadas na clonagem e sequenciamento podem estar relacionadas a este metabolismo.

Seis clones agrupados na OTU 4 foram identificados como *Desulfovibrio* sp. com 98% de similaridade. Estas sequências foram similares à caracterizada por Borole et al. (2009). Os autores estudaram a remoção de açúcares inibidores de fermentação (furfural e 5-hidroxiacetilfurfural) e produtos de degradação da lignina (ácido vanílico, 4-hidroxiacetilfurfural e 4-hidroxiacetofenona) em água de reuso de uma biorrefinaria de produção de etanol. Os açúcares, reconhecidamente como inibidores de bactérias fermentativas, em concentração de 5 a 20 mM não inibiram o crescimento de espécies de *Desulfovibrio*.

Espécies de *Desulfovibrio* têm sido isoladas de lodo anóxico de ambientes aquáticos, intestinos de animais, esterco e fezes. Tais bactérias podem crescer rapidamente em diversos

meios sem oxigênio e com sulfato e fonte de carbono presentes. Lactato ou uma mistura de H₂ e CO₂, na presença de acetato (como fonte de carbono adicional para a síntese de célula) representa um substrato de crescimento adequado (KUEVER, et al., 1984). São bactérias que apresentam versatilidade na utilização de fontes de carbono, sendo o acetato uma das principais fontes orgânicas (COLLERAN et al., 1995).

No presente estudo, os substratos requeridos para espécies de *Desulfovibrio*, como o sulfato presente no meio de cultivo e o acetato formado, podem ter favorecido o crescimento e a manutenção destas bactérias nos reatores de produção de H₂.

Um clone (OTU 5) foi identificado com 93% de similaridade com bactéria não cultivada (AB826036), cuja sequência foi encontrada por Wang e Zhang (2013 - não publicado). Os autores estudaram a diversidade bacteriana de uma população de um poço de lama.

Dois clones foram agrupados na OTU 6 e foram similares em 99% a *Klebsiella* sp. e *Raoultella* sp.

Klebsiella sp. (EU256398) foi isolada por Li et al. (2003 – não publicado) de uma população de mangue no sul da China e *Raoultella* sp. (FJ87229) foi isolada por Marone et al. (2008 – não publicado) de população produtora de hidrogênio a partir de resíduos vegetais. Obteve-se 99% de similaridade para os clones da OTU 6 a *Raoultella ornithinolytica* (HQ242731), espécie bacteriana identificada por Yang (2010 – não publicado) a partir de solos ricos em fósforo.

As bactérias do gênero *Klebsiella* apresentam-se, em sua maioria, como bacilos individuais, em pares ou em cadeias curtas, muitas vezes rodeadas por uma cápsula. *Klebsiella* spp. têm sido isoladas de ambientes aquáticos que recebem efluentes industriais, produtos vegetais, legumes frescos, alimentos com alto teor de açúcares e ácidos, concentrado de suco de laranja, resíduos de cana-de-açúcar, árvores vivas, plantas e subprodutos de plantas. Tais bactérias são comumente associadas com madeira, pó de serra e com águas receptoras de efluentes industriais de papel e celulose e de têxtil. Também já foram descritas em ambientes florestais, em madeira em decomposição e casca de madeira (GRIMONT, GRIMONT, 1984). Como se pode averiguar, espécies de *Klebsiella* têm sido isoladas, dentre outros em ambientes que apresentam compostos celulolíticos, a partir de águas receptoras de efluentes industriais de celulose e papel, o que corrobora com a presença desta bactéria nos reatores de produção de H₂ do presente estudo que utilizou como inóculo lodo da ETE da indústria de papel e celulose.

O gênero *Raoultella*, membro da família *Enterobacteriaceae*, era anteriormente classificado como *Klebsiella*, entretanto dados da sequência de análises de RNAr 16S juntamente com dados bioquímicos e de hibridação DNA-DNA, confirmaram a heterogeneidade do gênero *Klebsiella* e suportaram a divisão de *Klebsiella* em dois gêneros: *Klebsiella* e *Raoultella*. Desta forma, o gênero *Raoultella* foi criado englobando três espécies: *R. ornithinolytica*, *R. planticola* e *R. terrigena*, organismos estes que apresentam semelhanças fisiológicas ao gênero *Klebsiella*, mas, por peculiaridade, são capazes de crescer a 10°C e de utilizar L-sorbose como fonte de carbono (DRANCOURT et al., 2001).

Tal qual *Klebsiella* spp., espécies de *Raoultella* podem ser encontradas no solo, na água ou em plantas, além de espécimes clínicos e fezes (DRANCOURT et al., 2001). Espécies de *Raoultella* já foram associadas com reatores de produção de H₂ (MARONE et al., 2008 – não publicado), e podem ter sido favorecidas, no presente estudo, pela presença de carboidratos liberados a partir da celulose pelas espécies bacterianas celulolíticas.

Na degradação anaeróbia da celulose em ambientes naturais, há atuação de uma comunidade fisiologicamente diversa de microrganismos. A celulose é inicialmente despolimerizada por microrganismos celulolíticos em celobiose, celodextrinas e glicose. Estes açúcares são fermentados por microrganismos celulolíticos e também por outros fermentativos produzindo CO₂, H₂, ácidos orgânicos e álcoois. Os microrganismos consumidores de H₂, metanogênicos e homoacetogênicos, atuam produzindo CH₄ e ácido acético, respectivamente, além de CO₂. Desta forma a conversão de celulose em CH₄ e CO₂ é um resultado da atuação sintrófica de microrganismos. Em ambientes com sulfato disponível, BRS competem com metanogênicas pelo H₂ e o H₂S pode ser um importante produto da degradação da celulose (LESCHINE, 1995).

No presente estudo, parece ter acontecido tal qual em ambientes naturais de decomposição anaeróbia da celulose, onde a degradação da celulose por bactérias celulolíticas (possivelmente do gênero *Clostridium*) favoreceu o crescimento de bactérias fermentativas produtoras de H₂ (provavelmente dos gêneros *Clostridium* e *Klebsiella*) e também consumidoras de H₂ (possivelmente do gênero *Desulfovibrio*), além de outras que possam estar relacionadas à decomposição de produtos intermediários da degradação da celulose, como celobiose e xilanas (possivelmente do gênero *Clostridium* e da espécie *C. amygdalium*, respectivamente).

Relações sintróficas de protocooperação são relatadas em ambientes anaeróbios de decomposição da celulose (MURRAY, 1986; MORI, 1990; CAVEDON, CANALE-PAROLA, 1992). Cavedon e Canale-Parola (1992) analisaram a interação de uma bactéria

celulolítica mesófila (*Clostridium* sp.) e uma bactéria não-celulolítica (*Klebsiella* sp.), ambos isolados a partir de ambientes de água doce ricos em matéria vegetal em decomposição. As bactérias foram co-cultivadas em meio contendo celulose como fonte de carbono. Os açúcares solúveis liberados pela hidrólise da celulose por *Clostridium* sp. serviram como substratos fermentáveis para *Klebsiella* sp. Por sua vez, *Klebsiella* sp. produziu fatores de crescimento (biotina e ácido p-aminobenzóico), os quais foram requeridos por *Clostridium* sp. No presente estudo os gêneros *Clostridium* e *Klebsiella* foram identificados pelas análises de biologia molecular e podem estar atuando em mutualismo na degradação da celulose.

Na análise da população, oriunda de lodo de ETE da indústria de papel e celulose, esperava-se encontrar bactérias com capacidade de degradação de materiais lignocelulósicos e também bactérias produtoras de hidrogênio. Os resultados corroboraram com as expectativas, onde os gêneros bacterianos identificados na análise do gene RNAr 16S das OTUs estão, de alguma forma, relacionados com a produção de hidrogênio (OTUs 1, 2, 3 e 6) e/ou com substratos lignocelulósicos ou seus derivados (OTUs 4, 5 e 6). Tal fato está relacionado, além da origem do inóculo, com a ausência de pré-tratamento do mesmo que permitiu a manutenção de bactérias não formadoras de endósporos e também de consumidoras de H₂.

A árvore filogenética (Figura 5.15) foi construída a partir das sequências representativas das seis UTOs e das sequências similares analisadas do GenBank.

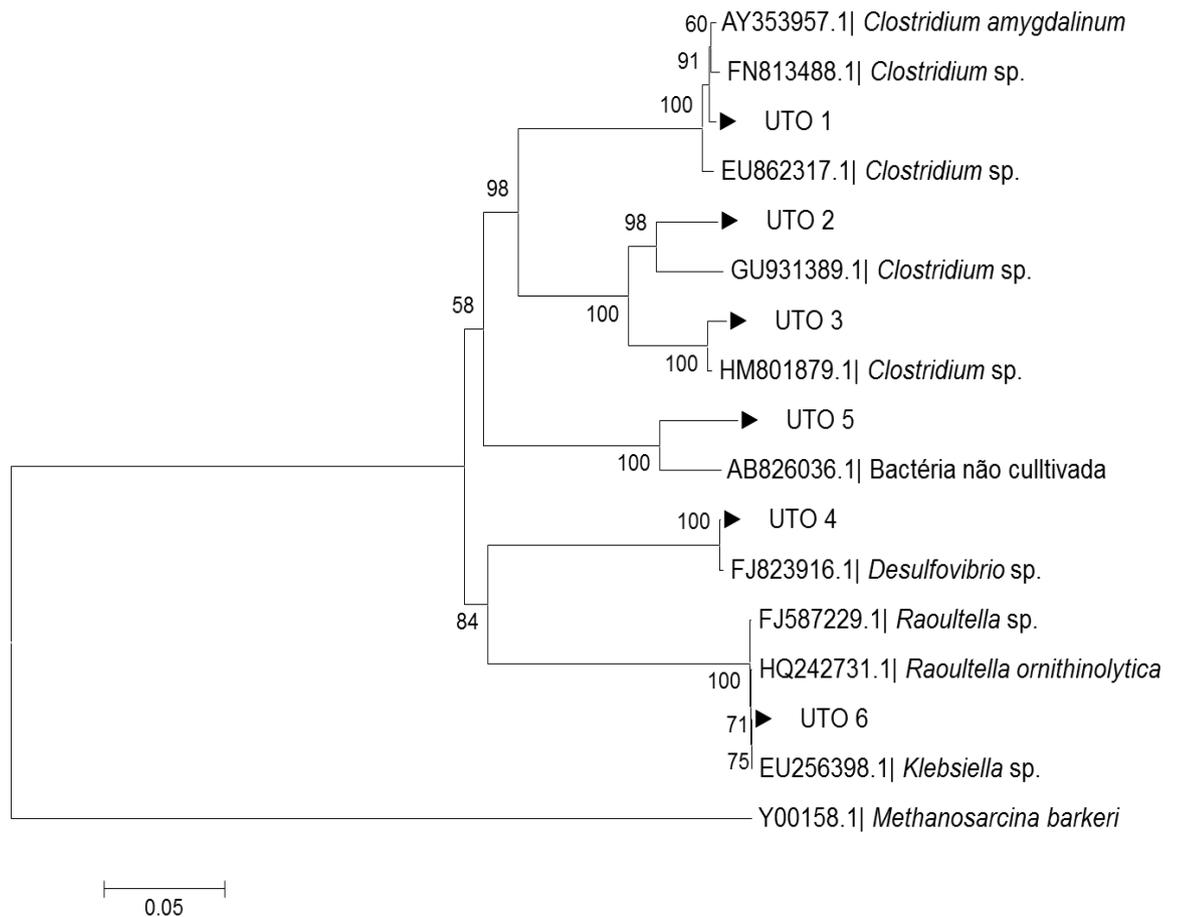


Figura 5.15: Árvore filogenética construída a partir de distâncias evolutivas inferidas utilizando o método Neighbor-Joining (SAITOU, NEI, 1987). A porcentagem de réplicas da árvore está apresentada perto dos ramos e foi calculada com base nos valores de bootstrap com 1000 réplicas (FELSENSTEIN, 1985). A análise evolutiva foi realizada utilizando o *software* MEGA 6 (TAMURA et al., 2013). Out-group: *Methanosarcina barkeri*.

5.5) Análise comparativa dos ensaios de produção de H₂

Resumo foi elaborado com os principais parâmetros do monitoramento dos ensaios de produção de H₂ (Tabela 5.12).

Tabela 5.12: Resumo dos parâmetros obtidos dos ensaios de produção de H₂ a partir de celulose

Parâmetro	E1		E2		E3	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
pH	7,7	6,1	7,8	6,0	7,8	5,4
ST (g.L ⁻¹)	5,6	6,0	8,6	9,2	13,2	14,6
H ₂ S (mg.L ⁻¹)	0	23,1	0	13,9	0	24,2
DQO (g.L ⁻¹)	2,0	4,7	2,3	6,9	2,4	9,3
Compostos orgânicos (g.L ⁻¹)						
Ácido Acético	0,056	1,1	0,054	1,4	0,049	1,2
Ácido Butírico	0,056	2,2	0,039	1,8	0,019	2,2
Ácido caprótico	0,016	0,47	0,025	0,35	0,029	0,8
Ácido Propiônico	0,38	0,57	0,37	0,21	0,31	0,40
Etanol	0	0,030	0	0,012	0	0,017
Consumo de carboidratos solúveis (%)	63,0		68,5		77,0	
<i>P</i> - Potencial de produção de H ₂ (mmol)	1,23		3,14		2,33	
<i>R_m</i> -Velocidade de produção (mmol H ₂ .d ⁻¹)	0,62		0,65		1,25	
<i>λ</i> - Fase <i>Lag</i> (dias)	2,87		4,67		4,37	
Rendimento (mmol H ₂ .g ⁻¹ de celulose)	0,62		0,63		0,23	
Bactérias identificadas pela clonagem e sequenciamento do gene rRNA 16S	<i>Clostridium</i> sp. <i>C. amygdalium</i> <i>Desulfovibrio</i> sp. <i>Raoultella</i> sp. <i>R. ornithinolytica</i> <i>Klebsiella</i> sp.					

A produção de H₂ nos três ensaios começou após o quarto dia de incubação, provavelmente por causa do período de conversão da celulose em açúcares solúveis, o que é condizente com a fase *Lag* de crescimento. O melhor potencial de produção de H₂ (3,14 mmol) e melhor rendimento (0,63 mmol.g⁻¹ de celulose) foram obtidos no ensaio E2, com 5,0 g.L⁻¹ de celulose, entretanto, estão abaixo daqueles reportados na literatura.

O ácido butírico foi o principal composto orgânico produzido, podendo-se inferir que foi a rota utilizada para produção de hidrogênio. Esta rota metabólica é característica de bactérias do gênero *Clostridium*, que foi identificado nas análises de biologia molecular.

Para as rotas de consumo de hidrogênio, pôde-se constatar a ocorrência de metanogênese, homoacetogênese e sulfetogênese, comprometendo 30,11 mmol de H₂ no ensaio E1, 11,1mmol de H₂ no ensaio E2 e 8,2 mmol de H₂ no ensaio E3. As rotas metabólicas de produção e consumo de H₂ ocorridas nos ensaio foram condizentes com os resultados da biologia molecular. As bactérias identificadas por meio da clonagem e sequenciamento do gene RNAr 16S foram relacionadas com estudos de produção de H₂ (*Clostridium* sp., *Klebsiella* sp. e *Raoultella* sp.), consumo de H₂ (*Clostridium* sp e *Desulfovibrio* sp.) e substratos lignocelulósicos (*Clostridium* sp., *Klebsiella* sp. e *Raoultella*

sp.). Com a identificação dos respectivos gêneros bacterianos, foi possível estabelecer um diagrama da degradação anaeróbia da celulose (Figura 5.16).

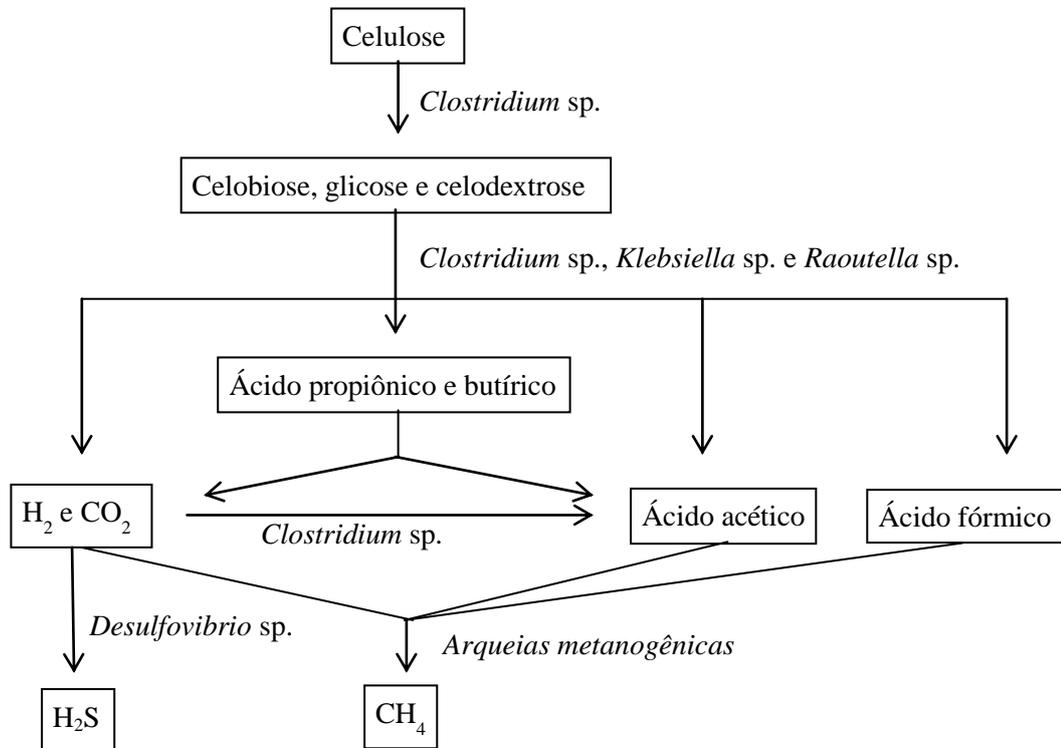


Figura 5.16: Diagrama representando a degradação anaeróbia da celulose com os gêneros bacterianos identificados pelas análises de clonagem e sequenciamento do gene RNAr 16S.

Apesar de não ter sido possível a identificação de nenhuma espécie celulolítica a partir das análises de biologia molecular, o gênero *Clostridium* foi identificado com 99% de similaridade. Espécies de *Clostridium* como *C. acetobutylicum* (MC COY et al., 1984), *C. homopropionicum* (DONER, SCHINK, 1991) e *C. thermocellum* (VILJOEN, et al., 1984) são reconhecidamente bactérias produtoras de celulases. No presente estudo, foi possível comprovar a formação e o consumo de carboidratos solúveis originados da celulose, atestando a presença de bactérias celulolíticas nos reatores de produção de H₂, que podem, provavelmente, pertencer ao gênero *Clostridium* identificado nas análises de biologia molecular.

6) CONCLUSÕES

Foi possível verificar produção de H₂ em reatores em batelada a partir de celulose como fonte de carbono e inóculo oriundo de lodo de ETE da indústria de papel e celulose.

Nas condições do presente estudo, a concentração de celulose em que se obteve maior potencial de produção de hidrogênio foi 5,0 g.L⁻¹.

A rota metabólica para produção de H₂ ocorreu via ácido butírico, que foi o principal composto orgânico obtido nos ensaios com diferentes concentrações de celulose.

As bactérias dos gêneros *Clostridium* sp., *Klebsiella* sp. e *Raoultella* sp., provavelmente, foram responsáveis pela produção de H₂ nos ensaios.

Com a utilização do inóculo misto sem pré-tratamento constatou-se rotas metabólicas de consumo de hidrogênio, fato corroborado pela identificação das bactérias relacionadas a estes metabolismos (*Clostridium* sp. e *Desulfovibrio* sp.).

É provável que espécies celulolíticas do gênero *Clostridium* tenham feito parte do consócio de bactérias do lodo de ETE industrial, já que não foi identificada nenhuma outra espécie celulolítica nas análises de biologia molecular.

7) RECOMENDAÇÕES

Foi verificado nesse estudo a produção de H₂ a partir de celulose com a utilização de lodo de ETE industrial como inóculo. Entretanto, com as experiências vivenciadas no presente trabalho, observou-se a necessidade de novos estudos a fim de potencializar a produção biológica de H₂ utilizando celulose como substrato:

- Avaliar diferentes pré-tratamentos no inóculo de lodo industrial com a ressalva de se manter as bactérias celulolíticas;
- Analisar o aumento do volume do *headspace* do reator ou despressurização do mesmo;
- Avaliar a agitação dos reatores em batelada para favorecer a transferência de substratos para as células suspensas;
- Avaliar a concentração de celulose e os produtos intermediários de hidrólise;
- Avaliar a possibilidade de considerar a produção de H₂ a partir de celulose em dois reatores, um destinado a hidrólise da celulose e outro destinado a fermentação do hidrolisado.

8) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APHA, AWWA, WEF. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 20th ed. American Public Health Association / American Water Works Association / Water Environment Federation, Washington, DC, USA, 2005.

ATLAS, R.M. Handbook of Media for Environmental Microbiology. 2nd edition. Boca Raton, CRC Press, 2005.

BALAT M. Gasification of biomass to produce gaseous products. *Energy Sources Part A*. v.31, p.516-526, 2009.

BALAT, H.; KIRTAY, E. Hydrogen from biomass e Present scenario and future prospects. *International Journal of Hydrogen Energy*, v35, p.7416-7426, 2010.

BÉGUIN, P.; AUBERT, J.P. The biological degradation of cellulose. [Review]. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 13, p. 25-58, 1994.

BLACKALL, L. L. Molecular identification of activated sludge foaming bacteria. *Water Science and Technology*, v.29, p.35–42, 1994.

BOROLE, A.; MIELENZ, J.R.; VISHNIVETSKAYA, T.A.; HAMILTON, C.Y. Controlling accumulatioes of fermentation inhibitors in biorefinery recycle water using microbial fuel cells. *Biotechnology for Biofuels*, v.2:7, 2009.

BOTTA, L.S. *Papel como fonte alternativa para produção anaeróbia de hidrogênio*. São Carlos. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2012.

BOTTA, L.S.; RATTI, R.P.; LAZARO, C.Z.; Sakamoto, I.S.; Varesche, M.B.A. Hydrogen generation from office paper by Clostridium. In: The International Conference on Hydrogen Production, 2012, Coréia. *The International Conference on Hydrogen Production*, v.1, 2012.

BRACELPA, Relatório Anual 2012-2013. Disponível em: <<http://www.bracelpa.org.br/bra2/sites/default/files/estatisticas/rel2012.pdf>>. Acesso em 11/03/2014. Associação Brasileira de Celulose e Papel, São Paulo, 2013

BRENNER, B.J.; FARMER, J.J. Family Enterobacteriaceae. In *Bergey's Manual of systematic Bacteriology*, v.2 Part B, p.587-607, 1984.

CANILHA, L.; CHANDEL, A.K.; MILESSI, T.S.S.; ANTUNES, F.A.F; FREITAS, W.L.C.; FELIPE, M.G.A.; SILVA, S.S. Bioconversion of Sugarcane Biomass into Ethanol: An Overview about Composition, Pretreatment Methods, Detoxification of Hydrolysates, Enzymatic Saccharification, and Ethanol Fermentation. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, p. 1-15, 2012.

CAVEDON, K.; CANALE-PAROLA, E.. Physiological interactions between a mesophilic cellulolytic *Clostridium* and a non-cellulolytic bacterium. *FEMS Microbiology. Ecology*, v.86, p.237-245, 1992.

- CHEN, W.; TSENG, Z.; LEE, K.; CHANG, J. Fermentative hydrogen production with *Clostridium butyricum* cgs5 isolated from anaerobic sewage sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 30, p. 1063-1070, 2005.
- CHEN, C.C; LIN, C.Y. Using sucrose as a substrate in an anaerobic hydrogen-producing reactor. *Advances in Environmental Research*, v.7, p.695–699, 2003.
- CHENG, C.L.; CHANG, J.S. Hydrolysis of lignocellulosic feedstock by novel cellulases originating from *Pseudomonas* sp. CL3 for fermentative hydrogen production. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 8628-8634, 2011.
- CHU, Y.; WEI, Y.; YUAN, X.; SHI, X. Bioconversion of wheat stalk to hydrogen by dark fermentation: Effect of different mixed microflora on hydrogen yield and cellulose solubilisation. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 3805-3809, 2011.
- CHUN, j. Computer classification and identification of actinomycetes. *Ph.D. Thesis, University of Newcastle upon Tyne, Newcastle upon Tyne, UK*, 1995.
- COLLERAN, E.; FINNEGAN, S.; LENS, P. Anaerobic treatment of sulphate-containing waste streams. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 67, p. 29-46, 1995.
- DABROCK, B.; BAHL, H.; GOTTSCHALK., G. Parameters affecting solvent production by *Clostridium pasteurianum*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.58, p.1233-1239, 1992.
- DAS, D. Advances in biohydrogen production processes: An approach towards commercialization. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 34, p. 7349-7357, 2009.
- DAS, D.; VEZIROGLU, T.N. Advances in biological hydrogen production processes. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 33, p. 6046-6057, 2008.
- DEL NERY, V. *Utilização de lodo anaeróbico imobilizado em gel no estudo da partida de reatores de fluxo ascendente com manta de lodo*. São Carlos. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos - Universidade de São Paulo, 1987.
- DEMAIN, A.L. Biosolutions to the energy problem. *Journal Industrial Microbiology Biotechnology*, v. 36, p. 319-332, 2009.
- DEMIRBAS A. Biohydrogen generation from organic wastes. *Energy Sources Part A* v.30, p.475-485, 2008.
- DONER; SCHINK. *Clostridium homopropionicum*. In *Bergey's Manual of systematic Bacteriology*, v.3, p.782, 1984.
- DRANCOURT, M.; BOLLET, C.; CARTA A.; ROUSSELIER, P. Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov. and *Raoultella planticola* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 51, p. 925-932, 2001.

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

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, v.28, p.350-356, 1956.

FELSENSTEIN, J. Confidence-Limites on Phylogenies – An Approach Using the Bootstrap. *Evolution*, v.30, p.783-791, 1985.

FERNANDES, B.S. *Produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fixo*. São Carlos. Tese (Doutorado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2008.

FOND, O.; PETITDEMANGE, E.; PETITDEMANGE, H.; ENGASSER, J-M. Cellulose fermentation by a coculture of a mesophilic cellulolytic *Clostridium* and *Clostridium acetobutylicum*. *Biotechnology and Bioengineering Symposium*, v.13, p.217-224, 1983.

GADOW, S.I.; JIANG, H.; WATANABE, R.; LI, Y-Y. Effect of temperature and temperature shock on the stability of continuous cellulosic-hydrogen fermentation. *Bioresource Technology*, v.142, p.304-311, 2013.

GENG, A.; HE, Y.; QIAN, C.; YAN, X.; ZHOU, Z. Effect of key factors on hydrogen production from cellulose in a co-culture of *Clostridium thermocellum* and *Clostridium thermopalmarium*. *Bioresource Technology*, v.101, p.4029-4033, 2010.

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

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

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

GRIMONT, P.A.D.; GRIMONT, F. Genus Klebsiella. In *Bergey's Manual of systematic Bacteriology*, v.2 Part B, p.685-694, 1984.

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

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

HO, K.L.; LEE, D.J.; SU, A.; CHANG, J.S. Biohydrogen from lignocellulosic feedstock via one-step process. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.37, p.15569-15574, 2012.

ISA, Z.; GRUSENMEYER, S.; VERSTRAETE, W. Sulfate reduction relative to methane production in high-rate anaerobic digestion: technical aspects. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 51, p. 572-579, 1986.

JAYASINGHEARACHCHI, H.S.; SINGH, S.; SARMA, P.M.; AGINIHOTRI, A.; LAL, B. Fermentative hydrogen production by new marine *Clostridium amygdalinum* strain C9 isolated from offshore crude oil pipeline. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 35, p. 6665-6673, 2010.

JEON, B.S.; KIM, B.C.; UM, Y.; SANG, B.I. Production of hexanoic acid from D-galactitol by a newly isolated *Clostridium* sp. BS-1. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.88, p.1161-1167, 2010.

JOGER, G.; WU, Z.; GARSCHHAMMER, K.; ENGEL, P.; KLEMENT, T.; RINALDI, R.; SPIESS, A.C.; BUCHS, J. Practical screening of purified cellobiohydrolases and endoglucanases with α -cellulose and specification of hydrodynamics. *Biotechnol Biofuels*, v.3, p. 18-30, 2001.

KALYUZHNYI, S.; FEDOROVICH, V.; LENS, P.; HULSHOFF POL, L.; LETTINGA, G. Mathematical modelling as a tool to study population dynamics between sulfate reducing and methanogenic bacteria. *Biodegradation*, v.9, p. 187–199, 1998.

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

KIRTAY, E. Recent advances in production of hydrogen from biomass. *Energy Conversion and Management*, v.52, p.1778-1789, 2011.

KOTAY, M.K.; DAS, D. Biohydrogen as a renewable energy resource – prospects and potentials. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.33, p. 258-263, 2008.

KRAEMER, J.T.; BAGLEY, D.M. Measurement of H₂ consumption and its role in continuous fermentative hydrogen production. *Water Science and Technology*, v.57, p.681-685, 2008.

KUDO, Y.; NAKAJIMA, T.; MIYAKI, T. OYAIZU. Methanogen flora of paddy soils in Japan. *FEMS Microbiology Ecology*, v.22, p.39-48, 1997.

KUEVER, J.; RAINEY, F.A.; WIDDEL, F. Family Desulfovibrionaceae. *In Bergey's Manual of systematic Bacteriology*, v.2 Part C, p.19, 1984.

LAKSHMIDEVI, R.; MUTHUKUMAR, K. Enzymatic saccharification and fermentation of paper and pulp industry effluent for biohydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.35, p.3389-3400, 2010.

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

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

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

LAZARO, C.Z.; VICH, D. V.; HIRASAWA, J. S.; VARESCHE, M. B. A. Hydrogen production and consumption of organic acids by a phototrophic microbial consortium. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 37, p. 11691-11700, 2012.

LESCHINE, S.B. Cellulose degradation in anaerobic environments. *Annual Reviews Microbiology*, v.49, p.399-426, 1995.

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

LIN, C.Y.; CHEN, H.P.; Sulfate effect on fermentative hydrogen production using anaerobic mixed microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.31, p.953-960, 2006.

LIN, C.Y.; HUNG, W-C. Enhancement of fermentative hydrogen/ethanol production from cellulose using mixed anaerobic cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.33, p.3660-3667, 2008.

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

LOGAN, B.E.; OH, S-E.; KIM, I.S.; van GINKEL, S. Biological hydrogen production measured in batch anaerobic respirometers. *Environmental Science and Technology*, v.36, p.2530-2535, 2002.

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

LYND, L.R.; LASER, M.S.; BRANSBY, D.; DALE, B.E.; DAVISON, B.; HAMILTON, R.; HIMMEL, M.; KELLER, M.; MCMILLAN, J.D.; SHEEHAN J.; WYMAN, C.E. How biotech can transform biofuels: For cellulosic ethanol to become a reality, biotechnological solutions should focus on optimizing the conversion of biomass to sugars. *Nature Biotechnology*, v. 26, p. 169-172, 2008.

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

MATHEWS J.; WANG G. Metabolic pathway engineering for enhanced biohydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.34, p.7404-7416, 2009.

MC COY; FRED; PETERSON; HASTINGS. *Clostridium acetobutylicum*. In *Bergey's Manual of systematic Bacteriology*, v.3, p.750-751, 1984.

MINEGATTI, D.V.O. *Análise da aplicação do sistema MBBR para o tratamento de efluentes da indústria de papel e celulose*. 43º Congresso e Exposição Internacional de Celulose e Papel. Associação Brasileira Técnica de Celulose e Papel, ABTCP. São Paulo, 2010.

MORI, Y. Characterization of a Symbiotic Coculture of *Clostridium thermohydrosulfuricum* YM3 and *Clostridium thermocellum* YM4. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 56, p.37-42, 1990.

MORIMOTO, K.; KIMURA, T.; SAKKA, K.; OHMIYA, K. Overexpression of a hydrogenase gene in *Clostridium paraputrificum* to enhance hydrogen gas production, *FEMS Microbiology Letters*, v.24, p.61-84, 1998.

MORIMOTO, M.; ATSUKO, M.; ATIF, A.A.Y.; NGAN, M.A.; FAKHRU, I.R.; IYUKE S.E. Biological production of hydrogen from glucose by natural anaerobic microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.29, p.709-713, 2004.

MURRAY, W.D. Symbiotic relationship of *Bacteroides cellulosolvens* and *Clostridium saccharolyticum* in cellulose fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, v.51, p.710-714, 1986.

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

NATH, K.; DAS, D. Hydrogen from biomass. *Current Science*, v.85, p.265-271, 2003

NUBEL, U.; NGELEN, B.; FELSKA, A.; SNAIDR, J.; WIESHUBER, A.; AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; BACKHAUSH. Sequence Heterogeneities of Genes Encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* Detected by Temperature Gradient Gel Electrophoresis. *Journal of Bacteriology*, v.178, p.5636-5643, 1996.

OLIVA, L. C.H.V. *Tratamento de esgotos sanitários com reator anaeróbio de manta de lodo (UASB). Protótipo: desempenho e respostas dinâmicas às sobrecargas hidráulicas*. São Carlos. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos – Universidade de São Paulo, 1997.

OLSEN, S.N.; LUMBY, E.; McFARLAND, K.; BORCH, K.; WESTH, P. kinetics of Enzymatic High-Solid Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass Studied by Calorimetry. *Appl Biochem Biotechnol*, v. 163, p. 626-635, 2011.

PARSHINA, S.N.; KLEEREBEZEM, R.; SANZ, J.L.; LETTINGA, G.; NOZHEVNIKOVA A.N.; KOSTRIKINA, N.A.; LYSENKO, A.M; STAMS, A.J.M. *Soehngenia saccharolytica* gen. nov., sp. nov. and *Clostridium amygdalinum* sp. nov., two novel anaerobic, benzaldehyde-converting bacteria. *International Journal Systematic Evolutionary Microbiology*, v.53, p.1791-1799, 2003.

PEIXOTO, G.; SAAVEDRA DEL AGUILA, N.K.; VARESCHE, M.B.A.; ZAIAT, M. Hydrogen production from soft-drink wastewater in an upflow anaerobic packed-bed reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.36, p.8953-8966, 2011.

RAMACHANDRAN U., WRANA N., CICEK N., SPARLING R., LEVIN D.B. Isolation and characterization of a hydrogen- and ethanol-producing *Clostridium* sp. strain URNW. *Canadian Journal of Microbiology*, v.57, p.236-243, 2011.

RAINEY, F.A.; HOLLEN, B.J.; SMALL, A. Genus *Clostridium*. In *Bergey's Manual of systematic Bacteriology*, v.3, p.736-828, 1984.

RAINEY, F.A. Class Clostridia. In *Bergey's Manual of systematic Bacteriology*, v.3, p.736-738, 1984.

RATTI, R.P.; BOTTA, L.S.; SAKAMOTO, I.K.; VARESCHE, M.B.A. Microbial diversity of hydrogen-producing bacteria in batch reactors fed with cellulose using leachate as inoculum. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 38, p. 9707-9717, 2013.

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

RYAN, P.; FORBES, C.; COLLERAN, E. Investigation of the diversity of homoacetogenic bacteria in mesophilic and thermophilic anaerobic sludges using the formyltetrahydrofolate synthetase gene. *Water Science and Technology*, v.57, p.675-680, 2008.

SAADY, N.M.C. Homoacetogenesis during hydrogen production by mixed cultures dark fermentation: unresolved challenge. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.38, p.13172-13191, 2013.

SAITOU, N.; NEI, N. The Neighbor-Joining Method – A new method for reconstructing phylogenetic Trees. *Molecular Biology and Evolution*, v.4, p.406-425, 1987.

SCHAEFFER, A.B., MACDONALD, F. A simplified method of staining endospores. *Science*, v. 77, p. 194, 1933.

SCHLEIFER, K. Phylum Firmicutes. In *Bergey's Manual of systematic Bacteriology*, v.3, p.19, 1984.

SKONIECZNY, M.T.; YARGEAU, V. Biohydrogen production from wastewater by *Clostridium beijerinckii*: Effect of pH and substrate concentration. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.34, p.3288-3294, 2009.

SUTO, M.; TOMITA, F. Induction and catabolite repression mechanisms of cellulase in fungi. *Journal Bioscience Bioengineering*, v. 92, p. 305-311, 2001.

TAMURA K.; STECHER G.; PETERSON D.; FILIPSKI A.; KUMAR S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729, 2013.

VALDEZ-VAZQUEZ, I.; RÍOS-LEAL, E.; ESPARZA-GARCÍA, F.; POSSI-VARALDO, H.M. Semi-continuous solid substrate anaerobic reactors for H₂ production from organic waste: mesophilic versus thermophilic regime. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.30, p.1383-1392, 2005.

VILJOEN; FRED; PETERSON. *Clostridium thermocellum*. In *Bergey's Manual of systematic Bacteriology*, v.3, p.824, 1984.

WANG, A.; REN, N.; SHI, Y.; LEE, D-J. Bioaugmented hydrogen production from microcrystalline cellulose using co-culture - *Clostridium acetobutylicum* X₉ and *Ethanoigenens harbinense* B₄₉ *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 33, p. 912-917, 2008.

WANG, J.L.; WAN, W. Comparison of different pretreatment methods for enriching hydrogen-producing cultures from digested sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 33, p. 2934-2941, 2008.

WANG, J.; WAN, W. Factors influencing fermentative hydrogen production: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.34, p.799-811, 2009.

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

WONG, K.K.Y.; TAN, L.U.L.; SADDLER, J.N. Multiplicity of β -1,4 Xylanase in Microorganisms: Functions and Applications. *Microbiological Reviews*, v.52, p.305-317, 1988.

WILSON. D.B. Cellulases and biofuels. *Currente Opinion in Biotechnology*, v.20, p.295-299, 2009.

WILSON, D.B. Microbial diversity of cellulose hydrolysis. *Current Opinion in Microbiology, Ecology and Industrial Microbiology*, v. 14, p. 259-263, 2011.

ZHANG, Y.H.P.; LYND, L.R. Towards an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulose systems. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 88, p. 797-824, 2004.

ZHANG, Y.H.P.; HIMMEL, M.E.; MIELENZ, J.R. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnology Advances*, v. 24, p. 452-481, 2006.

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

9) APÊNDICE

APÊNDICE I – Ajuste da produção acumulada de H_2 na Equação de Gompertz modificada para os ensaios de produção de H_2 a partir de celulose

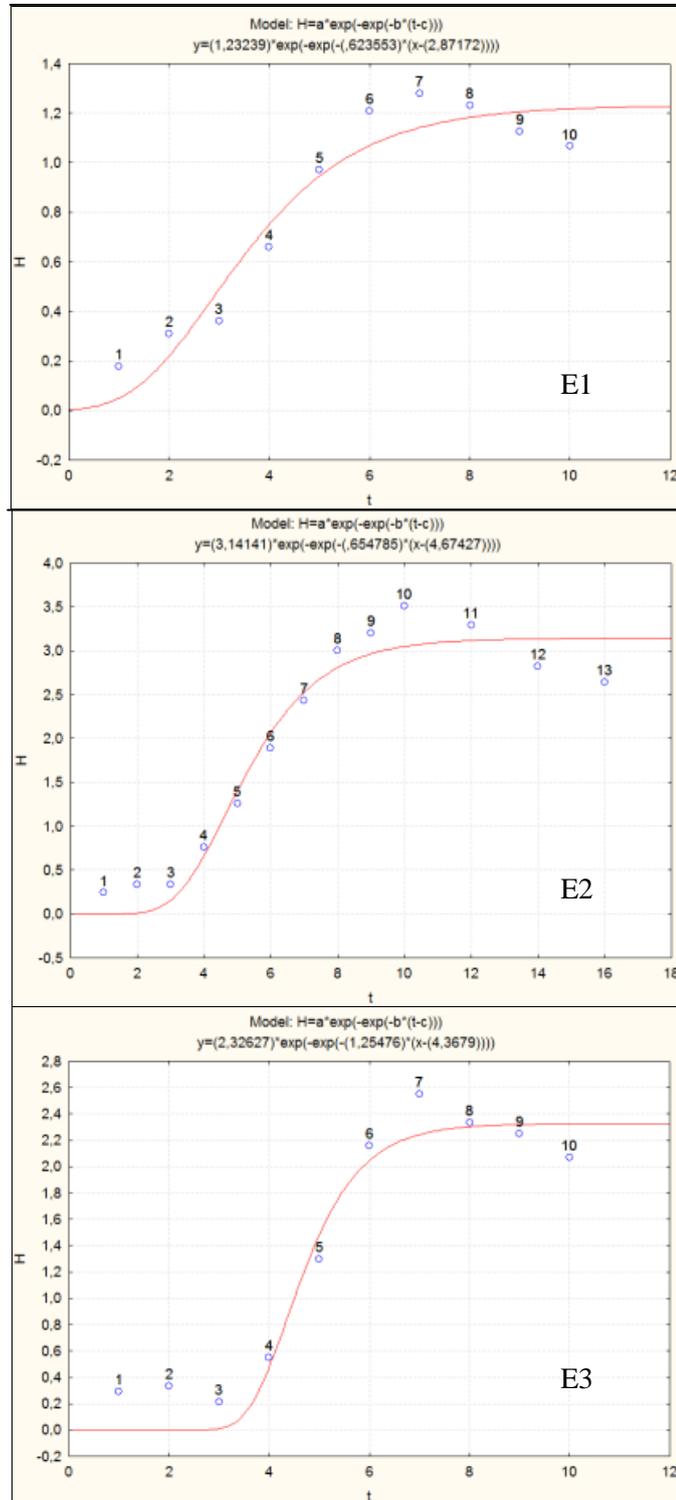


Figura 9.1: Produção acumulada de hidrogênio (H - mmol) em função do tempo (t - dias), ajustada ao modelo de Gompertz nos ensaios com $2,0g.L^{-1}$ (E1); $5,0g.L^{-1}$ (E2) e $10,0g.L^{-1}$ (E3) de celulose.

APÊNDICE II – Variação temporal da concentração de subprodutos orgânicos nos ensaios E1, E2 e E3
Limite de quantificação: 5 mg.L⁻¹

Tabela 9.1) Concentração dos subprodutos orgânicos gerados nos ensaios E1

Subprodutos (mg.L ⁻¹) no ensaio E1													
Dia	Etanol	Cítrico	Málico	Succínico	Lático	Fórmico	Acético	Propiônico	Iso-butírico	Butírico	Iso-valérico	Valérico	Capróico
0	<LQ	7,554	83,949	114,857	9,885	20,965	56,098	383,442	219,574	56,033	<LQ	<LQ	16,119
1	23,505	NQ	12,906	20,827	5,922	11,987	170,704	426,137	973,355	1453,129	283,064	19,637	665,158
3	25,756	5,459	8,886	26,240	11,980	14,550	371,097	558,954	156,354	1930,157	257,387	0,000	726,376
5	43,369	6,194	8,915	34,062	2,319	<LQ	713,695	612,530	133,794	2013,316	521,849	122,635	560,419
8	31,166	4,029	7,357	35,231	<LQ	58,566	723,349	499,202	110,557	1570,037	425,196	103,914	579,135
12	29,164	4,099	7,677	31,210	<LQ	25,334	878,117	447,362	96,024	1672,679	214,878	167,370	526,725
14	17,684	<LQ	<LQ	35,199	<LQ	24,655	942,853	493,737	89,078	2226,184	278,821	91,152	553,738
16	29,819	5,534	5,983	39,334	7,448	33,962	1101,914	568,981	106,575	2161,510	306,422	<LQ	466,070

LQ = limite de quantificação

Tabela 9.2) Concentração dos subprodutos orgânicos gerados nos ensaios E2

Subprodutos (mg.L ⁻¹) no ensaio E2													
Dia	Etanol	Cítrico	Málico	Succínico	Lático	Fórmico	Acético	Propiônico	Iso-butírico	Butírico	Iso-valérico	Valérico	Capróico
0	<LQ	5,878	131,060	103,513	50,620	<LQ	53,819	372,168	208,872	39,626	<LQ	<LQ	25,163
1	34,949	5,102	12,563	20,776	15,187	14,350	227,369	439,707	1224,242	1375,125	349,796	14,155	433,480
3	30,680	4,896	6,691	15,445	<LQ	16,868	400,540	158,579	93,774	2032,262	260,240	136,756	507,460
5	25,270	5,552	5,708	50,719	<LQ	75,344	559,695	186,643	92,698	1443,987	236,413	210,303	358,932
8	31,839	<LQ	5,797	51,435	13,562	135,975	953,892	167,377	187,894	1751,877	551,145	10,376	550,071
12	22,059	<LQ	9,485	37,907	<LQ	112,471	953,418	221,929	214,051	1476,124	584,609	9,471	790,757
14	14,415	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	93,566	956,347	211,900	212,348	1841,109	680,009	8,594	841,093
16	12,403	<LQ	<LQ	36,732	5,664	84,003	1407,473	214,474	241,017	1822,056	701,694	<LQ	350,975

LQ = limite de quantificação

Tabela 9.3) Concentração dos subprodutos orgânicos gerados nos ensaios E3

Subprodutos (mg.L ⁻¹) no ensaio E3													
Dia	Etanol	Cítrico	Málico	Succínico	Lático	Fórmico	Acético	Propiônico	Iso-butírico	Butírico	Iso-valérico	Valérico	Capróico
0	< LQ	5,898	56,486	95,457	14,847	15,781	48,749	306,716	221,154	19,311	4,294	8,536	28,977
1	49,872	3,907	11,242	24,625	8,647	25,768	318,272	328,900	1438,317	1924,653	387,924	49,809	419,705
3	36,484	5,210	7,615	10,396	6,051	7,989	499,397	310,985	98,937	1931,527	665,486	0,000	961,261
5	26,743	< LQ	7,338	53,042	< LQ	20,690	819,509	307,081	102,036	1875,454	730,107	179,831	259,509
8	43,327	4,791	4,053	74,465	7,624	53,779	1293,241	426,253	168,687	1554,421	685,054	115,771	857,279
12	31,578	< LQ	< LQ	49,304	7,451	51,666	1223,750	444,472	156,146	1403,373	636,935	195,017	848,782
14	21,221	< LQ	< LQ	45,432	< LQ	40,440	1340,290	439,155	149,013	2343,535	494,728	171,501	923,407
16	17,105	< LQ	< LQ	39,198	3,067	33,253	1213,320	404,331	130,150	2211,892	577,051	187,614	801,680

LQ = limite de quantificação

APÊNDICE III – Variação temporal da concentração de CH₄ nos ensaios E1, E2 e E3

	CH ₄ (mmol)						
	Dia 8	Dia 9	Dia 10	Dia 12	Dia 14	Dia 16	Dia 17
E1	NQ	0,05	0,067	0,23	0,39	0,54	0,54
E2	NQ	NQ	0,00027	0,28	0,69	0,52	1,01
E3	0,036	0,28	0,62	0,41	0,58	0,04	0,09

NQ = não quantificável

APÊNDICE IV – Variação temporal da concentração de H₂S nos ensaios E1, E2 e E3

	H ₂ S (mg.L ⁻¹)		
	Dia 0	Dia 5	Dia 16
E1	ND	2,5	23,1
E2	ND	1,3	13,9
E3	ND	3,6	24,2

ND = não detectado

