UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA HIDRÁULICA E
SANEAMENTO

BRUNA SOARES FERNANDES

PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO EM REATOR ANAERÓBIO DE LEITO FIXO

São Carlos

2008

BRUNA SOARES FERNANDES

PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO EM REATOR ANAERÓBIO DE LEITO FIXO

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

Área de concentração: Hidráulica e Saneamento.
Orientador: Prof. Assoc. Marcelo Zaiat.

São Carlos
2008

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

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

F363p Fernandes, Bruna Soares
 Produção de hidrogênio em reator anaeróbico de leito
 fixo / Bruna Soares Fernandes ; orientador Marcelo Zaiat.
 -- São Carlos, 2008.

 Tese (Doutorado-Programa de Pós-Graduação e Área de
 Concentração em Hidráulica e Saneamento) -- Escola de
 Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo,
 2008.

 1. Águas residuárias. 2. Hidrogênio. 3. Inóculos.
 4. Material suporte. 5. Reator anaeróbico. I. Título.

Aos meus pais, Paulo e Eliane, meus maiores incentivadores, conselheiros, a quem devo todo meu amor, carinho e admiração.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela oportunidade da vida, pela saúde, pelas intuições e por mais uma vitória.

Ao Prof. Associado Marcelo Zaiat, mais que um orientador, um amigo, um grande incentivador e um verdadeiro líder, que nos cinco anos de convivência contribuiu para meu crescimento profissional e pessoal.

Ao Prof. Titular Eugenio Foresti, um grande líder, pelo carinho e ensinamentos.

À Professora Maria Bernadete Varesche, com admiração, pela confiança e ensinamentos.

Aos professores Campos, Eduardo Pires, Wiclef, Tininho, Maria do Carmo Caliajuir, Reali, Edson, Valdir, Jurandir, Frederico e Mônica pelos conselhos e ensinamentos.

Aos técnicos: Maria Ângela, Prof.a Elizabeth Moraes, Eloisa Pozzi, Paulo e Wagner, pela ajuda de todas as horas e amizade.

Aos funcionários, Rosinha, Pavi, Sá, Flávia, Fernanda, Roberto Bergamo, Penase, Edson, Moseti, Terezinha, Márcia e Jaqueline, pela ajuda de toda hora e amizade.

Aos amigos de todas as horas, Mercia Domingues, Rogers Ribeiro, Samantha Pinho, Monique Salgado, Glauce, Gabriel, Betão, Arnaldão, Leo, Julinha, Cris Iamamoto, Katita, Alexandre Ono, Sandra Maintinguer, Wuzinho, pelo apoio e amizade.

Aos companheiros de pesquisa, Karina, Luana, Madalena, Flavinha, Ana Paula, Estela, Eduardo, Renato, Dirlane, Sidney, André, Luis Ricardo, Denise, Giovana, Katt, Carol, Luis Amilton, Leonídia, Tininha, Kelly, Lorena, Joel, Renata Cuba, Andrea, Fernandão, Isabel, Márcia, Edson, Fábio Chinalia, Renata, Ari, Dalva, Daniele Vich, Larissa, Lara, Julinha, Valquiria, Maurício, Matheus, Marília, Lili, Aline, Renata, Guilherme, César, Marília, Amanda, Aline, Ana Flavia, pela paciência e companheirismo.

À Dra. Lara Durães Sette, pela confiança e apoio.

À Escola de Engenharia de São Carlos, pela oportunidade de realização de curso de doutorado.

À FAPESP pela concessão da bolsa de doutorado e pelo apoio financeiro.

Ao Departamento de Hidráulica e Saneamento, por colocar a disposição a área experimental.

Aos meus irmãos, Janine e Leonardo e a esposa Sueli, ao Gustavo, e toda minha família, pelo apoio, carinho e amor.

A todas as pessoas, que de alguma forma contribuíram para que meu trabalho fosse realizado, minha sincera gratidão.

“The more you study, the more you learn. The more you learn the more you know. The more you know the more you forget. The more you forget the less you know”

Don Akchin

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1: Esquema simplificado proposto para produção de hidrogênio (TANISHO et al., 1998).	12
Figura 4.1: Etapas desenvolvidas durante o projeto	17
Figura 4.2: (a) Desenho esquemático do reator anaeróbico de leito fixo de fluxo ascendente (unidade em mm) e (b) Foto do reator.	18
Figura 4.3: Figura esquemática do reator em batelada	20
Figura 5.1: Amostras dos materiais suporte cortados nas dimensões para aplicação nos reatores (a) Argila expandida, (b) carvão vegetal e (c) polietileno de baixa densidade.	37
Figura 5.2: a) Polietileno cortado e b) Arranjo para obtenção da porosidade de 75%	40
Figura 5.3: a) Polietileno cortado e b) Arranjo para obtenção da porosidade de 91%	41
Figura 5.4: Foto do experimento, reatores contendo os diferentes inóculos.	43
Figura 5.5: Foto do experimento, reatores contendo diferentes substratos, em duplicata.	43
Figura 6.1: (a) Concentração de sacarose por tempo de operação dos reatores para TDH de 2 h e (b) Eficiência de conversão de sacarose por tempo: (□) Afluente, (■) Argila, (○) Carvão e (●) Polietileno.	45
Figura 6.2: Variação de pH durante a operação dos reatores (TDH de 2 h): (■) Argila, (○) Carvão e (●) Polietileno.	47
Figura 6.3: Produtos da degradação da sacarose obtidos no processo de operação com TDH de 2 h para os reatores com (■) Argila, (○) Carvão e (●) Polietileno. a) Ácido acético; b) Ácido butírico; c) Etanol e d) Butanol.	47
Figura 6.4: Produção de hidrogênio durante o processo de operação dos reatores para TDH de 2 h: (■) Argila, (○) Carvão e (●) Polietileno.	48
Figura 6.5: a) Eficiência de remoção de sacarose no perfil espacial para TDH de 2 h: (■) Argila, (○) Carvão e (●) Polietileno; b) pH obtido no perfil espacial para TDH de 2h: (■) Argila, (○) Carvão e (●) Polietileno.	49
Figura 6.6: (a) - Concentração de sacarose por tempo de operação dos reatores para TDH de 0,5 h; (b) Eficiência de conversão de sacarose por tempo de operação dos reatores e (c) variação de pH no efluente dos reatores: (□) Afluente, (■) Argila, (○) Carvão e (●) Polietileno.	50
Figura 6.7: Produção de hidrogênio durante o processo de operação dos reatores para	51

TDH 0,5 h: (■) Argila, (○) Carvão e (●) Polietileno.

Figura 6.8: Produtos da degradação da sacarose obtidos no processo de operação 52 com TDH de 0,5 h para os reatores com (■) Argila, (○) Carvão e (●) Polietileno. a) Ácido acético; b) Ácido butírico; c) Etanol e d) Butanol.

Figura 6.9: (a) Eficiência de conversão da sacarose; (b) pH ao longo do reator para 54 TDH de 0,5 h: (■) Argila, (○) Carvão e (●) Polietileno.

Figura 6.10: Microscopia ótica dos microrganismos presentes nos reatores: (a) 55 bacilos e leveduras presentes no ponto de amostragem 6 do reator com Carvão (TDH de 2 h); (b) bacilos presentes no ponto de amostragem 2 do reator com Polietileno (TDH de 2 h); (c) Microscopia ótica dos microrganismos presentes nos reatores (TDH de 0,5 h) e (d) bacilos e leveduras presentes no reator com Argila, (b) bacilos e leveduras presentes no reator com Carvão (TDH de 0,5 h).

Figura 6.11: Microscopia ótica de luz comum no final da operação dos reatores 57 (TDH de 0,5 h e 2 h): (a) bacilos Gram negativos no ponto 0 do reator com Carvão (TDH 2 h), (b)) bacilos Gram negativos e positivo no ponto 5 do reator com Polietileno (TDH 2 h), e (c) bacilos Gram negativos e positivo do reator com Argila (TDH 0,5 h) (Escala 5µm)

Figura 6.12: Visualização das bandas no gel de DGGE para “*primer*” de Domínio 57 Bactéria, gradiente 30%-70%. Para os TDHs de 2 e 0,5 h a materiais suportes: (A 0,5) Argila a TDH de 0,5 h, (C 0,5) Carvão a TDH de 0,5 h, (P 0,5) Polietileno a TDH de 0,5 h, (A 2) Argila a TDH de 2 h, (C 2) Carvão a TDH de 2 h, (P 2) Polietileno a TDH de 2 h.

Figura 6.13: (a) Porcentagem de remoção de sacarose para os sistemas operados na 59 segunda fase e (b) pH no efluente dos reatores: (▲) porosidade de 50%; (b) (■) porosidade de 75% e (c) (●) porosidade de 91%

Figura 6.14: Produção de hidrogênio para os sistemas (segunda fase) (a) (▲) 61 porosidade de 50%; (b) (■) porosidade de 75% e (c) (●) porosidade de 91%; (d) arraste de biomassa ao longo do processo (▲) porosidade de 50%; (■) porosidade de 75% e (●) porosidade de 91%.

Figura 6.15: Produção de etanol para os sistemas: (▲) porosidade de 50%; (■) 62 porosidade de 75% e (●) porosidade de 91%

Figura 6.16: Formação de ácidos para os reatores com diferentes porosidades (a) 63 50%; (b) 75% e (c) 91% durante o período operacional (■) ácido acético,

(○) Ácido Capróico e (●) Ácido Butírico e (▲) Ácido Fórmico (△) Ácido Lático.

Figura 6.17: (a) Eficiência de conversão de sacarose; (b) pH ao longo do reator para TDH de 0,5 h: espacial (▲) porosidade de 50%; (■) porosidade de 75% e (●) porosidade de 91%

Figura 6.18: Microscopia ótica da biomassa presente nos reatores com diferentes porosidades: (a) 50%; (b) 75% e (c) 91%.

Figura 6.19: Visualização das bandas no gel de DGGE para “*primer*” de Domínio Bactéria, gradiente 30%-70% para os reatores operados com diferentes porosidades: 50%, 75% e 91%, na segunda fase. (As bandas seqüenciadas estão enumeradas de 1 a 3)

Figure 6.19: Árvore filogenética de consenso baseado nas seqüências das bandas recortadas do DGGE com *primers* para o Domínio *Bacteria*, das amostras provenientes do biofilme nos reatores contendo diferentes porosidades: 50%, 75% e 91%. Os valores presentes nos nós das árvores indicam porcentagens que o ramo se repitiu (500 reamostragens de bootstraps)

Figura 6.20: DGGE de seqüências de Rdna 18S de amostras de linhagens referência e as amostras de biomassa 1 (75% de porosidade) e 2 (91% de porosidade)

Figura 6.21: Análise filogenética de seqüências de rDNA 18S obtidas das amostras de leveduras (Kimura 2p e *neighbor-joining*, software MEGA 3.0). Valores de *bootstrap* ≥ 65 observados na árvore.

Figura 6.22: Produção de hidrogênio específica para os diferentes inóculos: A - (■), B - (○), C- (△) e D - (▽)

Figura 6.23: Concentração de Sacarose no final do experimento para os reatores operados com diferentes inóculos (A- argila, B – Carvão, C – Polietileno, D – Tratado termicamente).

Figura 6.24: Produção de ácidos para os reatores operados com diferentes inóculos (A- argila, B – Carvão, C – Polietileno, D – Tratado termicamente).

Figura 6.25: Produção de álcoois para os reatores operados com diferentes inóculos (A- argila, B – Carvão, C – Polietileno, D – Tratado termicamente).

Figura 6.26: Biomassa presente nos reatores com inóculos provenientes de (a) Argila e (b); Avícola.

Figura 6.27: Produção de hidrogênio no headspace dos reatores em batelada

contendo diferentes águas residuárias:(▲) vinhaça;(◆) sacarose;(●) esgoto sanitário e (■) glicerina

Figura 6.28: Conversão de Carboidrato nos reatores em batelada contendo diferentes 76
águas residuárias:(▲) vinhaça;(◆) sacarose;(●) esgoto sanitário e (■) glicerina

Figura 6.29: Concentração de matéria orgânica (como DQO) nos reatores em 76
batelada contendo diferentes águas residuárias:(▲) vinhaça;(◆) sacarose;(●) esgoto sanitário e (■) glicerina

Figura 6.30: Produção de hidrogênio por grama de SSV dos reatores em batelada 77
contendo diferentes águas residuárias:(▲) vinhaça;(◆) sacarose;(●) esgoto sanitário e (■) glicerina

Figura 6.31: Porcentagem de ácidos ao final do processo operado com diferentes 78
águas residuárias.

Figura 6.32: Produção de etanol nos reatores em batelada contendo diferentes águas 79
residuárias:(▲) vinhaça;(◆) sacarose;(●) esgoto sanitário e (■) glicerina

Figure 6.33: Visualização das bandas no gel de DGGE para “*primer*” de Domínio 80
Bactéria, gradiente 30%-70%.: I – Inóculo; S- Sacarose; ES – Esgoto Sanitário; V – Vinhaça e G - Glicerol. (Bandas sequenciadas enumeradas de 1 a 9)

Figura 6.34: Análises microscópicas da biomassa nos reatores da terceira fase 81
contendo diferentes águas residuárias: (a) sacarose; (c) vinhaça; (e) inóculo; Análises de Gram: (b) sacarose; (d) glicerina e (f) inóculo.

Figura 6.35: Árvore filogenética de consenso baseado nas seqüências das bandas 82
recortadas do DGGE com *primers* para o Domínio *Bacteria*, das amostras provenientes dos reatores contendo diferentes águas residuárias. Os valores presentes nos nós das árvores indicam porcentagens que o ramo se repitiu (500 reamostragens de *bootstraps*).

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1: Comparação do custo da rede de produção de hidrogênio para sistemas com baixa capacidade 100 – 1000 Nm ³ H ₂ .h-1.	3
Tabela 2.2: Comparação de produção de hidrogênio para reator de leito fixo e fluidizado.	7
Tabela 2.3: Principais reações envolvidas na fermentação da glicose.	11
Tabela 4.1: Composição de água residuária sintética utilizada. (adaptação do meio DEL NERY, 1987)	19
Tabela 4.2: Caracterização dos efluentes brutos utilizados.	21
Tabela 4.3: Composição dos nutrientes utilizados. (adaptação do meio DEL NERY, 1987)	22
Tabela 4.4: Procedimento para o preparo da solução de PCR para uma amostra	27
Tabela 4.5: Programação do aparelho termociclador para amplificação dos fragmentos de ácidos nucleicos para as análises de PCR	28
Tabela 4.6: Primers utilizados nas análises com PCR	28
Tabela 4.7: Procedimentos para o preparo do gel em gradiente desnaturante para o volume de 100 ml	29
Tabela 4.8: Constituição das soluções de gel desnaturante para o Domínio Bacteria	30
Tabela 4.9: - Procedimento para preparo da amostra a ser seqüenciada	32
Tabela 4.10: Programa amplificação do gene RNA ribossomal 18S. (adaptado de GOMES et al., 2003).	34
Tabela 5.1: Características dos materiais suportes	38
Tabela 5.2: Características granulométricas dos materiais suportes - TDH 2 h.	38
Tabela 5.3: Características granulométricas dos materiais suportes – TDH 0,5 h.	39
Tabela 5.4: Porosidade dos leitos obtidos para os TDHs de 0,5 h e 2 h.	39
Tabela 5.5: Características granulométricas do polietileno para as diferentes porosidades.	40
Tabela 5.6: Dados de operação dos reatores na primeira fase da primeira etapa TDH de 2 h.	41
Tabela 5.7: Dados de operação dos reatores na primeira fase da primeira etapa TDH de 0,5 h.	42
Tabela 5.8: Dados de operação dos reatores na segunda fase da primeira etapa.	42
Tabela 6.1: Redução do volume útil dos leitos ao final dos do processo, após 89 dias, para TDH de 2 h.	46

Tabela 6.2: Redução do volume útil do leito ao final da operação com TDH de 0,5 h	51
Tabela 6.3: Máxima relação obtida de mols de hidrogênio produzido por mol de sacarose convertida para TDHs de 0,5 e 2 h.	53
Tabela 6.4: Informação das seqüências obtidas das bandas recortadas no DGGE com primers para o Domínio Bacteria de amostras provenientes dos reatores.	58
Tabela 6.5: Redução do volume útil do leito no final do processo para a segunda fase.	60
Tabela 6.6: Rendimento de produção de hidrogênio para diferentes porosidades de leito.	60
Tabela 6.7: Informação das seqüências obtidas das bandas recortadas no DGGE com primers para o Domínio Bacteria de amostras provenientes dos reatores, para a segunda fase.	60
Tabela 6.8: Dados dos clones e espécies de fungos (leveduras) proximamente relacionadas no BLAST.	68
Tabela 6.9: Massa microbiana e atividade específica de produção de hidrogênio dos reatores em batelada com diferentes inóculos.	71
Tabela 6.10: Subprodutos da conversão da sacarose para os diferentes inóculos (A- argila, B – Carvão, C – Polietileno, D – Tratado termicamente).	73
Tabela 6.11: Comparativo entre os dados rendimento de produção de hidrogênio e mol de hidrogênio por mol de substrato da segunda etapa (diferentes inóculos) e da literatura.	74
Tabela 6.12: Máxima atividade específica de produção de hidrogênio e concentração de biomassa ao final da batelada operada com diferentes águas residuárias.	77
Tabela 6.13: Concentração de ácidos no início e no final do processo operado com diferentes águas residuárias.	78
Tabela 6.14: Comparação entre processos de produção de hidrogênio usando diferentes águas residuárias.	79
Tabela 6.15: Informação das seqüências obtidas das bandas recortadas no DGGE com primers para o Domínio <i>Bacteria</i> de amostras provenientes dos reatores operados com diferentes inóculos.	82
Tabela 6.12: Máxima atividade específica de produção de hidrogênio e concentração de biomassa ao final da batelada operada com diferentes águas residuárias.	82

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1 Interesse pelo hidrogênio e o cenário energético atual	2
2.2 Produção biológica de hidrogênio e fatores associados	3
2.2.1 Temperatura associada à produção de Hidrogênio	4
2.2.2 pH associado à produção de hidrogênio	5
2.2.3 Imobilização da biomassa em reatores	5
2.2.4 Configurações de reatores	6
2.2.5 Tempo de detenção hidráulica	7
2.2.6 Substratos	8
2.2.7 Inóculo	8
2.2.8 Rotas de produção de hidrogênio	10
2.2.9 Potencial energético	12
2.3 Considerações finais	14
2.4 Ressalva	14
3. OBJETIVOS	16
4. MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1 Material	18
4.1.1 Primeira etapa – Reatores Anaeróbios	18
4.1.1.1 Reator Anaeróbio de Leito Fixo Ascendente	18
4.1.1.2 Meio suporte	19
4.1.1.3 Meio de alimentação	19
4.1.1.4 Inóculo	19
4.1.2 Segunda etapa - Diferentes Inóculos	20
4.1.2.1 Reator em Batelada	20
4.1.2.2 Meio de alimentação	20
4.1.2.3 Inóculos	20
4.1.3 Terceira etapa - Diferentes Águas Residuárias	21
4.1.3.1 Reator em Batelada	21
4.1.3.2 Efluentes brutos	21

4.1.3.3 Meio de alimentação	21
4.1.3.4 Inóculo	22
4.2 Métodos	22
4.2.1 Métodos Analíticos	22
4.2.1.1 Análise de ácidos voláteis por cromatografia	22
4.2.1.2 Análise de álcoois por cromatografia	23
4.2.1.3 Análise de ácidos, acetona e álcoois (segunda e terceira etapas) por cromatografia	23
4.2.1.4 Análise do biogás por cromatografia	24
4.2.2 Exames Microbiológicos	25
4.2.2.1 Microscopia óptica	25
4.2.2.2 Coloração de Gram	26
4.2.2.3 Análises de Biologia Molecular das Bactérias	26
4.2.2.3.1 Extração dos Ácidos Nucléicos	26
4.2.2.3.2 Amplificação do fragmento do gene RNAr 16S através da reação de polimerização em cadeia – PCR	27
4.2.2.3.3 Eletroforese em gel de agarose	28
4.2.2.3.4 Eletroforese em gel de gradiente desnaturante	29
4.2.2.3.5 Recorte das Bandas presentes nos Ensaio	31
4.2.2.3.6 Purificação do Produto do PCR para reação de seqüenciamento	31
4.2.2.3.7 Reação de seqüenciamento	32
4.2.2.4 Caracterização dos fungos - PCR-DGGE / Árvore Filogenética	33
4.2.2.4.1 Extração de DNA a partir das amostras de lodo	33
4.2.2.4.2 Amplificação do gene RNA ribossomal 18S	34
4.2.2.4.3 DGGE de seqüências de DNAr 18S amplificadas a partir das amostras de biomassa	34
4.2.2.4.4 Isolamento (extração) de bandas do gel de DGGE	34
4.2.2.4.5 Clonagem e seqüenciamento	35
4.2.2.4.6 Análise filogenética	35
4.2.3 Ajuste Matemático	36
5. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	37
5.1 Primeira Etapa - Reatores Anaeróbios	37
5.1.1 Primeira Fase – Diferentes suportes e TDHs	37
5.1.1.1 Caracterização do Material Suporte	37

5.1.1.1.1 Corte dos materiais suportes	37
5.1.1.1.2 Caracterização dos materiais suportes	37
5.1.1.1.3 Ensaio de granulometria dos materiais suportes	38
5.1.1.1.4 Porosidade do Leito	39
5.1.2 Segunda Fase –Diferentes Porosidades	39
5.1.2.1 Caracterização do Material Suporte	39
5.1.2.1.1 Ensaio de granulometria dos materiais suportes	40
5.1.2.1.2 Porosidade do Leito	40
5.1.3 Imobilização da Primeira Etapa	41
5.1.4 Operação na Primeira Etapa – Reator Anaeróbio de fluxo ascendente	41
5.1.4.1 Operação dos reatores da Primeira Etapa	41
5.2 Segunda Etapa - Diferentes Inóculos	42
5.3 Terceira Etapa - Diferentes Águas Residuárias	43
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
6.1 Primeira Etapa – Reatores Anaeróbios de Fluxo Ascendente	44
6.1.1 Primeira Fase – Diferentes suportes e TDHs	44
6.1.1.1 Operação dos reatores – TDH de 2 h	44
6.1.1.2 Perfil de conversão de sacarose e produção de ácidos e álcoois – TDH de 2 h	48
6.1.1.3 Operação dos reatores - TDH de 0,5 h	49
6.1.1.4 Perfil de conversão de sacarose e produção de ácidos e álcoois - TDH de 0,5 h	54
6.1.1.5 Análise Microbiana comparativa para os diferentes TDHs aplicados	55
6.1.2 Segunda Fase - Diferentes Porosidades de Leito	58
6.1.2.1 Operação dos reatores na segunda fase	58
6.1.2.2 Perfil de conversão de sacarose e produção de ácidos e álcoois da segunda fase	64
6.1.2.3 Análise Microbiana da segunda fase	64
6.2 Segunda Etapa – Diferentes Inóculos	70
6.2.1 Operação dos Reatores em Batelada da segunda etapa	70
6.2.2 Análise Microbiana de segunda etapa	74
6.3 Terceira Etapa - Produção de Hidrogênio/ Diferentes águas residuárias	75
6.3.1 Operação dos Reatores em Batelada na terceira etapa	75
6.3.2 Análise Microbiana da terceira etapa	80
7. CONCLUSÕES	83
8. PERSPECTIVAS FUTURAS	84
REFERÊNCIAS	85

RESUMO

FERNANDES, B. S. **Produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fixo**. 2008. 100f. Tese (Doutorado) Departamento de Hidráulica e Saneamento, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

O hidrogênio é estudado como alternativa ao uso de combustíveis fósseis para geração de energia, uma vez que é um combustível renovável, apresenta alta concentração de energia por unidade de massa e não gera gases causadores do efeito estufa. Entre os processos de produção de hidrogênio destaca-se o processo fermentativo, pois é um processo de baixo custo quando comparado com outros processos e possibilita unir tratamento de efluente e geração de energia. Neste sentido, este trabalho teve como proposta estudar parâmetros envolvidos no processo de produção fermentativo do H_2 . O trabalho envolveu três etapas. Na primeira etapa, foi estudada a produção de hidrogênio a partir de sacarose empregando Reatores Anaeróbios de Leito Fixo de Fluxo Ascendente. Na primeira fase, comparou-se o desempenho de diferentes matérias suportes (argila, carvão vegetal e polietileno) e tempos de detenção hidráulica (TDH) (0,5 e 2 h). Na segunda fase, testaram-se diferentes porosidades (50, 75 e 91%) do leito de polietileno para TDH de 0,5 h. Os resultados mostraram que TDHs menores e maiores porosidades promovem maiores e contínuas produções de H_2 . Na segunda fase, avaliou-se a produção de H_2 a partir de quatro inóculos: metanogênico tratamento termicamente e três provenientes de biomassa aderidas aos materiais suportes empregados na primeira etapa. Todos inóculos produziram H_2 . Na terceira etapa, avaliou-se a viabilidade de produzir H_2 a partir de diferentes águas residuárias (sacarose, esgoto sanitário, vinhaça e glicerina). Houve conversão de hidrogênio a partir de todas as águas residuárias e a vinhaça mostrou ser o efluente mais promissor para esta finalidade. As análises biológicas mostraram baixa diversidade de fungos e bactérias, porém todos associados com processo de formação de H_2 . A varredura dos parâmetros estudados neste trabalho proporcionou o entendimento do processo, assim como, o mapeamento das variáveis adequadas para o projeto e viabilidade da aplicação de reatores desenvolvidos para geração de hidrogênio.

Palavras-chave: Águas residuárias. Hidrogênio. Inóculos. Material Suporte. Reator anaeróbio.

ABSTRACT

FERNANDES, B. S. **Hydrogen production using up-flow anaerobic packed bed reactor**. 2008. 100f . Tesis (Doctoral) Departamento de Hidráulica e Saneamento, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

The Hydrogen obtained by fermentative production is studied as an alternative process to provide energy instead of fossil fuel application. Moreover, hydrogen is a renewable fuel, has high energy content per unit weight (122 kJ.g⁻¹), generates clean energy without pollution and produces no greenhouse gases. The fermentative process has low cost when it is compared with traditional process and photosynthetic process, because hydrogen can be produced from wastewater by anaerobic treatment process. For that reason, the aim of this research was to study some parameters involved in the hydrogen production by fermentative process. Three steps were developed. In the first step, it was studied the hydrogen production from sucrose using Up-flow Anaerobic packed-bed reactor, this step was divide in two phases. In the first phase three support materials (clay beads, vegetal coal and polyethylene) and two hydraulic retention times (0.5 and 2 h) were tested. In the second phase three porosities (50, 75 and 91%) of polyethylene bed were tested. The results demonstrated that the low HRT and high porosities provided high hydrogen production, although, the support materials did not show significant difference in the hydrogen production and in the biomass developed. In the second phase, four inocula were used in order to produce hydrogen: thermal pre-treated methanogenic sludge; and the others three came from the reactors used in the first phase. All inocula were able to produce hydrogen. In the third step hydrogen production was obtained from three wastewaters (domestic wastewater, vinasse and glycerol) and a control (sucrose) in batch reactors. The wastewaters and control produced hydrogen and the vinasse showed the highest production. This research makes available the comprehension on the influence of the different parameters in processes projected for hydrogen production and it makes viable to apply in full-scale.

Keywords: Hydrogen. Inoculum. Support Material. Up-flow anaerobic packed bed reactor. Wastewater.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, 90% da energia mundial é gerada a partir de combustíveis fósseis, considerados escassos e prejudiciais ao meio ambiente e aos seres humanos. Entre os combustíveis alternativos potencialmente cotados para substituir os combustíveis fósseis, surge o hidrogênio.

O H_2 é um combustível limpo, que gera, na sua combustão, água como único produto e apresenta-se 2,75 vezes mais energético do que os hidrocarbonetos (CHEN et al., 2001).

Entre as formas de obtenção de H_2 , existe a reforma de combustível, eletrólise e a produção biológica, sendo essa última atrativa por se tratar de tecnologia de baixo custo e por demandar pouca energia no processo de geração.

A produção biológica de hidrogênio pode ocorrer por meio de dois processos: fotossíntese e processo fermentativo, sendo que a fermentação é tecnicamente mais simples e o hidrogênio pode ser obtido de matéria orgânica presente em águas residuárias.

Diversos trabalhos foram desenvolvidos com objetivo de obter H_2 biologicamente como alternativa ao uso de combustíveis fósseis para geração de energia. Até 2004, a maioria das pesquisas concentrava-se na Coreia, Japão e Taiwan, países com escassez de fontes de energia. Pequenas contribuições vinham dos Estados Unidos e Europa e grupos de pesquisa no Brasil ainda não haviam despertado para essa forma de produção de H_2 .

Até o início de 2008, vários resultados positivos foram mapeados quanto à produção biológica de hidrogênio, demonstrando a viabilidade da utilização do H_2 , produzido biologicamente, para a geração de energia (WU et al., 2002; CHANG et al., 2002) e possibilitaram a implantação de sistemas de produção de hidrogênio, até o momento, em escala piloto (CHOU, *in press*; REN et al., 2006).

O hidrogênio, atualmente, constitui 3% das fontes energéticas mundiais e há expectativas de aumentos significativos em poucos anos (LIOR, *in press*).

Dessa forma, este trabalho destinou-se ao estudo de parâmetros operacionais e de projeto associados com a produção de hidrogênio por meio de processo anaeróbio, pela etapa fermentativa, a fim de maximizar a produção de H_2 , visando em curto prazo a aplicação desse sistema à estações de tratamento de efluentes industriais e doméstico.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Interesse pelo hidrogênio e o cenário energético atual

Em 2007, o Painel Intergovernamental sobre Mudanças do Clima “*Intergovernmental Panel on Climate Change*” (IPCC) lançou o quarto relatório sobre mudanças climáticas. Este relatório reforça que inequivocamente as alterações climáticas estão ocorrendo e são frutos da atividade humana (CLIMATECENTRE, 2008). Essa problemática vem ao encontro da necessidade da tomada de ações a fim de mitigar os efeitos causados pela poluição. Estas ações iniciaram-se em 1997, com o Protocolo de Kyoto e continuamente encontros são realizados com a finalidade de avaliar e estabelecer novas metas. O último encontro data de dezembro de 2007, denominado Conferência de Mudanças Climáticas das Nações Unidas “*United Nations Climate Change Conference*” (UNCCC) que foi realizada em Bali, Indonésia, e contou com a presença de empresas, organizações não governamentais e governamentais.

Os cenários (sem mitigação) do Relatório Especial sobre Cenários de Emissões (RECE), elaborado com base na UNCCC, projetam um aumento das emissões globais de gases de efeito estufa de 25 a 90% entre 2000 e 2030, caso os combustíveis fósseis mantenham sua posição dominante na matriz energética global até 2030. O RECE aponta as principais tecnologias e práticas de mitigação disponíveis comercialmente na atualidade, destacando-se: carvão mineral; energia nuclear e energias renováveis - hidrelétrica, energia solar, eólica, geotérmica e bioenergia (MCT, 2008).

Entre as tecnologias citadas, aponta-se a bioenergia, principalmente o hidrogênio, como alternativa aos combustíveis fósseis que geram, como produto da queima, gases potencializadores do efeito estufa (NIELSEN et al., 2001). O hidrogênio é considerado: um combustível limpo; gera água como único produto nas células combustíveis; apresenta alta conversão de energia por unidade de massa (calor de combustão de 122 kJ.g^{-1}), sendo 2,75 vezes mais energético do que os hidrocarbonetos, além de ser renovável (CHEN et al., 2001).

Entre as formas de obtenção de H_2 , existe a reforma, eletrólise e a produção biológica, sendo o processo biológico mais atrativo, pois é uma tecnologia de baixo custo quando comparada com as outras técnicas (MIZUNO et al., 2000), além de requerer pouca energia para sua geração (LIN; LAY, 2003). Essa constatação pode ser observada pela Tabela 2.1, publicada no livro “*Bio-methane & Bio-hydrogen*” (DE VRIJE; CLAASSEN, 2003).

Tabela 2.1: Comparação do custo da rede de produção de hidrogênio para sistemas com baixa capacidade 100 – 1000 Nm³ H₂ .h⁻¹.

Tecnologia	Custo da Produção EURO/Nm ³ H ₂
Reforma à vapor do gás natural	0,32
Eletrólise com convencional eletricidade	0,23
Bioprocesso de produção de hidrogênio (reator de dois estágios)	0,25
Reforma à vapor a partir de biomassa	0,32
Eletrólise com eletricidade gerada por turbinas de vento	0,25
Eletrólises com eletricidade gerada por células fotovoltaicas	2,95

Fonte: (DE VRIJE; CLAASSEN, 2003).

2.2 Produção biológica de hidrogênio e fatores associados

A produção biológica de hidrogênio pode ocorrer por meio de dois processos: fotossíntese e processo fermentativo, sendo que a fermentação é tecnicamente mais simples, pois o hidrogênio é obtido de carboidratos presentes em águas residuárias (HAN; SHIN, 2004), é mais eficiente e não necessita de luz (SERGEJ et al., *in press*).

A etapa fermentativa da digestão anaeróbia de resíduos orgânicos é o processo chave na produção de hidrogênio. Através dessa etapa, microrganismos acidogênicos decompõem a matéria orgânica (ex. carboidratos: glicose e sacarose) em H₂, CO₂ e ácidos graxos voláteis de cadeia curta. A Reação 1 mostra a conversão da sacarose a ácido acético e hidrogênio:

Portanto, a etapa fermentativa da digestão anaeróbia possibilita tanto a transformação da matéria orgânica em compostos facilmente degradáveis quanto a produção de hidrogênio, obtendo-se, conseqüentemente, energia limpa a partir de resíduos orgânicos (SCHRÖDER; SCHOLZ, 2003).

De 1976 até o início de 2008, mais de 220 artigos já foram publicados sobre produção biológica de hidrogênio via fermentação, sendo que o grande salto de publicações começou em 2000 e somente em janeiro 2008 havia mais de 30 artigos na lista de publicações.

Os artigos abordam os mais diversos fatores associados com a produção de hidrogênio via fermentação, tais como: temperatura, pH, tempo de detenção hidráulica

(TDH), meio suporte, forma de inoculação, microrganismos associados, rotas metabólicas, configuração de reator, entre outros. Esses trabalhos visam, em curto prazo, a aplicação desse processo, que já se encontra na fase de escala piloto.

Não obstante a esses objetivos, o grupo de pesquisas do Laboratório de Processos Biológicos do Departamento de Hidráulica e Saneamento da Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo - USP, sai à frente das pesquisas no Brasil, dando início a este projeto em 1997, com o doutoramento de José Alberto Correia Leite (LEITE et al., 2003; LEITE et al., 2008), que se estende até os dias atuais com mais de 10 projetos em desenvolvimento em todos os níveis (doutorado, mestrado, iniciação científica e estágio).

2.2.1 Temperatura associada à produção de Hidrogênio

A temperatura está diretamente associada com a atividade microbiana e com a solubilidade do hidrogênio na fase aquosa.

O hidrogênio apresenta baixa solubilidade em fase aquosa: 0,017 cm³ de hidrogênio por 1 cm³ de água a 1 bar e 37°C (GUWY et al, 1997). Levando-se em consideração a Lei de Henry, temperaturas mais elevadas acabam reduzindo a solubilidade do gás na fase aquosa e, conseqüentemente, a interação do gás com os microrganismos presentes no processo. Isso desfavorece o consumo do gás para geração de outros produtos do processo fermentativo e aumenta a eficiência de remoção do biogás.

O aumento da atividade dos microrganismos produtores de H₂, acidogênicos, pode ser atingido com a elevação da temperatura empregada, como foi observado por alguns autores (HUANG et al., 2004; MU et al., 2006). Entretanto, é preciso ter cuidados com esta prática, já que cada microrganismo tem sua temperatura ótima de atuação, assim como os consórcios microbianos (NGUYEN et al., *in press*).

O *Clostridium thermocellum* tem temperatura ótima de atuação a 60°C (LEVIN et al., 2006), assim como o *Clostridium cellulosi* (YOKOYAMA et al., 2007). Mu et al. (2007) trabalharam com cultura mista e observaram que 34,6°C foi a temperatura ótima para a produção de hidrogênio.

Muitas pesquisas acabam convergindo para temperaturas que variam de 30°C a 36,8°C, definindo estas como temperaturas otimizadas para sistemas anaeróbios fermentativos produtores de hidrogênio (FANG; LIU; ZHANG, 2002; LIN; CHANG 2004; MIZUNO et al., 2002). No entanto, os efeitos do funcionamento contínuo dos sistemas não são abordados, embora este seja um ponto muito importante para determinar o caráter econômico e técnico da viabilidade de produção de hidrogênio.

A operação de sistemas em temperatura ambiente não tem sido explorada, o que é

justificado pelas oscilações térmicas dos países que desenvolvem esses processos.

Por outro lado, no Brasil, como por exemplo, em São Carlos, onde as oscilações térmicas não ultrapassam 9°C nas médias anuais de temperatura -mínima de 15,3°C e máxima de 27°C- (CEPAGRI, 2007), sistemas projetados para atuar à temperatura ambiente deveriam ser testados. O trabalho de Lin e Chang (2004) compara sistemas operados com diferentes faixas de temperatura, sendo que, em sistema no qual a temperatura varia de 25°C a 35°C, são observadas oscilações na produção de hidrogênio na ordem de 20%.

2.2.2 pH associado à produção de hidrogênio

O pH é um parâmetro fundamental em reatores anaeróbios, podendo influenciar na velocidade de produção de hidrogênio e inibir a ação de microrganismos hidrogenotróficos (ex. metanogênicos, redutores de sulfato). Há a possibilidade de inativação desses microrganismos; mesmo que o sistema apresente condições nutricionais para favorecimento desses microrganismos (CHEN et al., *in press*).

A escolha do pH de operação deve envolver dois aspectos, o pH da água residuária a ser tratada e o pH que leva a melhores condições para produção de H₂.

Algumas pesquisas mostram que o pH otimizado para produção de hidrogênio está na faixa de 5,0 e 6,5 (FANG; LIU; ZHANG, 2002; LIN; CHANG 2004; MIZUNO et al., 2002). Entretanto, muitos apontam para um único valor de 5,5 (LIU; FANG, 2002; MU et al., 2007; SHIN 2007), mesmo trabalhando com culturas diferentes.

2.2.3 Imobilização da biomassa em reatores

O material suporte utilizado em reatores para produzir H₂ pode selecionar microrganismos (LEITE et al., 2008). Sendo assim, a escolha de um suporte adequado pode favorecer a adesão de microrganismos produtores de hidrogênio (WU et al., 2002; CHANG et al., 2002) sem que haja a adesão de microrganismos consumidores desse gás. Entre os materiais já testados destacam-se: carvão ativado (WU et al., 2002; CHANG et al., 2002), gel de alginato (WU et al., 2002), argila expandida (CHANG et al., 2002; LEITE et al., 2008), Siran[®] vidro sinterizado (GUWY et al., 1997), lascas de pedra (MOHAN et al., *in press*) e esponja vegetal (CHANG et al., 2002).

Outra questão relevante está associada à baixa solubilidade do hidrogênio. Desta forma, a associação de biofilmes e grânulos melhora a eficiência do processo (GUWY et al., 1997). Alguns autores melhoraram essa interação por meio do aumento da porosidade dos leitos o que promoveu tanto a presença de biomassa aderida ao material suporte quanto

à presença de células em suspensão, formando grânulos (LEE et al., 2003).

Por outro lado, a aplicação de células livres ou a escolha de suportes inadequados podem levar a flotação da biomassa com completa perda (WU et al., 2002) e com o arraste causado pelos baixos tempos de detenção hidráulica (TDH) aplicados aos reatores projetados para esta finalidade.

2.2.4 Configurações de reatores

Diversas configurações de reatores foram testadas em sistemas projetados para produzir hidrogênio: reatores de leito fixo (CHANG et al., 2002; LEE et al., 2003, LEITE et al., 2008), reatores de manta de lodo (UABS) (MOHAN et al., 2008; CHANG; LIN, 2004; HUANG et al., 2004), reatores de leito fluidizados (WU et al., 2003), reatores em batelada (AROOJ et al., 2007; CHEONG et al., 2007; CHEN et al., *in press*, MOHAN et al., *in press*), quimiostatos (LIN; CHANG, 2004), reatores contínuo com agitação (CSTR) (SIRIWONGRUNGSON et al., 2007; LIN; LAY, 2005).

Alguns autores tiveram a preocupação em comparar configurações de reatores e serão apresentados a seguir.

Zhang et al. (*in press*) compararam o desempenho de reatores de fluxo ascendente operados com biomassa granular e imobilizada quanto à produção de hidrogênio. Os resultados mostraram similaridade de produção de hidrogênio para todos os TDH operados. Além disso, os autores observaram que o reator de leito fixo promoveu um aumento nas populações granulares ao longo do processo de operação.

Gaviria et al. (2007) descrevem que reatores de fluxo contínuo apresentam maiores níveis e constância na produção de hidrogênio.

Li et al. (2007) e Yang et al. (*in press*) estudaram a produção de hidrogênio para reatores em batelada e de mistura completa (CSTR) e os autores observaram que o reator em batelada mostrou maior estabilidade e melhor atividade microbiana.

Nesta revisão, levantaram-se alguns trabalhos que estudaram sistemas em condições similares de operação (sacarose como substrato com concentração de 20.000 mg DQO. l^{-1} , pH de 6,7 e temperatura de 35°C) e reatores distintos (Tabela 2.2). A comparação mostra que reatores de leito fixo apresentaram melhores resultados de velocidade de produção de H₂ e de rendimento (mols de H₂/ mol de sacarose).

Zang et al. (*in press*) observaram que reatores manta de lodo (UASB – upflow anaerobic sludge blanket), reator contínuo agitado (CSTR), reator de leito fixo, reator de leito fluidizado favorecem a imobilização de células anaeróbia produtoras de hidrogênio, uma vez que são tecnologias baseadas principalmente em granulação e formação de

biofilme. Os autores observaram elevadas velocidades de produção nestes sistemas como consequência da grande concentração da biomassa.

Tabela 2.2: Comparação de produção de hidrogênio para reator de leito fixo e fluidizado.

Reator	Suporte	TDH (h)	Velocidade ($l\ H_2 \cdot h^{-1} \cdot l^{-1}$)	mol H_2 / mol sacarose	H_2 biogás (%)	Fonte
Leito fixo	Carvão ativado	0,5	1,3	ND	31,8	CHANG et al. (2002)
Leito fluidizado	Gel de alginato	2	0,925	2,67	38	WU et al. (2003)
Leito fixo	Carvão ativado	2	2	3,1	38	LEE et al. (2003)

ND – Não Determinado

Camilli e Pedroni (2005) compararam o desempenho dos reatores: CSTR, UASB e reator de leito fixo. Os autores apontaram que reator de leito fixo apresentou melhor rendimento e velocidade de produção de H_2 ($0,23\ l \cdot g^{-1}$ de carboidrato e $2.54\ mmol \cdot (l \cdot h)^{-1}$)

Apesar do alto índice de produção de pesquisas na área, em todos os casos as produções de hidrogênio apresentaram-se inferiores a produção teórica, como por exemplo: 8 mols de H_2 / mol de sacarose referente às pesquisas apresentadas na Tabela 2.2. Como citado, essa baixa eficiência de conversão, que gira em torno de 50%, deve estar associada tanto ao consumo de hidrogênio pelas arqueias metanogênicas (devido ao alto valor do pH), quanto à síntese de acetato via homoacetogênese e à síntese de etanol.

Essa constatação sugere que muitas alterações ainda devem ser feitas nas configurações dos reatores a fim de otimizar os processos de produção de hidrogênio.

2.2.5 Tempo de detenção hidráulica

O tempo de detenção hidráulica (TDH) é um parâmetro que influencia na velocidade de produção de H_2 . Diversos autores observaram que baixos TDHs apresentam maiores velocidades de produção de hidrogênio, tal como: Chang et al. (2002) que variaram o TDH de 0,5 a 5 h; Lee et al. (2003), que obtiveram a velocidade máxima para TDH de 0,5 h, atuando com TDH entre 0,5 e 4 h; Chang et al. (*in press*), operaram com TDHs entre 12 e 3 h, com maiores produções para TDH de 3 h e Zhang et al. (*in press*), que operaram com TDHs de 0,125 a 3 h e observaram melhores resultados para faixas de 0,25 a 0,75 h.

2.2.6 Substratos

O processo de fermentação para geração hidrogênio pode ocorrer utilizando

diversos substratos, com culturas mistas ou puras (HALLENBECK, 2004).

Diversos substratos foram testados com essa finalidade e resultados positivos foram obtidos. Muitas pesquisas utilizaram glicose (VAN GINKEL; LOGAN, 2005; ZANG et al., *in press*; LEITE et al., 2008; MOHAN et al., *in press*; MU et al., 2007) e sacarose (KHANAL et al., 2004; LIN; SHEI, *in press*; CHEN et al., *in press*) como fonte de carbono e energia. Até mesmo efluentes mais complexos foram testados, como: a base de celulose, pentose e xiloses (ROGERS; GOTTSCHALK, 1993; TAGUCHI et al., 1995); glicerol, resíduo do processo de fabricação do biodiesel (ITO et al., 2005); efluente do processamento do queijo (YANG et al., 2007); água residuária de laticínio (MOHAN et al., 2007); subprodutos do processamento da farinha de trigo (HAWKES et al., *in press*); melaço (LI et al., 2007); resíduos sólidos de alimentos (HAN; SHIN, 2004); efluente de indústria de papel (VAZQUEZ et al., 2005); esgoto doméstico (VAN GINKEL et al., 2005); entre outros efluentes.

Sem sombra de dúvidas, o substrato mais testado é a glicose, seguido da sacarose, o que favorece o entendimento do processo, por serem substratos facilmente degradáveis. Por outro lado, os efluentes reais, apesar de serem menos testados, mostram uma realidade promissora de produção de hidrogênio a partir de qualquer água residuária, desde que contenha fonte de carbono e hidrogênio e sejam submetidos a sistemas favoráveis ao desenvolvimento dos microrganismos produtores de H₂. Apesar dessa constatação, ainda é necessária a otimização desses processos.

2.2.7 Inóculo

Existe uma variedade de microrganismos que podem produzir hidrogênio. Esses organismos podem ser mesofílicos ou termofílicos, aeróbios, facultativos ou anaeróbios, desde que possuam enzimas hidrogenase ou nitrogenase. Exemplos desse microrganismos são: *Clostridia*; *Rumen bacteria*; *Pyrococcus furiosus*; *Anaerocellum*, *Caldicellulosiruptor*; *Dictyoglomus*; *Fervidobacterium*; *Spirocheta*; *Thermotoga*; *Thermoanaerobacter*; *Enterobacter*; *Escheicchia. Coli*; *Citrobacter*; *Alcaligenes*; *Bacillus*; arqueias: *Methanosarcina barkeri* (REITH et al., 2003). Além disso, fungos, que apresentam hidrogenossomo ou enzimas hidrogenase, podem gerar hidrogênio, apesar de serem pouco explorados para esta finalidade (HACKSTEIN, 2004; BOXMA, 2005).

O gênero *Clostridium* é identificado por ter mais espécies envolvidas na produção de hidrogênio (HUNG et al., *in press*).

Os organismos podem ser empregados tanto na forma de culturas puras (SHIN et al., 2007; LIU et al., 2006) como na forma de culturas mistas (OH et al., 2003; HAN E

SHIN, 2004; FAN et al., 2004). A aplicação de culturas mistas mostra ser o caminho mais viável, pensando na aplicação em larga escala.

Apesar dessa praticidade aparente, o emprego destas culturas requer certos cuidados, a fim de evitar que microrganismos indesejáveis ao processo se desenvolvam e consumam o hidrogênio, como por exemplo: via reação de homoacetogênese (Reação 2) e via produção de etanol, a partir ácido acético e hidrogênio (Reação 3) (OH et al., 2003).

Algumas técnicas podem ser aplicadas diretamente nos inóculos a fim de minimizar essas reações tanto antes como durante o processo. Entre as técnicas empregadas destacam-se: tratamento térmico, tratamento ácido, tratamento com clorofórmio, tratamento com ultra-som, tratamento alcalino, entre outros (MOHAN et al., 2008).

Oh et al. (2003) optaram pelo pré-tratamento térmico do lodo. Entretanto, os autores observaram que o tratamento não foi suficiente para suprimir o consumo de H_2 sob condições de elevada pressão parcial de hidrogênio e baixa concentração de sacarose, via Reações 2 e 3. Mesmo assim, outros autores adotaram essa técnica (HAN; SHIN, 2004; FAN et al., 2004).

Mohan et al. (2008) compararam alguns processos de tratamento de inóculos metanogênicos como forma de obter culturas enriquecidas de microrganismos produtores de hidrogênio. Pré-tratamento térmico (100°C por 1 h); pré-tratamento com ácido ortofosfórico ($\text{pH} = 3$ por 24 h) e pré-tratamento com ácido 2- bromoetano sulfônico (BESA) em solução de sal de sódio (BESA; $0,2\text{g.l}^{-1}$ por 24 h). Todos os processos apresentaram produções de hidrogênio superiores ao sistema que não sofreu nenhum processo de tratamento.

Hu e Chen (2007) testaram três formas de pré-tratamento: com calor, pH e clorofórmio, sendo que o tratamento com clorofórmio mostrou ser o processo mais eficiente e não foi observada a presença de metanogênese no processo.

É importante observar que os trabalhos de Mohan et al. (2008) e Hu e Chen (2007) foram realizados em batelada o que não possibilita avaliar os efeitos dos processos de pré-tratamento a longo prazo, como observado por Oh et al. (2003).

Outra alternativa é o desenvolvimento da biomassa pelo processo fermentativo natural de efluentes sem pré-tratamento, como aplicado por Leite et al. (2008) em reator fermentativo

operado por 366 dias sem ser observada a presença de produção de metano.

Kim et al. (*in press*) citam que culturas não esterilizadas podem causar consumo de H_2 por bactérias produtoras de hidrogênio além de reações de acetogênese, produção de ácido propiônico, lático e metano por outras bactérias.

2.2.8 Rotas de produção de hidrogênio

Alguns grupos de pesquisa buscam mecanismos que descrevam a geração de hidrogênio a partir de bactérias fermentativas anaeróbias e até mesmo de organismos eucariontes.

Uma das formas propostas de geração de hidrogênio, a partir de bactérias, é pela decomposição do formiato (Reação 4) pela ação da enzima hidrogenase, chamada de rota do formiato. O percurso da formação do formiato envolve a decomposição do piruvato à acetil-CoA (Reação 5), e por sua vez, a acetil-CoA é levada ao acetato (Reação 6) ou etanol (Reação 7) (TANISHO; ISHIWATA, 1995).

Outra rota de formação de hidrogênio é denominada rota do NADH (Nicotinamida Adenina Dinucleotideo, forma reduzida). Nesta rota o hidrogênio é formado pelo processo de oxi-redução do NADH (Reação 8):

O NADH é formado durante o processo de fermentação, com a conversão da glicose a piruvato (Reação 9), denominada glicólise, ou pela fermentação do piruvato a outros produtos finais.

Outra forma é através da produção da acetona (Reação 10), apesar de ser pouco observada ou explorada nos processos fermentativos produtores de hidrogênio.

A Tabela 2.3 mostra as reações que podem ser obtidas da decomposição do piruvato (TANISHO; ISHIWATA, 1995).

Tabela 2.3: Principais reações envolvidas na fermentação da glicose.

Principal reação (glicólise)	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 2\text{NAD}^+ \rightarrow 2\text{CH}_3\text{CO}\cdot\text{COOH} + 2\text{NADH} + 2\text{H}^+$
Decomposição do piruvato	
Ácido Láctico	$\text{CH}_3\text{CO}\cdot\text{COOH} + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_3\cdot\text{CHOH}\cdot\text{COOH} + \text{NAD}^+$
Ácido Butírico	$2\text{CH}_3\text{CO}\cdot\text{COOH} \rightarrow \text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\cdot\text{COOH} + 2\text{CO}_2$
Ácido Fumárico	$\text{CH}_3\text{CO}\cdot\text{COOH} + \text{CO}_2 + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow (\text{CHCOOH})_2 + \text{H}_2\text{O} + \text{NAD}^+$
Ácido Fórmico	$\text{HCOOH} \rightarrow \text{H}_2 + \text{CO}_2$
Ácido Acético	$\text{CH}_3\text{CO}\cdot\text{COOH} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\cdot\text{COOH} + \text{HCOOH}$
Butanodiol	$2\text{CH}_3\text{CO}\cdot\text{COOH} + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_3\cdot(\text{CHOH})_2\cdot\text{CH}_3 + 2\text{CO}_2 + \text{NAD}^+$
Etanol	$\text{CH}_3\text{CO}\cdot\text{COOH} + 2\text{NADH} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_3\cdot\text{CH}_2\text{OH} + \text{HCOOH} + 2\text{NAD}^+$
Acetona	$2\text{CH}_3\text{CO}\cdot\text{COOH} + \text{H}_2\text{O} + 2\text{NAD}^+ \rightarrow \text{CH}_3\cdot\text{CO}\cdot\text{CH}_3 + 3\text{CO}_2 + 2\text{NADH} + 2\text{H}^+$
Butanol	$2\text{CH}_3\text{CO}\cdot\text{COOH} + 2\text{NADH} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_3\cdot(\text{CH}_2)_2\cdot\text{CH}_2\text{OH} + 2\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} + 2\text{NAD}^+$

Fonte; (TANISHO; ISHIWATA, 1995).

A rota do formiato responde por 50% da produção teórica do hidrogênio, é uma rota natural e não depende da formação de outros produtos. O hidrogênio do NADH muitas vezes não é disponibilizado, pois é usado para formação de ácidos e álcoois (Tabela 2.3).

Um esquema simplificado é proposto por Tanisho et al. (1998) e mostra as reações envolvidas no processo de geração de H_2 (Figura 2.1).

Outros autores mostram esquemas similares para diversos microrganismos, tais como Kim et al. (*in press*) que descreve o mecanismo para a *Citrobacter amalonaticus* Y19; Turcot et al. (*in press*) para cultura mista de bactérias; e Liu et al. (2006) para o *Clostridium tyrobutyricum* ATCC 25755 partindo de pentose ou hexose.

Basicamente, todos os mecanismos propostos para explicar a produção de H_2 via bactérias têm como base o mesmo fundamento, geração de hidrogênio a partir do formiato ou NADH, e mostram claramente que algumas rotas são extremamente indesejáveis do ponto de vista da geração do biogás.

Figura 2.1: Esquema simplificado proposto para produção de hidrogênio (TANISHO et al., 1998).

Apesar de existirem várias literaturas sobre rotas de produção de hidrogênio via bactérias, pouco se sabe sobre as rotas envolvendo a geração via eucariontes.

Alguns eucariontes, como os fungos, apresentam hidrogenossomo, uma organela evoluída capaz de produzir hidrogênio e ATP, que é encontrada em organismos unicelulares, não-fotossintéticos e anaeróbios (HACKSTEIN, 2004), ou até mesmo esses organismos podem apresentar enzimas hidrogenase. Hackstein (2004) apresenta em seu trabalho alguns organismos que possuem enzima hidrogenase, tais como: *Chlamydomonas*, *Trichomonas* e *Saccharomyces cerevisiae* e que apresentam hidrogenossomo: *Trichomonas* e *Psalteriomonas lanterna*.

O mais perto que se chegou da determinação de uma rota partiu do trabalho de Boxma et al. (2005), que observaram o metabolismo da glicose pela *Nyctotherus ovalis*, organismo que apresenta hidrogenossomo, e que teve como principais produtos o acetato, lactato, succinato e traços de etanol e CO₂.

2.2.9 Potencial energético

Em 1998, iniciaram-se as pesquisas, através da parceria da empresa UniTech e a Companhia Energética de Minas Gerais (CEMIG), para o desenvolvimento de células combustíveis de H₂ (REVISTA PESQUISA FAPESP, número 70, 2001), projeto financiado pela FAPESP (PIPE). Em 2004, as pesquisas levaram ao desenvolvimento de uma célula combustível com capacidade de geração de 1 kWh.m⁻³ de H₂ (REVISTA PESQUISA FAPESP, número 103, 2004).

Apesar da evolução tecnológica do uso das células de H₂, as formas de obtenção do H₂ ainda são caras. Uma alternativa mais barata para se obter hidrogênio seria via metabolismo microbiano utilizando águas residuárias como fonte de carbono, energia e nutrientes. Nesse caso, apenas como exercício preliminar para avaliar o potencial

energético de uma água residuária pode ser considerada a sacarose como exemplo, a qual, teoricamente, permite a produção de 8 mols de H_2 por mol de sacarose. Dessa forma, estequiometricamente, pode-se obter uma produção máxima de $0,047 \text{ g } H_2 \cdot g^{-1}$ sacarose ou $0,0416 \text{ g } H_2 \cdot g^{-1}$ DQO. Supondo água residuária à base de sacarose com DQO de $5 \text{ g } l^{-1}$ lançada com vazão de $4800 \text{ m}^3 \cdot \text{dia}^{-1}$ (população equivalente de 400.000 habitantes com base apenas em vazão), a produção teórica máxima de hidrogênio seria de $998,4 \text{ kg } H_2 \cdot \text{dia}^{-1}$ ou $12180 \text{ m}^3 H_2 \cdot \text{dia}^{-1}$ a 25°C . Considerando os dados da Tabela 2.2, os quais apresentam que a eficiência de obtenção do hidrogênio está por volta de 35% do teórico máximo, a geração energética seria de cerca de $4260 \text{ kWh} \cdot \text{dia}^{-1}$, considerando a célula da UniTech.

O hidrogênio, além de ser utilizado para geração de energia elétrica, está sendo viabilizado para o uso na área automobilística. Junker et al. (2001) desenvolveram um carro totalmente movido a H_2 consumindo $10 \text{ g de } H_2 \text{ km}^{-1}$. O interesse é tanto que a empresa Opel pretende começar a fabricação de carros movidos a H_2 até 2010 (CIENCIAAPT, 2004). Considerando os mesmos cálculos feitos acima, a quantidade de hidrogênio produzido diariamente ($349,4 \text{ kg } H_2 \cdot \text{dia}^{-1}$ considerada a eficiência de 35%) seria suficiente para abastecer uma frota destes veículos.

Deve ser ressaltado que estes cálculos estão baseados na estequiometria da reação considerando sacarose como fonte de carbono e nos dados de eficiência de produção de hidrogênio relatados na literatura. Muitos desafios ainda devem ser vencidos para que as eficiências sejam aumentadas e muitos estudos devem ser feitos em relação à qualidade do gás gerado nos biorreatores e seu uso direto nas células ou em veículos. Esses gases podem conter, além do hidrogênio, o H_2S que pode ser prejudicial aos eletrodos das células.

O estudo da obtenção do hidrogênio torna-se interessante considerando que diversas pesquisas têm sido realizadas e que já se sabe do potencial e da aplicabilidade dessa fonte de energia. Além disso, incentivos governamentais podem viabilizar a aplicação de hidrogênio como as leis aprovadas em setembro de 2004 no Estado de Califórnia (EUA), segundo as quais as montadoras de veículos serão obrigadas a cortar 25% da emissão de poluentes de automóveis e 18% de caminhões, as quais passarão a valer a partir de 2009 (REVISTA VEJA, número 874, 2004).

2.3 Considerações finais

Conforme apresentado nessa revisão, diversos trabalhos, utilizando reatores anaeróbicos para produção de H_2 , já foram desenvolvidos tendo como substrato águas residuárias com alta concentração de sacarose (CHEN; LIN, 2003; WU et al., 2003; WU et al., 2002), obtendo resultados significativos de produção de H_2 .

Com base nas literaturas citadas, este trabalho visou o estudo da produção de hidrogênio de forma a minimizar as formas de consumo de H_2 dentro do próprio reator. Para isso, foram utilizados diferentes materiais suportes para promover a seleção dos microrganismos. Os suportes estudados foram: argila expandida, que apresentou bons resultados de produção de ácidos, mostrou ser seletivo para adesão de microrganismos fermentativos, além de reduzir o crescimento de arqueias metanogênicas sem necessitar de tratamento térmico (LEITE et al., 2003); carvão vegetal, que em pesquisa promoveu uma baixa adesão de microrganismos metanogênicos (SILVA et al., 2002); e polietileno de baixa densidade reciclado, que em pesquisa promoveu baixa adesão de microrganismos redutores de sulfato e metanogênicos (SILVA et al., 2002).

Para esses suportes foi testada a configuração de reator de leito fixo de fluxo ascendente, a fim de dar continuidade a linha de pesquisa de reatores de leito fixo estabelecida para produções de hidrogênio e ácidos no grupo de pesquisas do LPB. No desenvolvimento desse processo, adotou-se temperatura de operação de $25^{\circ}C$ e TDH de 0,5 a 2 h. O substrato escolhido foi a sacarose, possibilitando a comparação com dados da literatura, com concentração de matéria orgânica de 1.000 mg.l^{-1} expressa como DQO, concentração obtida em águas residuárias de indústria de laticínio, cervejeira e refrigerante (PIVELI, 1999). O pH de operação foi de 5,5, valor citado na literatura como pH otimizado (FANG; LIU, 2002). Outros fatores foram estudados nesta pesquisa, com base nos resultados obtidos nessa etapa, tais como: porosidade de leito, forma de inoculação, produção de hidrogênio para diferentes águas residuárias.

2.4 Ressalva

O grande interesse nessa área está associado ao desafio na interpretação do comportamento do processo. Apesar da simplicidade aparente das reações envolvidas este sistema, esse não deve ser tratado e interpretado como um processo anaeróbio completo, uma vez que o processo envolve reações e formação de intermediários na forma líquida e gasosa e o composto gasoso de interesse apresenta altamente insolúvel no meio aquoso, jamais estudados nos processos convencionais. Dessa forma, esperar por dados constantes e estados estacionários de conversão de reagentes a produtos bem definidos, para processos contínuos, é quase impossível, tornando o estudo desse processo mais prazeroso e desafiador. Sendo assim, as etapas estabelecidas nesta pesquisa foram fruto dos resultados obtidos das etapas precedentes, tendo cunho mais empírico que teórico.

3. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo principal avaliar a geração de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fixo a partir de águas residuárias.

Foram objetivos específicos:

- Avaliar a influência do material suporte na produção de hidrogênio;
- Avaliar a influência que o tempo de detenção hidráulica apresenta sobre a produção de hidrogênio;
- Avaliar o efeito da porosidade do leito na estabilidade da produção de hidrogênio;
- Indicar a viabilidade da geração de hidrogênio a partir de diferentes inóculos e águas residuárias;
- Avaliar a produção de álcoois e ácidos orgânicos;
- Avaliar a diversidade microbiana envolvida nas etapas experimentais.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Na Figura 4.1 estão representadas as etapas realizadas durante o desenvolvimento do trabalho.

Figura 4.1: Etapas desenvolvidas durante o projeto

O experimento foi dividido em três etapas. Na primeira etapa, subdividida em duas fases, foi estudada a produção de hidrogênio a partir de sacarose empregando Reatores Anaeróbios de Leito Fixo de Fluxo Ascendente. Na primeira fase, comparou-se o desempenho de diferentes materiais suportes (argila, carvão vegetal e polietileno) e tempos de detenção hidráulica (TDH) (0,5 h e 2 h). Na segunda fase, testaram-se diferentes porosidades de leito de polietileno (50, 75 e 91%) para TDH de 0,5 h. Na segunda etapa, avaliou-se a produção de H_2 a partir de quatro inóculos diferentes: metanogênico tratado termicamente e os provenientes de biomassas aderidas aos materiais suportes empregados

na primeira etapa. Na terceira etapa, avaliou-se a viabilidade da produção de H_2 a partir de diferentes águas residuárias (sacarose - controle, esgoto sanitário, vinhaça e glicerina).

4.1 Material

4.1.1 Primeira etapa – Reatores Anaeróbios

4.1.1.1 Reator Anaeróbio de Leito Fixo Ascendente

As duas fases da primeira etapa foram desenvolvidas em três reatores de leito fixo, com volume de leito de 2,5 l e volume total de 3,5 l (Figura 4.2a).

Figura 4.2: (a) Desenho esquemático do reator anaeróbio de leito fixo de fluxo ascendente (unidade em mm) e (b) Foto do reator.

Os reatores foram construídos em tubos de acrílico com diâmetros interno de 80 mm e externo de 88 mm e comprimento de 750 mm. Cada reator foi dividido em três compartimentos: entrada do afluente, saída de efluente e leito, separados por telas de aço inoxidável (5 mm de abertura), fixadas por haste de 5 mm do mesmo material (Figura 4.2b).

O leito apresentou comprimento de 50 cm, cinco pontos de amostragem igualmente espaçados (1-5), e o ponto de entrada foi usado como ponto “0” de coleta de amostra.

A parte superior do leito foi vedada para evitar perda dos gases.

4.1.1.2 Meio suporte

Foram usados três tipos de materiais para adesão da biomassa:

- Argila expandida (cinasita), adquirida na empresa Cinexpan Ltda. (Várzea Paulista - SP) com densidade aparente de 600 kg.m^{-3} e granulometria de 6 a 15 mm;
- Carvão vegetal (produto da carbonização ou pirólise da lenha de eucalipto);
- Polietileno de baixa densidade – sobras da reciclagem (poroso), fornecido pela usina de reciclagem Interplas (São Carlos-SP).

4.1.1.3 Meio de alimentação

Os reatores foram alimentados com água residuária sintéticas composta de sais e matéria orgânica na forma de sacarose (Tabela 4.1). Além disso, bicarbonato de sódio (500 mg.l^{-1}) e ácido clorídrico ($0,45 \text{ ml}$ de ácido.l-1 – 10 mol.l^{-1}) foram adicionados para controlar o pH em 5,5.

Tabela 4.1: Composição de água residuária sintética utilizada.
(adaptação do meio DEL NERY, 1987)

Composto	Concentração (mg.l^{-1})
Sacarose	890,62
Uréia	20
Sulfato de níquel	0,50
Sulfato ferroso	2,5
Cloreto férrico	0,25
Cloreto de cálcio	2,06
Cloreto de cobalto	0,040
Óxido de selênio	0,036
Fosfato de potássio monobásico	5,36
Fosfato de potássio dibásico	1,30
Fosfato de sódio dibásico	2,76

4.1.1.4 Inóculo

O inóculo foi obtido pelo processo de fermentação natural do meio de alimentação, preparado com água de abastecimento, e mantido em repouso durante três dias, em recipiente aberto. Esse processo favorece a fermentação do meio através de microrganismos presentes na atmosfera, e os provenientes da água de abastecimento usada (Leite et al., 2008).

4.1.2 Segunda etapa - Diferentes Inóculos

4.1.2.1 Reator em Batelada

A segunda etapa do projeto foi desenvolvida em quatro reatores em batelada, em duplicata, com volume total de 250 mL, volume reacional de 100 mL, 2 g de inóculo, e headspace de 150 mL (Figura 4.3).

Figura 4.3: Figura esquemática do reator em batelada.

4.1.2.2 Meio de alimentação

Os reatores foram incubados com o meio cuja composição está apresentada na Tabela 4.1. Bicarbonato de sódio (500 mg.l^{-1}) e ácido clorídrico ($0,45 \text{ ml de ácido.l}^{-1} - 10 \text{ mol.l}^{-1}$) foram adicionados para controlar o pH em 5,5.

4.1.2.3 Inóculos

Quatro inóculos foram empregados. Para três conjuntos de reatores, foram utilizados inóculos extraídos da primeira fase do trabalho, desprendidos do suporte segundo metodologia desenvolvida por Ribeiro et al. (2003), conforme apresentado a seguir:

- A – Biomassa aderida à argila expandida
- B – Biomassa aderida ao carvão vegetal.
- C – Biomassa aderida à polietileno de baixa densidade.

D – Inóculo proveniente de Reator de Manta de Lodo (UASB) da Estação de Tratamento de Efluentes da Avícola Dacar-Tietê-SP. A biomassa foi macerada e sofreu tratamento térmico a 100°C , por 1 h (KAWAGOSHI et al., 2005), a fim de inativar microrganismos metanogênicos.

4.1.3 Terceira etapa - Diferentes Águas Residuárias

4.1.3.1 Reator em Batelada

Quatro reatores em batelada foram operados em duplicata, com volumes totais de 2000 mL, volumes reacionais de 1000 mL (900 mL de meio e 100 mL de inóculo) e headspace de 1000 mL (Figura 4.3).

4.1.3.2 Efluentes brutos

Três efluentes foram usados na terceira etapa e, como controle, solução de sacarose:

1. Sacarose (controle) - Proveniente da Empresa Native – Produtos Naturais, usina São Francisco S/A, Sertãozinho - SP;
2. Esgoto Sanitário – Proveniente da Estação de Tratamento de Esgoto da Universidade de São Paulo, *Campus* de São Carlos;
3. Vinhaça – Efluente gerado da produção de etanol a partir de milho, Cereale Agroindustrial;
4. Glicerina ou Glicerol – Efluente de geração de biodiesel da Empresa Biocapital localizada no município de Charqueada, região de Piracicaba- SP;

Os dados da caracterização dos efluentes brutos estão presentes na Tabela 4.2.

Tabela 4.2: Caracterização dos efluentes brutos utilizados.

Caracterização	Esgoto Sanitário	Vinhaça	Glicerol
DQO (mg.L ⁻¹)	346	88400	3675529*
pH	6,43	3,75	ND
Alcalinidade	183	0	ND
ST	2562	69128	ND
SV	2030	65020	ND
SF	532	4108	ND
N-Total (mg N.L ⁻¹)	46	598	0
P-Total(mgPO ₄ ³⁻ .L ⁻¹)	8	176	0

*Para solução aquosa de 1 g de glicerol.L⁻¹; DQO – Demanda Química de Oxigênio; ST – Sólidos Totais; SV – Sólidos Voláteis; SF – Sólidos Fixos; N – Nitrogênio; P – Fósforo; ND – Não determinado.

4.1.3.3 Meio de alimentação

Os reatores foram incubados com os efluentes brutos diluídos para gerar DQO de 250 mg.L⁻¹, a fim de trabalhar na faixa de DQO do efluente menos concentrado e normalizar a concentração de matéria orgânica aplicada. O efluente foi enriquecidos com

nutrientes apresentados na Tabela 4.3. O controle do pH em 5,5 foi feito como descrito em 4.1.3.1.

Tabela 4.3: Composição dos nutrientes utilizados. (adaptação do meio DEL NERY, 1987)

Composto	Concentração (mg.l ⁻¹)
Uréia	6,0
Sulfato de níquel	0,15
Sulfato ferroso	0,75
Cloreto férrico	0,075
Cloreto de cálcio	0,618
Cloreto de cobalto	0,012
Óxido de selênio	0,0108
Fosfato de potássio monobásico	1,608
Fosfato de potássio dibásico	0,39
Fosfato de sódio dibásico	0,828

4.1.3.4 Inóculo

Todos os reatores foram inoculados com biomassa proveniente de Reatores de Leito Fixo e Fluxo Ascendente aderida em polietileno de baixa densidade, desprendida do suporte e extraída na fase final de operação dos reatores da primeira etapa (reatores da segunda fase operados com 75 e 91% de porosidade, em uma mistura de 1:1).

4.2 Métodos

4.2.1 Métodos Analíticos

A sacarose foi determinada pelo método de Dobuis et al. (1956). Álcoois e ácidos foram determinados por cromatografia gasosa, usando cromatógrafo HP 6890 (MORAES et al., 2000). Hidrogênio, dióxido de carbono e metano foram determinados por cromatografia gasosa (detector de condutividade térmica, CG- Shimadzu) baseado na metodologia desenvolvida por Stenerson (2004). A produção de hidrogênio foi medida por meio de medidor de vazão de gás MilliGas-counter da Ritter. Os parâmetros de monitoramento, sólidos suspensos voláteis (SSV), pH, temperatura foram realizadas seguindo metodologia do Standard Methods (APHA, 1998).

4.2.1.1 Análise de ácidos voláteis por cromatografia

A análise cromatográfica dos ácidos voláteis, da primeira etapa, seguiu metodologia de extração da fase líquida desenvolvida no Laboratório de Processos Biológicos da EESC-USP (MORAES et al., 2000). No processo de preparação da amostra, utilizou-se ácido crotônico como padrão interno em meio ácido (ácido sulfúrico) e a extração foi feita em éter dietílico.

A análise cromatográfica foi realizada nas seguintes condições:

Cromatógrafo a gás: HP 6890

Coluna capilar: HP INNOWAX – 30m (diâmetro interno 0,25 mm e espessura de filme 0,25µm)

Temperatura inicial do injetor: 250°C

Temperatura inicial do detector: 300°C

Programa de temperatura do forno:

Temperatura inicial: 100°C (3 min)

Taxa de aquecimento: 5°C.min⁻¹

Temperatura final: 180°C (5 min)

Razão de split: 20

H₂ para alimentar a chama: 30 ml . min⁻¹

Vazão do gás de make up (N₂): 33 ml . min⁻¹

Detector: ionização de chama

Volume de amostra: 1 µl

4.2.1.2 Análise de álcoois por cromatografia

A análise de álcoois na primeira etapa foi feita por cromatografia empregando o método de “headspace” estático, desenvolvida durante este doutoramento pela Professora Elizabeth Matos de Moraes com colaboração do Dr. Rogers Ribeiro e realizada no Laboratório de Processos Biológicos da EESC-USP, usando-se isobutanol como padrão interno.

A análise cromatográfica foi realizada nas seguintes condições:

Cromatógrafo a gás: HP 6890

Coluna capilar: HP INNOWAX – 30m (diâmetro interno 0,25 mm e espessura de filme 0,25µm)

Temperatura inicial do injetor: 250°C

Temperatura inicial do detector: 300°C

Programa de temperatura do forno:

Temperatura inicial: 50°C (3 min)

Taxa de aquecimento: $5^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$

Temperatura final: 180°C (5 min)

Razão de split: 20

H_2 para alimentar a chama: $30 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$

Vazão do gás de make up (N_2): $33 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$

Detector: ionização de chama

Volume de amostra: $400 \mu\text{l}$

4.2.1.3 Análise de ácidos, acetona e álcoois (segunda e terceira etapas) por cromatografia

As análises de ácidos, acetona e álcoois, na segunda e terceira etapas, foram realizadas por cromatografia, empregando método de “headspace” estático, desenvolvido e realizado nesta pesquisa no Laboratório de Processos Biológicos da EESC-USP, com colaboração de Técnica Maria Ângela Talarico Adorno usando-se isobutanol (padrão para álcoois e acetona) e ácido crotônico (padrão para os ácidos) como padrões internos em meio ácido (ácido sulfúrico).

A análise cromatográfica foi realizada nas seguintes condições:

Cromatógrafo: GC 2010 Shimadzu, com amostrador automático de “headspace” combi-pal AOC 5000.

Coluna capilar: HP INNOWAX – 30 m (diâmetro interno 0,25 mm e espessura de filme $0,25\mu\text{m}$).

Temperatura inicial do injetor: 250°C

Temperatura inicial do detector: 280°C

Programa de temperatura do forno: 35°C (0') $2^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$. 38°C (0') $10^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$. 75°C (0') $35^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$. 120°C (1') $10^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$. 170°C (2')

Razão de split: 1

Gás auxiliar (N_2): $30 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$

Ar sintético: $300 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$

Hidrogênio: $30 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$

Detector: ionização de chama

Volume de amostra injetada: $400 \mu\text{l}$

Seringa de 2,5 ml;

Temperatura da seringa: 90°C ;

Temperatura de incubação da amostra: 100°C ;

Preparo das amostras:

Frascos de vidro para amostrador automático, com capacidade de 10mL e tampas rosqueáveis, com septo;

NaCl: 1 g

Amostra: 2 ml

Ácido crotônico (700 mg.l^{-1}): 100 μl

Isobutanol (1060 mg.l^{-1}): 70 μl

Ácido sulfúrico (2 mg.l^{-1}): 200 μl

4.2.1.4 Análise do biogás por cromatografia

A análise de biogás especificamente: hidrogênio, dióxido de carbono e metano, por cromatografia gasosa foi desenvolvida neste projeto com colaboração da Técnica Maria Ângela Talarico Adorno e Professora Elizabeth de Mattos Moraes e realizada no Laboratório de Processos Biológicos da EESC-USP, tendo como base a metodologia desenvolvida por Stenerson (2004).

A análise cromatográfica foi realizada nas seguintes condições:

Cromatógrafo a gás: GC 2021 Shimadzu

Coluna capilar: Carboxen 1010 – (comprimento de 30m, diâmetro interno 0,53 mm e espessura da coluna 0,30 μm).

Temperatura inicial do injetor: 200°C

Temperatura inicial do detector: 230°C

Programa de temperatura do forno:

Temperatura inicial: 40°C (2 min)

1ª Taxa de aquecimento: 5°C . min⁻¹ até 60°C

2ª Taxa de aquecimento: 25°C . min⁻¹ até 95°C

Temperatura final: 95°C (5 min)

Vazão do gás de make up (Ar): 12 ml . min⁻¹

Detector: condutividade térmica

Volume de amostra: 100 μl

4.2.2 Exames Microbiológicos

A biomassa aderida ao material suporte e desenvolvida nos reatores em batelada foi analisada por microscopia óptica e Coloração de Gram, usando microscópio de fluorescência Olympus BX60 e por técnica da Eletroforese em Gel de Gradiente

Desnaturante (DGGE). Essas análises foram realizadas pelas doutorandas Sandra Imaculada Maintinguer, Daniele Vital Vich e pela pós-doutoranda Nora Kátia Saavedra. As análises de biologia molecular dos fungos foram desenvolvidas no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas na Divisão de Recursos Microbianos da Universidade Estadual de Campinas pelas pesquisadoras Dra. Lara Durães Sette, Karen C. M. Simioni e Dra. Valéria Maia de Oliveira.

4.2.2.1 Microscopia óptica

As amostras de biomassa coletada dos reatores nas diferentes fases de operação foram analisadas através de microscopia óptica sob contraste de fase. Para essa análise, a biomassa foi desprendida do suporte e fixada em lâmina com gel Agar 2%.

4.2.2.2 Coloração de Gram

As amostras de biomassa coletadas dos reatores nas diferentes fases de operação foram pigmentadas e analisadas através de microscopia óptica de campo claro. A coloração azul violeta significa microrganismos Gram-positivos e coloração vermelha Gram-negativos (DSM, 1991).

4.2.2.3 Análises de Biologia Molecular das Bactérias

A avaliação da diversidade da comunidade microbiana foi realizada através da técnica do PCR/DGGE. O DNA foi extraído segundo o protocolo de Griffiths et al. (2000). Na amplificação dos fragmentos RNAr 16S, foram utilizados “primers” específicos do Domínio *Bacteria* (NIELSEN et al., 1999). Os fragmentos de DNA amplificados foram separados pela eletroforese em gel de gradiente desnaturante – DGGE.

4.2.2.3.1 Extração dos Ácidos Nucléicos

A extração de DNA das amostras foi feita segundo o protocolo Griffiths et al. (2000), conforme descrito a seguir:

- a) As amostras foram centrifugadas em tubos falcon de 15 ml durante 10 min, a temperatura de 4°C e 6000 rpm;
- b) O precipitado formado foi lavado com 5 ml de tampão PBS 1X;
- c) Centrifugou-se novamente durante 10 min, a temperatura de 4°C e 6000 rpm;
- d) As amostras foram mantidas em banho de gelo;
- e) Foi acrescentado ao precipitado 0,5 g de “glass beads”;

- f) Foi adicionado 1 ml de mistura tampão de fenol equilibrado com Tris, 1 ml de clorofórmio e 1 ml de tampão PBS 1 X;
- g) As amostras foram agitadas no vortex por 1 min e mantidas em gelo;
- h) Centrifugou-se durante 10 min, a temperatura de 4°C e 6000 rpm;
- i) A camada líquida foi removida com pipeta automática (aproximadamente 1 ml) para um tubo de 2ml;
- j) Foi adicionado 1ml de fenol tamponado (até preencher o tubo completamente);
- l) As amostras foram homogeneizadas em vortex durante 1 min e mantidas em gelo;
- m) Centrifugou-se a 10000 rpm por 10 min a temperatura de 4°C;
- n) 400 µl do sobrenadante foram transferidos para outro frasco;
- o) Foi adicionado 1 ml de clorofórmio;
- p) As amostras foram homogeneizadas em vortex e centrifugadas a 10000 rpm por 10 min;
- q) O sobrenadante obtido foi transferido e armazenado a -20°C

As soluções PBS e TAE foram preparadas segundo Sambrook et al. (1989).

4.2.2.3.2 Amplificação do fragmento do gene RNAr 16S através da reação de polimerização em cadeia - PCR

A partir do DNA extraído das amostras foram obtidos fragmentos RNAr 16S, utilizando a técnica da amplificação através da reação de polimerização em cadeia (PCR) com *primers* homólogos às regiões conservadas do gene RNAr 16S. A amplificação foi feita com *primers* específicos para o Domínio *Bacteria*. O procedimento para a amplificação dos ácidos nucleicos será apresentado a seguir.

A Tabela 4.4 descreve o procedimento para o preparo da solução para PCR de uma amostra a ser analisada. A Tabela 4.5 descreve as condições de amplificação para o domínio *Bacteria*. A Tabela 4.6 descreve os *primers* dos Domínios *Bacteria* utilizados nas análises de PCR.

Tabela 4.4: Procedimento para o preparo da solução de PCR para uma amostra

H ₂ O	10 x Tampão	MgCl ₂	dNTP	Primer forward	Primer reverse	Ampli Taq	Template
Milli Q	PCR	(50 mmol.l ⁻¹)	(2 m mol.l ⁻¹)	(100 p mol.l ⁻¹)	(100 p mol.l ⁻¹)	Gold Kit (5U.µl ⁻¹)	
34 µl	5 µl	1,5 µl	5 µl	1,0 µl	1,0 µl	0,5 µl	2µ

Tabela 4.5: Programação do aparelho termociclador para amplificação dos fragmentos de ácidos nucleicos para as análises de PCR

Microrganismos	nº de ciclos	Desnaturação inicial	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Final da Extensão	Resfriamento
Domínio		94°C	94°C	38°C	72°C	72°C	4°C
<i>Bactéria</i>	35	7 minutos	45 segundos	45 segundos	1 minuto	5 minutos	

Tabela 4.6: *Primers* utilizados nas análises com PCR

Microrganismos	<i>Primers</i> e sequência (5' → 3')		Fonte
Domínio	968 FGC (5'- AACGCGAAGAACCTTAC – 3')	na posição <i>E. coli</i> 968-	NIELSEN et al (1999)
<i>Bactéria</i>	1392 R (5'- AACG GGC GGT GTG TAC – 3')	na posição <i>E. coli</i> 1392-	FANG et al (2002)
	1406		

4.2.2.3.3 Eletroforese em gel de agarose

A agarose em gel eletroforético é utilizada para avaliar o produto resultante da extração dos ácidos nucleicos e da amplificação dos genes por PCR.

O procedimento para a avaliação da extração dos ácidos nucleicos e da amplificação do PCR é o mesmo; a única diferença está no marcador.

Para a extração dos ácidos nucleicos e verificar o produto da amplificação por PCR utilizou-se a concentração de agarose de 1% e o marcador foi o High DNA Mass Ladder.

O protocolo para a preparação dessa etapa está descrito a seguir:

- Foram preparadas soluções 1% de agarose e adicionada solução TAE 1 X;
- Preparou-se “bandeja” colocando-se fita crepe nos lados;
- Foi despejado o gel na “bandeja” e, em seguida, colocado pentes para formar as cavidades (poços);
- O gel foi solidificado por, aproximadamente, 30 minutos;
- Os pentes e a fita crepe que protege os lados foram retirados;
- Foi recortado um pedaço de para-filme e adicionado (fazer pontos) 2 µl de corante “loading dye”;
- Em seguida foi adicionado 5,0 µl de extrato de ácido nucleico ou produto do PCR sob o corante (ponto) e homogeneizado com o auxílio da micro-pipeta automática;
- As amostras foram transferidas para as “cavidades” formadas pela retirada dos pentes;

- i) A “bandeja” contendo gel com as amostras coradas foi colocada no aparelho Pharmacia Biotech GNA 100 (programação de 70V constante, por 40 minutos) e completada com tampão TAE 1X;
- j) O gel foi transferido para vasilha contendo brometo de etídio* por 10 minutos;
- l) Em seguida procedeu-se lavagem do gel em vasilha contendo água Milli-Q por 5 minutos;
- m) Colocou-se em câmara de trans-iluminador UV (Stratagene – Eagle Eye II) para observação do resultado;

* Brometo de etídio: substância cancerígena. Manipular sempre com luva.

O tampão TAE foi preparado segundo metodologia descrita por Sambrook et al (1989).

4.2.2.3.4 Eletroforese em gel de gradiente desnaturante

A técnica de DGGE (*Denaturing gradient Gel Electrophoresis*) permite a separação de fragmentos de DNA com os mesmos tamanhos, porém com seqüências de nucleotídeos diferentes. A separação desses fragmentos ocorre de acordo com grau de desnaturação da dupla hélice de DNA, sob a ação de géis de poliacrilamida com gradiente crescente dos agentes desnaturantes (formamida e uréia).

O procedimento dessa análise consiste na preparação da solução do gel na concentração de 0, 30 e 70% para o Domínio Bactéria.

Os géis foram preparados de acordo com a metodologia descrita na Tabela 4.7, para um volume de 100 mL, como descrito a seguir.

Tabela 4.7: Procedimentos para o preparo do gel em gradiente desnaturante para o volume de 100 ml

Regentes	Concentração do gel DGGE		
	0%	30%	70%
40% de gel acrilamida/Bis (mL)	20	20	20
Solução de 50 x TAE (mL)	2	2	2
Formamida (mL)	0	12	28
Uréia (mL)	0	12,6	29,4
Volume Total (mL)	100	100	100
(preenchido com água Milli Q)			

- a) Foi preparado “sanduíche” com o kit de placas de vidro e suporte;

- b) Foram adicionados em tubos de centrifuga de 15 ml, conforme Tabela 4.8 para o domínio *Bacteria*.
- c) Os tubos com as soluções foram mantidos em gelo, enquanto, se realizou a preparação dos géis.
- d) O temed foi adicionado por último. Este reagente provoca a solidificação do gel.
- e) Os géis foram transferidos (30% e 70%), simultaneamente, para o “sanduíche” de placas de vidro, com auxílio de 2 seringas presas ao aparelho injetor;
- f) Após 10 minutos foram colocados os pentes para formar as cavidades (poços). Em seguida foi adicionada solução do gel 0%;
- g) Após o tempo de 1 hora (tempo mínimo para a solidificação adequada dos géis) procedeu-se a preparação da câmara “eletroforética” com adição de 140 ml do reagente TAE 50 X e o volume foi completado até o volume de 7 litros com água ultra purificada;
- h) A câmara “eletroforética” foi aquecida a temperatura de 65°C. Na “corrida do gel” foi utilizada a temperatura de 60°C;
- i) Os “sanduíches” de vidro foram transferidos para a câmara “eletroforética” à 65°C;
- j) Os “pentes” foram retirados. As cavidades foram lavadas com solução tampão com o auxílio de micro-pipetas;
- l) As amostras foram preparadas conforme descrito a seguir: 25 µl de amostra (“template”); 4 µl de 6 X loading dye (corante)
- m) O corante foi colocado sob superfície de para-filme. Foi adicionado o template sobre o corante e homogeneizado com o auxílio de micro-pipeta;
- n) A mistura (corante + template) foi transferida para as cavidades do gel;
- o) A bomba de agitação foi ligada e conectada nos eletrodos à 130V;
- p) O tempo de corrida depende de cada pesquisa. Neste trabalho foram utilizadas 16 horas;

Tabela 4.8: Constituição das soluções de gel desnaturante para o Domínio *Bacteria*

Constituição das soluções	Domínio <i>Bacteria</i>
0%	3 ml solução 0%; 20 µl APS 10%; 2 µl temed
30%	14 ml solução 30%; 111 µl APS 10%; 11 µl temed
70%	14 ml solução 70%; 111 µl APS 10%; 11 µl temed

- q) Decorrido o tempo de “corrida” do gel, o “sanduíche” de vidro foi retirado e transferido o gel para uma bandeja de acrílico;
- r) A bandeja com gel foi submersa em solução de brometo de etídio e mantida durante 20 minutos;
- s) O gel foi transferido para câmara de transiluminador UV (Stratagene – Eagle Eye II) e efetuada leitura do resultado (software; Eagle Eye II).

4.2.2.3.5 Recorte das Bandas presentes nos Ensaios

Após a obtenção dos resultados do DGGE, foram recortadas as bandas principais que foram evidenciadas nas canaletas dos três ensaios. A intensidade na coloração de uma banda corresponde à abundância relativa das espécies bacterianas presentes (ZHANG; FANG, 2000). O recorte de banda, para obtenção das seqüências de nucleotídeos dos microrganismos presentes nos experimentos, tem sido utilizado com frequência, em pesquisas de microbiologia (SEVEG et al., 2007), incluindo produção biológica de gás hidrogênio (KAWAGOSHI et al., 2005; KIM et al., 2006; UENO et al., 2001).

As bandas recortadas foram colocadas, separadamente, em tubos com água ultra purificada (30 μ l), mantidas a 4°C durante o período de 24 h. Esse procedimento foi necessário para que o DNA presente na Banda recortada pudesse migrar e ficar na solução aquosa que foi utilizada para o seqüenciamento.

A seguir foi efetuado novo PCR, utilizando *primers* 968F e 1392R, de acordo com o mesmo protocolo citado anteriormente, para amplificar o DNA que estava presente nas bandas recortadas e que migraram para a solução aquosa.

4.2.2.3.6 Purificação do Produto do PCR para reação de seqüenciamento

A purificação do produto do PCR se torna necessária para que restos de reagentes e demais *primers* não atrapalhem na obtenção das seqüências. O *primer* GC Clamp é um dos interferentes que foi adicionado no protocolo do PCR e permanece nas amostras, necessitando ser retirado.

O protocolo de purificação do produto de PCR foi efetuado de acordo com “Ultraclean PCR Clean-up” (MoBio Laboratories, Inc), descrito a seguir:

- a) Foram adicionados 250 μ l de reagente SPINBIN em 50 μ l de amostra. Homogeneizou-se com pipeta.
- b) Toda mistura foi transferida para tubos contendo cesto de filtração em seu interior;
- c) Foi procedida centrifugação a 13000 rpm durante 30 segundos a 20°C;
- d) O cesto de filtração foi removido e descartado o líquido filtrado;
- e) 300 μ l do reagente SPINBIN foram adicionados no cesto de filtração;
- f) Foi procedida centrifugação a 13000 rpm durante 30 segundos a 20°C;
- g) O líquido filtrado foi removido;
- h) Foi procedida centrifugação a 13000 rpm durante 30 segundos a 20°C para secagem;
- i) O tubo coletor em que o cesto de filtração estava inserido foi trocado;

- j) 50 μl do tampão eluente Tris (10mmol.l^{-1}) foram adicionados no cesto de filtração;
- l) Foi procedida centrifugação a 13000 rpm durante 30 segundos a 20°C ;
- m) A cesta de filtração foi descartada;
- n) O produto do PCR purificado ficou no filtrado.

4.2.2.3.7 Reação de seqüenciamento

Em seguida, foi feita a reação de seqüenciamento, conforme descrita na Tabela 4.9. As amostras foram colocadas no Termociclador com a seguinte programação para cada ciclo: 94°C por 15 segundos; 38°C por 45 segundos e 60°C por 4 minutos. Esse processo ocorreu por 35 ciclos.

Tabela 4.9: - Procedimento para preparo da amostra a ser seqüenciada

Reagentes	Quantidades (μl)
Big Dye	2
Primer 968F	4
Tampão	0,5
Água Milli Q estéril	0,5
Amostra	3
Total	10

Foram adicionados 40 μl de isopropanol (65%) em 10 μl de amostra e homogeneizados com auxílio de pipeta. A mistura foi mantida a temperatura ambiente durante 15 minutos. Em seguida foi procedida centrifugação a 14000 rpm durante 30 minutos a 20°C . O isopropanol foi removido através da inversão do tubo onde foi vertido.

Foram adicionados 200 μl de etanol 60%. Em seguida foi procedida centrifugação a 14000 rpm durante 5 minutos a 20°C . O etanol foi removido com a ponteira da pipeta apoiada do lado oposto à formação do *pellet*. Os tubos permaneceram abertos em temperatura ambiente por aproximadamente 2 h para secagem. Foram adicionados 15 μl de solução formamida Hi Di. As amostras foram para o termociclador para que ocorresse a desnaturação do DNA a 94°C durante 4 minutos. Em seguida foi efetuado choque térmico com a colocação das amostras em banho de gelo durante 5 minutos. As amostras foram transferidas para os tubos de seqüenciamento e colocadas no seqüenciador ABI 310 da Applied Biosystem.

A identificação dos diferentes microrganismos foi realizada utilizando-se conjunto de reagentes para seqüenciamento automático baseados em didesoxinucleotídeos marcados com fluorocromos (chamados *dye terminators*).

As concentrações de DNA molde e de *primers* seguiram as instruções dos fabricantes.

As reações de seqüenciamento foram purificadas em coluna Sephadex G50 e aplicadas no seqüenciador Megabace 1000 da GE Healthcare.

A análise foi efetuada através do *software Sequence Analyser 3.0* com *basecaller Cimarron 3.12*.

As seqüências obtidas do gene RNAr 16S foram alinhadas com software DNA Star (SeqMan)

A árvore filogenética foi obtida usando método *Neighborjoining* do *software Mega 3.1*. Foi aplicado também método de *Bootstrap* com 500 replicatas para estimar a confiabilidade na topologia da árvore filogenética obtida.

4.2.2.4 Caracterização dos fungos - PCR-DGGE / Árvore Filogenética

A caracterização dos fungos presentes nos reatores contendo 75% (Amostra 1) e 91% (Amostra 2) de porosidade, estudados na segunda fase da primeira etapa foi desenvolvido no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas na Divisão de Recursos Microbianos da Universidade Estadual de Campinas pelas pesquisadoras Dra. Lara Durães Sette, Karen C. M. Simioni e Dra. Valéria Maia de Oliveira.

4.2.2.4.1 Extração de DNA a partir das amostras de lodo

O DNA total foi extraído das amostras utilizando o kit de extração de DNA FastDNA Spin for Soil Kit (MP Biomedicals). Para a extração de DNA foi utilizado cerca de 1 ml das amostras de biomassa e as amostras foram processadas de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante. Os resultados da extração de DNA foram visualizados em géis de agarose 0,8% corados com brometo de etídio ($0,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e documentados utilizando-se o sistema UVP BioImaging Systems, GDS 8000. As estimativas das concentrações de DNA foram feitas através da comparação com padrões de concentração de DNA do fago lambda.

4.2.2.4.2 Amplificação do gene RNA ribossomal 18S

A metodologia consistiu na amplificação parcial do DNA ribossomal 18S pela

metodologia de PCR, utilizando como molde o DNA genômico extraído diretamente das amostras. Os primers (oligonucleotídeos sintéticos) utilizados para a reação de PCR foram FR1-GC e FF390 (VANIO; HANTULA, 2000), homólogos às extremidades conservadas do gene RNA ribossomal 18S de fungos. Utilizou-se 1 μ l de DNA (diluição 1/10), em reações de 25 μ l contendo 2,0 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen); 1 $\times$ Tampão da Taq (Invitrogen); 1,5mmol. l^{-1} de cloreto de magnésio (Invitrogen) 0,2 m mol. l^{-1} de uma mistura de dNTP e 0,4 μ mol. l^{-1} de cada primer. O programa de amplificação utilizado foi baseado no programa descrito por Gomes et al. (2003) com modificações (Tabela 4.10).

Tabela 4.10: Programa amplificação do gene RNA ribossomal 18S. (adaptado de GOMES et al., 2003).

Ciclos	Desnaturação	94°C 8min
Ciclos (10X)		94°C 30seg
		60°C 45seg (-0,50C/ciclo)
		72°C 3min
Outros (25X)		94°C 30seg
		55°C 45seg
		72°C 3min
	Extensão	72°C 10min
	Hold	40°C

4.2.2.4.3 DGGE de seqüências de DNAr 18S amplificadas a partir das amostras de biomassa

Os resultados de amplificação dos fragmentos do gene para RNAr 18S foram confirmados em géis de agarose 1,2%, corados com brometo de etídio (0,1 μ g. ml^{-1}), antes de se proceder à eletroforese em gel desnaturante.

Cerca de 5 e 10 μ l da reação de PCR foram aplicados no gel DGGE (6%), cujas condições de eletroforese foram 50 V por 16h a 60°C. O gradiente de agentes desnaturantes (uréia e formamida) variou de 30 a 50%.

4.2.2.4.4 Isolamento (extração) de bandas do gel de DGGE

As bandas escolhidas para serem clonadas e seqüenciadas foram extraídas do gel de DGGE de acordo com o protocolo “Crush and Soak” descrito por Maxam e Gilbert (1977). Após a extração das bandas foram realizadas diluições sucessivas (1/10, 1/100 e 1/1000) e amplificações foram realizadas para estas diluições de acordo com a metodologia descrita no item 4.2.3.2 Com a finalidade de se verificar a pureza das bandas extraídas do gel de

DGGE, os produtos das amplificações foram submetidos à eletroforese em gel³⁴ desnaturante como descrito no item 4.2.3.3. As diluições que apresentaram bandas únicas no gel de DGGE foram utilizadas para a realização de novas amplificações por meio de PCR utilizando, neste caso, os primers FR1 (sem o clamp) e FF390 e as mesmas condições descritas anteriormente (item 4.2.3.2) e submetidas à clonagem e sequenciamento.

4.2.2.4.5 Clonagem e sequenciamento

Cerca de 500 ng dos produtos de PCR (3 µl da reação de amplificação) foram utilizados em reações de ligação com o vetor plasmidial pGEM-T (Kit pGEM-T Vector System, Promega), segundo especificações do fabricante. A seguir, procedeu-se a transformação (físico-química) em Células Competentes JM 109 (Promega). Os transformantes positivos (colônias brancas) foram repicados em meio LB/ampicilina e após 16h de crescimento a 37°C, 2 µl da cultura foram submetidos a uma reação de PCR utilizando os primers M13f (5'- CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC - 3') e M13r (5'-TTT CAC ACA GGA AAC AGC TAT GAC - 3').

Os amplicons gerados a partir da amplificação plasmidial foram purificados utilizando mini-colunas (GFX PCR DNA and gel band purification kit, GE Healthcare) e submetidos ao sequenciamento em sequenciador automático (MegaBace, GE Healthcare). As reações de sequenciamento foram realizadas com o kit DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBace DNA Analysis Systems (GE Healthcare). Os primers utilizados para o sequenciamento foram M13f e M13r. Estes primers foram adicionados na concentração de 3,2 pmoles por reação.

4.2.2.4.6 Análise filogenética

As seqüências parciais de DNAr 18S obtidas com cada um dos primers foram montadas em um contig (seqüência única combinando os diferentes fragmentos obtidos) com ajuda do programa phredPhrap e comparadas com as seqüências de DNAr 18S de organismos representados na base de dado Genbank (NCBI, 2007). As seqüências foram alinhadas utilizando o programa CLUSTAL X (THOMPSON et al., 1994) e as análises filogenéticas foram conduzidas utilizando o programa MEGA versão 3.0 (KUMAR et al., 2004). As matrizes de distância evolutiva foram calculadas com o modelo de Kimura (1980) e a construção da árvore filogenética a partir das distâncias evolutivas foi feita pelo método de Neighbor-Joining (SAITO; NEI, 1987), com valores de bootstrap calculados a partir de 1.000 re-amostragens, utilizando o software de rotina incluído no programa MEGA 3.0.

4.2.3 Ajuste Matemático

A máxima atividade específica de hidrogênio foi obtida do ajuste dos pontos experimentais à função não linear Sigmoidal de Boltzmann (baseado no algoritmo iterativo dos mínimos quadrados Levenberg-Marquardt). O software usado foi o Microcal Origin® 5.0.

5. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

5.1 Primeira Etapa - Reatores Anaeróbios

5.1.1 Primeira Fase – Diferentes suportes e TDHs

5.1.1.1 Caracterização do Material Suporte

Para o emprego dos materiais suportes nos reatores, algumas etapas foram realizadas: corte dos materiais suportes: carvão e polietileno; caracterização dos materiais suportes; ensaio de granulometria; ensaio de porosidade.

5.1.1.1.1 Corte dos materiais suportes

Três materiais suportes foram empregados: Argila expandida, Carvão vegetal e Polietileno de baixa densidade (Figura 5.1).

Figura 5.1: Amostras dos materiais suporte cortados nas dimensões para aplicação nos reatores (a) Argila expandida, (b) carvão vegetal e (c) polietileno de baixa densidade.

A granulometria original da argila não foi modificada. O Carvão foi cortado manualmente utilizando-se espátula cortante, a fim de gerar uma granulometria similar a da argila expandida. O Polietileno, que se apresentava na forma de tiras, foi cortado usando uma serra circular do Laboratório de Madeiras e de Estruturas de Madeira (LAMEM) da Escola de Engenharia de São Carlos.

5.1.1.1.2 Caracterização dos materiais suportes

Os materiais empregados no processo foram caracterizados no Centro de Caracterização de Materiais (CCDM) da Universidade Federal de São Carlos (Tabela 5.1).

Tabela 5.1: Características dos materiais suportes

	Área Superficial ($\text{m}^2.\text{g}^{-1}$)	Porosidade (%)
Argila	1,0778	53,8
Carvão	3,5117	42,5
Polietileno	7,9401	Não se aplica

5.1.1.1.3 Ensaio de granulometria dos materiais suportes

Cortados os materiais suportes, estes foram submetidos a ensaios de granulometria, realizados no Departamento de Geotecnia da Escola de Engenharia de São Carlos. Para tal, amostras dos materiais suportes com pesos previamente determinados foram submetidas ao ensaio de peneiramento. Foram empregadas, nesta etapa, peneiras com abertura comercial de: 19,00 mm, 15,90 mm, 12,50 mm, 9,52 mm 7,93 mm e 6,35 mm. O ensaio foi realizado em Agitador Solotest (nº7, série 0805, Referencia – 1202230) com duração de 15 min com agitação constante. Finalizada essa etapa, as massas retidas em cada peneira foram pesadas e construíram-se as curvas granulométricas.

Os materiais suportes foram caracterizados tanto para a primeira quanto para a segunda fase da primeira etapa em termos de diâmetro médio ($D_{50\%}$), diâmetros máximos e mínimos e índice de uniformidade C , relação entre o D_{60}/D_{10} , que D_{60} é a granulometria da peneira em que passa 60% do material suporte, D_{10} é a granulometria da peneira em que passa 10%.

Primeira Etapa - TDH de 2h

Os dados obtidos para o primeiro ensaio estão representados na Tabela 5.2.

Tabela 5.2: Características granulométricas dos materiais suportes - TDH 2 h.

	Material Suporte		
	Argila	Carvão	Polietileno
D_{50} (mm)	13,68	16,18	16,38
D_{10} (mm)	13	15	15
D_{60} (mm)	17	18	18
C	1,31	1,20	1,20
D máximo (mm)	17,45	17,45	17,45
D mínimo (mm)	8,73	7,38	7,14

Primeira Etapa TDH de 0,5 h

Os dados obtidos para o primeiro ensaio estão representados na Tabela 5.3.

Tabela 5.3: Características granulométricas dos materiais suportes – TDH 0,5 h.

	Material Suporte		
	Argila	Carvão	Polietileno
D ₅₀ (mm)	12,8	15,5	12,0
D ₁₀ (mm)	11,40	11,00	11,70
D ₆₀ (mm)	12,60	13,90	13,50
C	1,10	1,26	1,15
D máximo (mm)	17,45	19,00	19,00
D mínimo (mm)	8,73	7,14	7,14

5.1.1.1.4 Porosidade do Leito

A medida da porosidade inicial do leito foi realizada sempre antes do início da operação dos reatores, considerando que o desenvolvimento do biofilme era nulo.

Antes de realizar o ensaio de porosidade, os materiais suportes foram imersos em água por 24 h, a fim de minimizar os efeitos da porosidade intrínseca dos materiais, possibilitando obter no ensaio somente a porosidade efetiva do leito.

Os materiais suportes foram dispostos dentro do leito e adicionou-se água até completa imersão dos materiais. Em seguida a água de preenchimento foi drenada. Esse procedimento foi realizado em triplicata. Com o resultado das drenagens, foi possível determinar a porosidade efetiva ou de escoamento do leito.

Tabela 5.4: Porosidade dos leitos obtidos para os TDHs de 0,5 h e 2 h.

Material Suporte	Porosidade do leito (%)	
	TDH – 0,5 h	TDH – 2h
Argila	41,99±0,05	38,93±0,23
Carvão	49,67±0,67	46,61±0,60
Polietileno	50,07±0,45	51,95±0,39

5.1.2 Segunda Fase –Diferentes Porosidades

5.1.2.1 Caracterização do Material Suporte

Para o emprego do polietileno com diferentes porosidades nos reatores, algumas etapas foram realizadas: corte do polietileno; ensaio de granulometria; porosidade do leito.

5.1.2.1.1 Ensaio de granulometria dos materiais suportes

O ensaio de granulometria seguiu a mesma metodologia aplicada na primeira fase. Entretanto, para as diferentes porosidades, usaram-se peneiras com diferentes aberturas; para 50% usou-se: 19,00; 15,90; 12,50; 9,52; 7,93 e 6,35 mm; para 75%: 25,00; 19,10; 15,90; 12,70; 9,52 e 7,93 mm; e para 91%: 50,00; 38,10; 31,70; 25,00; 19,10; 15,90; 12,70; 9,52 e 7,93 mm.

Os resultados obtidos para as porosidades de 50%, 75% e 91% do leito são apresentados na Tabela 5.5.

Tabela 5.5: Características granulométricas do polietileno para as diferentes porosidades.

	Polietileno		
	50%	75%	91%
D ₅₀ (mm)	12,0	14,3	21,0
D ₁₀ (mm)	11,70	16,50	20,00
D ₆₀ (mm)	13,50	17,50	28,35
C	1,15	1,06	1,42
D máximo (mm)	19,00	25,00	50,00
D mínimo (mm)	7,14	7,93	7,93

5.1.2.1.2 Porosidade do Leito

Os ensaios de porosidade seguiram mesma metodologia empregada na primeira fase. Entretanto, para obtenção das porosidades de 75% e 91% os materiais suportes foram submetidos ao calor com a finalidade de derreter e agregar os materiais. Para gerar a porosidade de 75% os materiais suportes foram agregados de dois em dois (Figura 5.2) e para 91% de quatro em quatro (Figura 5.3).

(a)

(b)

Figura 5.2: (a) Polietileno cortado e (b) Arranjo para obtenção da porosidade de 75%.

Figura 5.3 – (a) Polietileno colado e (b) Arranjo para obtenção da porosidade de 91%.

5.1.3 Imobilização da Primeira Etapa

Os Reatores de Leito Fixo de Fluxo Ascendente, usados na primeira e na segunda fase da primeira etapa, foram inoculados com a biomassa obtida de fermentação natural, sem a adição prévia de inóculo. O inóculo, meio fermentado, foi bombeado para os reatores seguindo mesmo TDH e temperatura de operação dos sistemas por 24 horas.

5.1.4 Operação na Primeira Etapa – Reator Anaeróbico de fluxo ascendente

5.1.4.1 Operação dos reatores da Primeira Etapa

Nas duas fases da primeira etapa, os três reatores contendo os diferentes materiais suportes e porosidades foram operados concomitantemente sob as mesmas condições de operação: temperatura de 25°C e tempos de detenção hidráulica (TDH) de 2 h e 0,5 h (Tabela 5.6, 5.7 e 5.8).

Os reatores, em ambas as fases, foram submetidos inicialmente ao meio de alimentação previamente fermentado por três dias. As alimentações eram realizadas diariamente. A biomassa foi se desenvolvendo mediante a passagem do afluente pelo material suporte.

Tabela 5.6: Dados de operação dos reatores na primeira fase da primeira etapa TDH de 2 h.

Parâmetros	Material Suporte		
	Argila	Carvão vegetal	Polietileno
Volume útil do reator (l)	1,820	1,975	2,220
Q (l.h ⁻¹)	0,910	0,988	1,110

Foram utilizadas nesta etapa três bombas para manter os reatores sob fluxo ascendente. As bombas são do tipo: Bomba Dosadora Concept Plus, marca ProMinent, 230 V, 50/60 Hz, com pressão de 7 bar, vazão máxima de 4 l.h⁻¹.

Tabela 5.7: Dados de operação dos reatores na primeira fase da primeira etapa TDH de 0,5 h.

Parâmetros	Material Suporte		
	Argila	Carvão vegetal	Polietileno
Volume útil do reator (l)	1,874	2,056	2,120
Q (l.h ⁻¹)	3,748	4,112	4,24

Tabela 5.8: Dados de operação dos reatores na segunda fase da primeira etapa.

Parâmetros	Polietileno- Porosidade		
	50%	75%	91%
Volume útil do reator (l)	2,120	2,765	3,023
Q (l.h ⁻¹)	4,24	5,53	6,05

5.2 Segunda Etapa - Diferentes Inóculos

Quatro Reatores em Batelada foram inoculados em duplicata com quatro diferentes inóculos:

1- Três provenientes dos Reatores de Leito Fixo de Fluxo Ascendente, aderido em argila expandida (A), carvão vegetal (B) e polietileno de baixa densidade (C), da primeira fase da primeira etapa operados com TDH de 0,5 h. A biomassa de cada reator foi desprendida do material suporte e adicionada na forma suspensa nos Reatores em Batelada.

2 – O último inóculo (D), proveniente da Estação de Tratamento de Efluentes da Avícola Dacar, foi macerado e sofreu tratamento térmico a 100°C por 1 h (Kawagoshi et al., 2005), a fim de inativar microrganismos metanogênicos. Após tratamento térmico, a biomassa foi adicionada na forma suspensa no Reator em Batelada.

Em cada frasco (250 ml) foram adicionados 100 ml do meio de alimentação e 2 g de biomassa. Para remoção do oxigênio e estabelecimento da anaerobiose no sistema, fluxionou-se Hélio (He) até completa troca de atmosfera (remoção de ar) do volume de headspace (Figura 5.4).

Os frascos foram incubados em câmara escura sem agitação a temperatura de 25°C a fim de manter o sistema fermentativo.

Periodicamente amostras da fase gasosa eram retiradas para análise e somente ao final do processo, caracterizada pela máxima e constante concentração de hidrogênio na fase gasosa, foram realizadas análises da fase líquida e sólida.

Figura 5.4: Foto do experimento, reatores contendo os diferentes inóculos.

5.3 Terceira Etapa - Diferentes Águas Residuárias

Quatro reatores em batelada foram inoculados em duplicada com diferentes águas residuárias diluídas em câmara climatizada a 25°C, sem agitação e luminosidade, inibindo aparecimento de microrganismos fototróficos (Figura 5.5).

Em cada frasco (2000 ml), foram adicionados 900 ml do meio de alimentação e 100 ml de biomassa. Para remoção do oxigênio e estabelecimento da anaerobiose no sistema, fluxionou-se Argônio (Ar) até completa troca de atmosfera do headspace (Figura 5.5).

Em intervalos de uma hora, retiravam-se 100 μ l da fase gasosa do headspace dos reatores em batelada, até os sistemas atingirem a máxima produção de hidrogênio. Amostras da fase líquida eram retiradas periodicamente e somente ao final do processo, caracterizada pela máxima e constante concentração de hidrogênio na fase gasosa, eram retiradas amostras da fase sólida (SSV) para análise.

Figura 5.5: Foto do experimento, reatores contendo diferentes substratos, em duplicata.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Primeira Etapa – Reatores Anaeróbios de Fluxo Ascendente

6.1.1 Primeira Fase – Diferentes suportes e TDHs

6.1.1.1 Operação dos reatores – TDH de 2 h

Três reatores foram operados com diferentes materiais suportes (argila expandida, carvão vegetal e polietileno de baixa densidade) submetidos a TDH de 2 h. Para evitar repetições e termos muito longos, os reatores contendo argila expandida, carvão vegetal e polietileno de baixa densidade serão denominados “Argila”, “Carvão” e “Polietileno”, respectivamente, ao longo do texto.

Inicialmente, a inoculação dos reatores foi realizada bombeando o meio fermentado previamente (via fermentação natural descrita no tópico 4.1.1.4) durante 24 h. Finalizada esta etapa, iniciou-se a operação dos reatores.

Todos os sistemas apresentaram capacidade de degradar a sacarose, porém com oscilações contínuas de concentração (Figura 6.1). Em doze dias de operação os reatores apresentavam elevadas eficiências de conversão de sacarose: Argila (62%), Carvão (73%) e Polietileno (68%); e nos dez últimos dias de operação (78º ao 89º dia) as conversões variaram de 77% a 91% (Argila – 77%, Carvão - 91% e Polietileno - 84%) (Figura 6.1.b) e as concentrações finais de sacarose foram de: 205,5 mg. l^{-1} para a Argila, 81,5 mg. l^{-1} para o Carvão e de 145,3 mg. l^{-1} para o Polietileno (Figura 6.1.a).

Esses resultados oscilatórios mostram a instabilidade do sistema, uma vez que se trata de uma etapa intermediária do processo anaeróbio, com alta velocidade de crescimento microbiano (aferido pela redução do volume útil do leito após 89 dias de operação - Tabela 6.1), que provoca alterações nas inter-relações microbianas, no metabolismo e na competição por diferentes substratos. Outros trabalhos obtiveram resultados que vão ao encontro dos observados nesta pesquisa. Van Ginkel e Logan (2005) observaram que, quanto menor o TDH adotado (operaram com TDH de 1 a 10 h) maior será o acúmulo de biomassa e Ghosh (2003) reporta que culturas acidogênicas duplicam-se a cada 2 horas.

(a)

(b)

Figura 6.1: (a)Concentração de sacarose por tempo de operação dos reatores para TDH de 2 h e (b) Eficiência de conversão de sacarose por tempo: (□) Afluente, (■) Argila, (○) Carvão e (●) Polietileno.

Essa competição por substratos provocou nos sistemas a conversão da sacarose a ácidos e álcoois, que conseqüentemente levou a redução do pH nos reatores, os valores de pH obtidos nos efluentes foram de 4,5 para argila, 4,3 para o carvão e 4,6 para o polietileno (Figura 6.2).

Além da geração de subprodutos líquidos, foi produzido biogás composto por hidrogênio e dióxido de carbono (Figura 6.3), resultados esperados pelas condições de operação adotadas e como observado em outras pesquisas (CHANG et al., 2002; LEE et al., 2003).

Os principais ácidos obtidos foram o acético e o butírico, como levantado por Van Ginkel e Longan (2005). As concentrações máximas dos ácidos acético e butírico observadas foram de: 113 e 144 mg. l^{-1} ; 126 e 219 mg. l^{-1} ; 101 e 166 mg. l^{-1} , para argila, carvão e polietileno, respectivamente. A concentração de ácido capróico manteve-se inferior a 15 mg. l^{-1} durante todo o processo. Outros ácidos, como propiônico, valérico, isobutírico, isovalérico, foram observados em concentrações inferiores a 1 mg. l^{-1} , principalmente no final do processo, em função do aumento da massa celular e conseqüentemente da diversidade microbiana (Figura 6.3).

Tabela 6.1: Redução do volume útil dos leitos ao final dos do processo, após 89 dias, para TDH de 2 h.

Reatores contendo diferentes suportes	Volume reduzido (%)
Argila expandida	39
Carvão vegetal	29
Polietileno de baixa densidade	20

Os principais álcoois observados foram etanol e butanol, porém o etanol foi o álcool predominante. As concentrações máximas e mínimas do etanol e butanol observadas foram de: 4-435 e 2-94 mg. l^{-1} ; 9-329 e 1-159 mg. l^{-1} ; 0-253 e 0-84 mg. l^{-1} , para argila, carvão e polietileno, respectivamente.

Não foi observada a presença de ácidos e álcoois no afluente.

A Figura 6.4 apresenta a variação temporal da vazão volumétrica de hidrogênio em cada reator; somente o reator preenchido com argila apresentou picos cromatográficos de baixa intensidade de metano, ao final do processo.

A tendência de queda de produção de hidrogênio, após 7 dias de operação, pode ser atribuída à redução do volume útil provocada pelo aumento da biomassa, período que coincide com o aumento da formação de ácidos e álcoois (Figura 6.4).

No final do processo houve estabilidade de produção de ácidos e álcoois, sendo que o ácido butírico e etanol apresentaram-se em maiores concentrações (Figura 6.3), principalmente após 50 dias de operação. Rotas coerentes com a faixa de pH atingida no efluente do processo (Figura 6.2), descritas previamente por Hwang et al. (2004) para pH de 4,0 a 4,5, com principal rota de conversão a ácido butírico.

Figura 6.2: Variação de pH durante a operação dos reatores (TDH de 2 h): (■) Argila, (○) Carvão e (●) Polietileno.

(a)

(b)

(c)

(d)

Figura 6.3: Produtos da degradação da sacarose obtidos no processo de operação com TDH de 2 h para os reatores com (■)Argila, (○)Carvão e (●)Polietileno. a) Ácido acético; b) Ácido butírico; c) Etanol e d) Butanol.

A ausência de hidrogênio pode não ser desvantajosa, pois o deslocamento do processo gera subprodutos de alto valor econômico como etanol, usado como combustível

e insumo para a indústria química; e os ácidos usados na indústria alimentícia e química (LEITE et al, 2008). Sendo assim, o processo poderia se otimizado para gerar os produtos mais vantajosos para os cenários econômicos locais e temporais.

Figura 6.4: Produção de hidrogênio durante o processo de operação dos reatores para TDH de 2 h: (■) Argila, (○) Carvão e (●) Polietileno.

Os materiais suportes apresentaram grande similaridade nos resultados de produção de hidrogênio e no comportamento de produção de ácidos e álcoois. Sendo assim, a escolha do material suporte deve envolver o caráter operacional, caracterizado pela fragmentação do carvão vegetal e da argila expandida ao longo do processo. Dados observados pelo rebaixamento do leito e pelo entupimento da saída dos reatores, que mostraram as desvantagens no emprego desses materiais. Baseado nesses dados, o polietileno seria o material suporte, dentre os avaliados, mais adequado para aplicação nestes sistemas fermentativos.

6.1.1.2 Perfil de conversão de sacarose e produção de ácidos e álcoois – TDH de 2 h

Finalizada a etapa de monitoramento, e atingidos 89 dias de operação, com produção volumétrica do hidrogênio nula, foram realizados perfis espaciais de conversão de sacarose e de pH (Figura 6.5), a fim avaliar a possibilidades de otimizar o processo.

As eficiências de conversão e concentrações finais de sacarose nos perfis espaciais foram, respectivamente, de: 83% e 147,6 mg.l⁻¹ para reator com Argila; 95% e 40,1 mg.l⁻¹ para o reator com Carvão e de 95% e 42,1 mg.l⁻¹ para o reator com Polietileno (Figura 6.5).

No primeiro segmento dos reatores, denominado zona de mistura, houve conversão de sacarose superior a 40%, indicando que no primeiro trecho haveria microrganismos em suspensão, o que foi comprovado pelos dados de microscopia, que serão apresentados no tópico de análises microbiológicas.

O pH inicial no afluente foi ajustado para 5,6 e ao longo do processo houve redução

do pH, em função das reações de conversão de sacarose a ácidos. No primeiro trecho do reator, zona de mistura, o pH se apresentava baixo, em torno de $4,5 \pm 0,2$, pH favorável ao consumo de hidrogênio, via produção de ácido butírico e etanol (VAN GINKEL; LOGAN, 2005), como observado ao final do processo de operação e apresentado no tópico anterior.

Figura 6.5: a) Eficiência de remoção de sacarose no perfil espacial para TDH de 2 h: (■) Argila, (○) Carvão e (●) Polietileno; b) pH obtido no perfil espacial para TDH de 2h: (■) Argila, (○) Carvão e (●) Polietileno.

Torna-se evidente a necessidade da tomada de ações a fim de aumentar o pH atingido no final do processo para maximizar a produção de hidrogênio. Dessa forma, na segunda fase houve a redução do TDH de 2 h para 0,5 h.

6.1.1.3 Operação dos reatores - TDH de 0,5 h

Os reatores foram submetidos ao TDH de 0,5 h. Cabe ressaltar que não houve aproveitamento de biomassa inoculada e nem do material suporte de uma fase para a outra, para que as fases fossem normalizadas e pudessem ser comparadas. O método de inoculação foi o mesmo empregado para o TDH de 2 h.

A redução do TDH teve como objetivo aumentar a conversão de sacarose a hidrogênio e melhorar a remoção do biogás no sistema, reduzindo o consumo do hidrogênio a formação de subprodutos.

A queda do TDH, inicialmente, foi caracterizada por grande instabilidade de conversão de sacarose e baixa conversão ao longo do processo. Essa instabilidade pode estar relacionada com a alta carga orgânica aplicada, em torno de $96 \text{ kg.m}^{-3}\text{d}^{-1}$, quatro vezes superior a aplicada para TDH de 2h.

(a)

(b)

(c)

Figura 6.6: (a) - Concentração de sacarose por tempo de operação dos reatores para TDH de 0,5 h; (b) Eficiência de conversão de sacarose por tempo de operação dos reatores e (c) variação de pH no efluente dos reatores: (□) Afluente, (■) Argila, (○) Carvão e (●) Polietileno.

No final do processo de operação (43 dias), as máximas conversões de sacarose obtidas foram de 54% para a argila, 74% para o carvão e 59% para o polietileno (Figura 6.6). Outros autores reportam que baixos TDHs e altas taxas de carregamento orgânico provocam menores conversões de matéria orgânica em reatores de fluxo contínuo (CAMILLI; PEDRONI, 2005).

Apesar da instabilidade dos sistemas, houve aumento no rendimento (conversão de hidrogênio por mol de sacarose) e na produção volumétrica de hidrogênio (Figura 6.7 e Tabela 6.3), como relatado em literatura para baixos TDHs (VAN GINKEL; LOGAN, 2005).

As reduções de volumes úteis dos reatores foram ainda maiores que as observados para TDH de 2 h (Tabela 6.2). Entretanto, os valores de pH obtidos foram superiores (pH = 5), mas não suficiente para manter as produções de H_2 por mais de 40 dias (Figura 6.6c)

A instabilidade do processo é refletida na formação de ácidos e álcoois (Figura 6.8), indicando que dificilmente, sob essas condições de operação, esses subprodutos do processo poderiam ser comercializados, ao contrário do que foi observado, pelo menos para o ácido butírico, para os reatores operados com TDH de 2 h.

Figura 6.7: Produção de hidrogênio durante o processo de operação dos reatores para TDH 0,5 h: (■) Argila, (○) Carvão e (●) Polietileno.

Tabela 6.2: Redução do volume útil do leito ao final da operação com TDH de 0,5 h

Reatores contendo diferentes suportes	Volume reduzido (%)
Argila expandida	60
Carvão vegetal	44,6
Polietileno de baixa densidade	59,3

A concentração de etanol manteve-se inferior a 105 mg.l^{-1} durante todo o processo, que refletiu na mais alta produção de hidrogênio para TDH de 0,5. Alguns pesquisadores citam que a produção de etanol via ácido acético e hidrogênio é favorecida em condições de alta pressão parcial de hidrogênio (OH; VAN GINKEL; LOGAN, 2003), que pode ser minimizada com o aumento da taxa de remoção do biogás do meio, como, por exemplo, pela redução do TDH, resultado constatado neste trabalho (Tabela 6.3) e por outros pesquisadores (VAN GINKEL; LOGAN, 2005).

Na Tabela 6.3, são apresentadas as produções de hidrogênio máximas e médias para os TDHs adotados. A produção de hidrogênio é maior para TDH mais baixo, que se associa com a baixa conversão de etanol e butanol, como constatado por Hawkes et al. (2007). As produções máximas volumétricas foram observadas para o polietileno em todos os TDHs, apesar de não ser possível avaliar qual material suporte seria mais adequado para produzir hidrogênio. Cabe ressaltar que, como na fase anterior, nessa etapa foi observada a fragmentação dos materiais suportes carvão e argila.

Figura 6.8: Produtos da degradação da sacarose obtidos no processo de operação com TDH de 0,5 h para os reatores com (■) Argila, (○) Carvão e (●) Polietileno. a) Ácido acético; b) Ácido butírico; c) Etanol e d) Butanol.

Tabela 6.3: Máxima relação obtida de mols de hidrogênio produzido por mol de sacarose convertida para TDHs de 0,5 e 2 h.

	TDH= 0,5 h			TDH = 2,0 h		
	mol H ₂ /mol		m/ H ₂ .h ⁻¹	mol H ₂ /mol		m/ H ₂ .h ⁻¹
	sacarose			sacarose		
Material Suporte	Máxima *	Média **	Máxima	Máxima *	Média **	Máxima
Argila Expandida	6,55	4,44	585	5,16	3,27	280
Carvão Vegetal	6,75	4,52	632	5,56	3,45	327
Polietileno	6,99	4,38	770	4,42	3,49	360

* Máxima produção observada no início do processo, período em que se não se observa produções de diversos ácidos e álcoois. ** Média aritmética calculada com base nos dados de produção obtida volumetricamente.

Os resultados médios de produção de H₂ (para o período de produção volumétrica mensurável, aproximadamente, 40 dias), mostrados na Tabela 6.3, vão ao encontro das rotas estabelecidas na literatura, com resultados em torno de 50% do valor teórico (8 mol H₂ / mol de sacarose), rendimento este referente à rota do formiato, que inicialmente não é afetada pela formação de subprodutos do processo, a não ser que haja reabsorção do H₂ no sistema. Apesar da faixa dos 50% de rendimento na produção de H₂ não ser alta, alguns autores não conseguiram atingir esta porcentagem, mesmo em processos contínuos, tais como Wu *et al* (2003) (rendimento máximo de 2,67 mol H₂ por mol sacarose); Chen e Lin (2003) (produção entre 1,42 e 4,52 mol H₂ por mol sacarose) e Lee et al. (2007) (valor máximo de 1,51 mol H₂ por mol sacarose). A diferença entre os rendimentos obtidos se deve a vários fatores: inóculo, material suporte, pH de operação e até mesmo a otimização do reator adotado no processo.

A produção volumétrica teórica máxima de hidrogênio esperada para cada TDH seria de, aproximadamente, 509 mL.h⁻¹ para TDH de 2 h e de 2036 mL.h⁻¹ para TDH de 0,5 h. Dessa forma, o processo operado com TDH de 2 h foi mais eficiente com conversões volumétricas relativas à teórica de 55% para argila; 64% para o carvão e 70% para o polietileno, sendo que para o TDH de 0,5 h a produção volumétrica foi de 29%, 31% e 38% para a argila, carvão e polietileno, respectivamente. Esses resultados mostram que a carga aplicada pode reduzir a conversão do substrato durante o processo (TDH de 0,5 h = 96 Kg.m⁻³.d⁻¹; TDH de 2 h = 24 Kg.m⁻³.d⁻¹).

Portanto, a redução do TDH aumentou o rendimento de produção de hidrogênio, porém, houve redução no volume produzido e diminuição da conversão do carboidrato em relação ao teórico esperado. Assim, a associação de vários reatores em série operando com

baixos TDHs poderia ser uma boa alternativa de processo.

Os resultados de produção volumétrica de hidrogênio por unidade de tempo por volume de reator e normalizados para DQO de 1000 mg.l^{-1} obtidos por Chang et al. (2002), Wu et al. (2003) e Lee et al. (2003), para reatores contínuos, foram de $65 \text{ mL}(\text{h.l})^{-1}$, $46 \text{ mL}(\text{h.l})^{-1}$ e $100 \text{ mL}(\text{h.l})^{-1}$, respectivamente,. Esses resultados foram inferiores aos obtidos nesta pesquisa para ambos THDs: 146, 158 e $192 \text{ mL}(\text{h.l})^{-1}$ para argila, carvão e polietileno, respectivamente, para TDH de 0,5 h e 280, 327 e $360 \text{ mL}(\text{h.l})^{-1}$ para argila, carvão e polietileno, respectivamente, para TDH de 2 h.

6.1.1.4 Perfil de conversão de sacarose e produção de ácidos e álcoois - TDH de 0,5 h

Ao final de 47 dias de operação, realizaram-se perfis espaciais a fim de avaliar as conversões de sacarose, pH ao longo do sistema e avaliar possíveis melhorias no processo (Figura 6.8).

A máxima conversão de sacarose atingida nos reatores foi de: 46,7% para a argila, 82,3% para o carvão e 71,5% para o polietileno, resultados inferiores aos obtidos para o TDH de 2 h, conforme discutido anteriormente.

Figura 6.9: (a) Eficiência de conversão da sacarose; (b) pH ao longo do reator para TDH de 0,5 h: (■) Argila, (○) Carvão e (●) Polietileno.

A redução do TDH foi efetiva para que as reações de consumo de sacarose ocorressem ao longo do reator, estendendo a degradação até o quinto ponto de amostragem, resultado que levou a menor conversão a etanol.

Nesta fase experimental, a faixa de pH atingido no final do processo foi de $4,35 \pm 0,21$.

A redução do TDH promoveu o aumento do pH da ordem 0,2 a 0,4 unidades na escala, relativo aos dados do TDH de 2h. Mesmo assim, houve a ocorrência de reações desfavoráveis à produção de hidrogênio.

Com base nas constatações da primeira fase, outras ações ainda devem ser tomadas para atingir a estabilidade do processo.

6.1.1.5 Análise Microbiana comparativa para os diferentes TDHs aplicados

Durante a operação dos reatores foram coletadas amostras de biomassa a fim de avaliar a presença de microrganismos envolvidos na produção de hidrogênio. As técnicas usadas para essas finalidades foram a microscopia ótica e a análise de Gram, etapas preliminares à análise de biologia molecular. Outros autores usaram esta estratégia com resultados confirmativos da presença de *Clostridium* sp (FANG; LIU, 2002) (Figura 6.10 e 6.11).

Figura 6.10: Microscopia ótica dos microrganismos presentes nos reatores: (a) bacilos e leveduras - ponto de amostragem 6 - Carvão (TDH de 2 h); (b) endósporos e bacilos - ponto de amostragem 2 - Polietileno (TDH de 2 h); (c) bacilos - Polietileno (TDH de 0,5 h) e (d) bacilos e leveduras - Argila, (b) bacilos e leveduras - Carvão (TDH de 0,5 h).

Na análise de microscopia ótica de contraste de fase, foram observadas morfologias similares a endosporos (Figura 6.10b), bacilos (Figura 6.10c) e fungos (leveduras) (Figura 6.10a, Figura 6.10d). Outros autores também observaram morfologias similares a bacilos e endosporos em culturas produtoras de hidrogênio (CHEN et al, 2005; LIU; FANG, 2002;

FANG; LIU, 2002). As morfologias observadas apresentam similaridade com microrganismos dos gêneros *Enterobacter* (FABIANO; PEREGO, 2002), *Bacillus* (KALIA et al., 1994; HOLT, 1986) e *Clostridium* (HOLT, 1986), microrganismos associados com conversão de carboidratos a ácidos e hidrogênio.

Os fungos (leveduras) observados podem apresentar hidrogenossomo ao invés da mitocôndria, organela cuja uma das funções é de produzir ATP e hidrogênio (BOXMA, et al., 2005). Estas organelas são encontradas em inúmeros eucariontes unicelulares adaptados a ambientes microaeróbios ou anóxicos (YARLETT; HACKSTEIN, 2005), como observado neste estudo.

A análise de Gram mostrou a presença de microrganismos Gram positivos e negativos em todas as condições operacionais. Coloração Gram positivo está associada a alguns gêneros de microrganismos *Clostridium* e *Bacillus* (HOLT, 1986; UENO et al., 1995) (Figura 6.11).

Por meio da análise de biologia molecular, DGGE para *primer* de Domínio Eubactéria, observou-se baixa diversidade de bactérias e similaridade nas bandas marcantes entre os materiais suportes e os diferentes TDHs (Figura 6.12).

A baixa diversidade das bandas pode ser explicada pela especificidade do processo e pela forma de inoculação adotada, altamente seletiva. Esse resultado é coerente, pois todos os reatores sofreram mesmo processo de inoculação e foram alimentados com mesmo meio, indicando que o TDH não interferiu na população presente.

Oito bandas obtidas no DGGE foram extraídas, re-amplificadas e seqüenciadas (400 pb) (Tabela 6.4).

As Banda 1 e 2 apresentam similaridade com *Klebsiella* sp., espécie envolvida com a produção de hidrogênio através de carboidratos (HUNG et al., 2007). No entanto, dados de FISH, realizados por Hung et al. (2007) indicam que *Klebsiella* sp. não está diretamente relacionado com a produção de hidrogênio, mas com rotas de consumo de O₂ criando condições favoráveis para a produção anaeróbia de hidrogênio via *Clostridium* sp.. A observação deste microrganismo é plausível, visto que os reatores não apresentavam mecanismos específicos para manter a anaerobiose e a microaeração poderia ocorrer durante o bombeamento do meio.

Figura 6.11: Microscopia óptica de luz comum no final da operação dos reatores (TDH de 0,5 h e 2 h): (a) bacilos Gram negativos no ponto 0 do reator com Carvão (TDH 2 h), (b) bacilos Gram negativos e positivo no ponto 5 do reator com Polietileno (TDH 2 h), e (c) bacilos Gram negativos e positivo do reator com Argila (TDH 0,5 h) (Escala 5μm).

Figura 6.12: Visualização das bandas no gel de DGGE para “*primer*” de Domínio Bactéria, gradiente 30%-70%. Para os TDHs de 2 e 0,5 h a materiais suportes: (A 0,5) Argila a TDH de 0,5 h, (C 0,5) Carvão a TDH de 0,5 h, (P 0,5) Polietileno a TDH de 0,5 h, (A 2) Argila a TDH de 2 h, (C 2) Carvão a TDH de 2 h, (P 2) Polietileno a TDH de 2 h.

As Bandas 3, 4, 5, 6, 7 e 8 mostraram similaridade com *Clostridium* sp.. Hung et al. (2007) descreveram que este microrganismo apresenta-se dominante em processos aplicados à produção de hidrogênio sob condições de elevadas vazões, e a predominância pode atingir de 21% para TDH de 4 h e aumentar para 38% para TDH de 0,5 h.

Tabela 6.4: Informação das seqüências obtidas das bandas recortadas no DGGE com *primers* para o Domínio Bacteria de amostras provenientes dos reatores.

Bandas	Microrganismos	Número de acesso	Similaridade (%)	Referência
Bandas 1; 2	<i>Klebsiella</i> sp.	EF522816	97	SUN et al. (2007)
Bandas 3; 4; 5; 6; 7; 8	<i>Clostridium</i> sp.	AY188845	95	TAMBURINI et al. (2003)

6.1.2 Segunda Fase - Diferentes Porosidades de Leito

6.1.2.1 Operação dos reatores na segunda fase

A estratégia adotada de redução do TDH foi interessante e promoveu o aumento da produção de hidrogênio. Entretanto, o alto crescimento microbiano e o pH atingido ao final do processo mostraram ser parâmetros pouco controlados e altamente correlato com a produção de hidrogênio e dos sub-processo. Assim, nas duas condições testadas não foi possível manter a produção de hidrogênio por período muito longo. Com base nessas constatações e baseado no trabalho de Lee et al. (2003), nesta fase foram testadas diferentes porosidades de leito, a fim de reduzir e controlar o crescimento celular, por meio de arraste microbiano. A hipótese testada baseia-se no aumento da porosidade, permitindo maior arraste de biomassa do sistema e maior controle do crescimento microbiano.

Três reatores foram operados com diferentes porosidades (50%-mesma porosidade da etapa anterior, 75% e 91%) para o leito de polietileno e TDH de 0,5 h. A escolha do polietileno é explicada pela sustentabilidade do processamento do material reciclado e por não apresentar fragmentação ao longo do processo.

A inoculação da biomassa seguiu mesmo procedimento descrito na primeira etapa.

A instabilidade na conversão de sacarose, para as diferentes porosidades do leito, foi mantida nesta fase (Figura 6.13.a). Entretanto, os valores de pH atingidos nos efluentes foram maiores com o aumento da porosidade (Figura 6.13.c), com média de 4,8 para 50% de porosidade; 5,2 para 75% de porosidade e 5,3 para 91% de porosidade.

(a)

(b)

Figura 6.13: (a) Porcentagem de remoção de sacarose para os sistemas operados na segunda fase e (b) pH no efluente dos reatores: (▲) porosidade de 50%; (■) porosidade de 75% e (●) porosidade de 91%

Resultados positivos foram observados para a produção de hidrogênio. O sistema operando com 91% de porosidade promoveu maior estabilidade de produção de hidrogênio (Figura 6.14.c). Os elevados valores de produção podem estar associados com menores reduções da porosidade do leito ao longo da operação (Tabela 6.5). Dessa forma, o emprego de sistemas porosos favorece menor retenção de biomassa nos interstícios, favorecendo o arraste periódico da biomassa excedente (Figura 6.14.d) e desfavorecendo rotas indesejáveis, como a de formação de álcoois (Figura 6.15). De qualquer forma, a produção não foi constante e contínua conforme desejado, mas cíclica, provavelmente por ser cíclica a lavagem de biomassa do sistema como apresentado na Figura 6.14.d.

As porosidades mais baixas apresentaram comportamentos similares, com produção

de hidrogênio por um curto período de tempo (para porosidade de 50% em 30 dias e para porosidade de 75% em 23 dias). Esse resultado deve ser atribuído à falta de equilíbrio entre o processo de geração e remoção de biofilme.

Tabela 6.5: Redução do volume útil do leito no final do processo para a segunda fase.

Leitos com Porosidades	Redução do volume do leito (%)
50%	40,7
75%	35,2
91%	4,2

Todos os sistemas apresentaram rendimentos médios, mols de hidrogênio por mols de sacarose, em torno de 50% do valor teórico (Tabela 6.6) (durante o período em que se mediu a produção volumétrica), sendo que o sistema com 91% de porosidade foi capaz de produzir por longo prazo (Figura 6.14), com 4 picos de produção em 65 dias e indícios de que a produção cíclica não cessaria. Valores de rendimento real em torno de 50% são extremamente positivos e superiores aos obtidos por outros autores apresentados na revisão bibliográfica (2.2.4 Configurações de reatores) e na fase anterior.

Tabela 6.6: Rendimento de produção de hidrogênio para diferentes porosidades de leito.

Porosidades	mol H ₂ /mol sacarose
	Média*
50%	4,38
75%	3,76
91%	4,20

* Média aritmética calculada com base nos dados de produção obtida volumetricamente.

(a)

(b)

(c)

(d)

Figura 6.14: Produção de hidrogênio para os sistemas (segunda fase) (a) (▲) porosidade de 50%; (b) (■) porosidade de 75% e (c) (●) porosidade de 91%; (d) arraste de biomassa ao longo do processo (▲) porosidade de 50%; (■) porosidade de 75% e (●) porosidade de 91%.

Figura 6.15: Produção de etanol para os sistemas: (▲) porosidade de 50%; (■) porosidade de 75% e (●) porosidade de 91%

Os principais ácidos encontrados foram o ácido acético e o butírico (Figura 6.16). As concentrações máximas e mínimas dos ácidos acético e butírico observadas foram de: 0-101 e 0-166 mg.L⁻¹; 31-83 e 30-155 mg.L⁻¹; 6-71 e 8-88 mg.L⁻¹, para 50%, 75% e 91% de porosidade, respectivamente

As rotas de degradação são de extrema importância para a análise dos resultados. A comparação entre os períodos de produção de biogás e de ácidos e álcoois deve ser feita criteriosamente, pois é notório que os períodos de redução da produção de hidrogênio coincidem com os períodos de aumento de concentrações de ácido acético e butírico, além de capróico e láctico, quando presentes.

Alguns autores apontam que microrganismos, tais como *Clostridium*, podem gerar ou consumir hidrogênio. Por exemplo, o ácido láctico pode ser gerado por *Clostridium* ou por outras bactérias presentes em culturas mistas em condições de baixa concentração de hidrogênio, ou mesmo o próprio H₂ e CO₂ podem ser convertidos a acetato (Reação 11) (HAWKES et al., 2007).

Dessa forma, o aumento da produção de acetato não significa necessariamente aumento no rendimento de geração de hidrogênio (KIM et al., 2006).

(a)

(b)

(c)

Figura 6.16: Formação de ácidos para os reatores com diferentes porosidades (a) 50%; (b) 75% e (c) 91% durante o período operacional (■) ácido acético, (○) Ácido Capróico e (●) Ácido Butírico e (▲) Ácido Fórmico (△) Ácido Lático.

6.1.2.2 Perfil de conversão de sacarose e produção de ácidos e álcoois da segunda fase

Os perfis de concentração de substrato e pH mostram que o sistema com porosidade de 50% apresentou máxima conversão no início do processo (aproximadamente 30%), com queda brusca de pH para faixa de 4,5 (Figura 6.17).

Figura 6.17: (a) Eficiência de conversão de sacarose; (b) pH ao longo do reator para TDH de 0,5 h: espacial (▲) porosidade de 50%; (■) porosidade de 75% e (●) porosidade de 91%

Os sistemas com porosidades de 75% e 91% promoveram o consumo de sacarose ao longo do processo e, conseqüentemente, menor queda de pH foi observada, permanecendo em torno de 5,0. Cabe ressaltar que os perfis para 75% e 91% de porosidade foram realizados em conduções em que havia produção de hidrogênio. Para porosidade de 50% o perfil foi realizado quando não havia mais produção de hidrogênio.

6.1.2.3 Análise Microbiana da segunda fase

Todos os sistemas apresentaram morfologias similares a bactérias e fungos (leveduras) (Figura 6.18), como observado na etapa anterior.

Esse resultado é coerente, pois o mesmo processo de inoculação dos reatores foi empregado.

As bandas extraídas do DGGE, re-amplificadas e seqüenciadas caracterizaram três microrganismos (Tabela 6.19).

Figura 6.18: Microscopia ótica da biomassa presente nos reatores com diferentes porosidades: (a) 50%; (b) 75% e (c) 91%.

Os resultados gerados pela análise de PCR/DGGE confirmam a similaridade entre as populações presentes nos sistemas com diferentes porosidades (Figura 6.19).

Figura 6.19: Visualização das bandas no gel de DGGE para “*primer*” de Domínio Bactéria, gradiente 30%-70% para os reatores operados com diferentes porosidades: 50%, 75% e 91%, na segunda fase. (As bandas sequenciadas estão enumeradas de 1 a 3)

Tabela 6.7: Informação das seqüências obtidas das bandas recortadas no DGGE com *primers* para o Domínio Bacteria de amostras provenientes dos reatores, para a segunda fase.

Banda	Microrganismo	GenBank (Número)	Similaridade (%)	Referencia
Banda 1	<i>Clostridium</i> sp.	AY188845	95	TAMBURINI et al. (2003)
Banda 2	<i>Klebsiella</i> sp.	EF522816	97	SUN et al. (2007).
Banda 3	<i>Enterobacter</i> sp.	EF621358	97	CHEN et al. (2007).

A Banda 1 apresenta similaridade com *Clostridium* sp., microrganismo dominante em processos aplicados à produção de hidrogênio sob condições de baixos TDHs (HUNG et al., 2007)

A Banda 2 está relacionada com a espécie *Enterobacter* sp.. Yokoi et al. (2001) apontam que esta espécie está associada com a produção de hidrogênio a partir de carboidratos como fonte de carbono, tendo como principais rotas metabólicas: a decomposição do formiato e a rota de utilização do NADH, ambas envolvendo a geração de hidrogênio por meio da enzima hidrogenase pelo processo de reoxidação do NADH que é produzido via glicólise.

A última banda seqüenciada, Banda 3, apresenta similaridade com a espécie *Klebsiella* sp., microrganismo observado na primeira etapa.

Constata-se ainda que a produção de hidrogênio via fermentação já foi amplamente investigada para os gêneros *Enterobacter* e *Clostridium* (KIM et al., *in press*)

A Figura 6.19 mostra a árvore filogenética de consenso com *primers* para o Domínio Bacteria proveniente da informação de seqüências obtidas do biofilme dos reatores. Na construção da árvore, foram acrescentadas seqüências conhecidas de *Salmonella enterica* (NC006905) e de *Clostridium perfringens* (BA000016), que ajudam somente a indicar a posição filogenética das bandas recortadas e seqüenciadas.

A presença de fungo (leveduras) passou a ser uma constante nos reatores, em todas as etapas operacionais. Em virtude disso, algumas amostras dos reatores foram coletadas para caracterização desses organismos (amostras dos reatores com 75% e 91% de porosidade).

Os resultados obtidos a partir do DGGE revelam uma baixa diversidade de fungos (leveduras) em ambas as amostras. Três bandas que indicam populações dominantes na comunidade foram selecionadas (1A, 2A e 2B) (Figura 6.20).

Figure 6.19: Árvore filogenética de consenso baseado nas seqüências das bandas recortadas do DGGE com *primers* para o Domínio *Bacteria*, das amostras provenientes do biofilme nos reatores contendo diferentes porosidades: 50%, 75% e 91%. Os valores presentes nos nós das árvores indicam porcentagens que o ramo se repitiu (500 reamostragens de *bootstraps*)

Confirmada a presença de bandas únicas, foi realizada a clonagem e seqüenciamento dos produtos de PCR previamente utilizados para avaliação da diversidade em géis de DGGE. Os resultados da clonagem estão apresentados na Tabela 6.8.

Os resultados derivados das análises moleculares (Tabela 6.8) e filogenéticas (Figura 6.21) indicaram a presença de 3 gêneros distintos de leveduras nas amostras analisadas. O gênero *Candida* sp. foi encontrado em ambas amostras. *Galactomyces* sp. e *Kluyveromyces* sp. foram encontrados apenas na amostra de biomassa retirada do reator operado com 91% de porosidade. A relação dos clones com os organismos citados foi confirmada na árvore filogenética (Figura 6.21).

Figura 6.20: DGGE de seqüências de rDNA 18S de amostras de linhagens referência e amostras de biomassa 1 (75% de porosidade) e 2 (91% de porosidade).

Apesar de pouco se saber sobre a ação das leveduras na produção de hidrogênio, elas estão presentes nos sistemas e de alguma forma contribuem com o metabolismo, seja na produção ou formação de ácidos, NADH, álcoois ou mesmo glicerol, como proposto por alguns autores.

Arnold et al. (2000) observaram a produção de ácidos de cadeia curta (ácido butírico e valérico) por *Cândida* sp. e *Galactomyces* sp. a partir de efluentes de silagem em faixas de pH de 3,5 a 4,5, faixas estas atingidas nos reatores operados neste trabalho. Outra constatação interessante é que esses organismos podem remover fósforo com eficiência de 25% a 50%.

Tabela 6.8: Dados dos clones e espécies de fungos (leveduras) proximamente relacionadas no BLAST.

Clones	Banda gel DGGE	Biomassa (reator)	Espécies proximamente relacionadas (BLAST)	Similaridade (%)
Clone 1A 1	1 ^a	polietileno 75% (1)	<i>Candida tropicalis</i>	99
Clone 1A 2			<i>Candida sojae</i>	99
Clone 1A 3			<i>Candida parapsilosis</i>	99
Clone 2A 1	2 ^a	polietileno 91% (2)	<i>Galactomyces citri-aurantii</i>	99
Clone 2A 2			<i>Galactomyces reessii</i>	99
Clone 2A 4				
Clone 2B 2	2B	polietileno 91% (2)	<i>Candida tropicalis</i>	99
			<i>Candida sojae</i>	99
			<i>Candida parapsilosis</i>	99
Clone 2B 3	2B	polietileno 91% (2)	<i>Candida parapsilosis</i>	98
			<i>Candida orthopsilosis</i>	98
			<i>Candida tropicales</i>	98
Clone 2B 4	2B	polietileno 91% (2)	<i>Kluyveromyces lactis</i>	99
			<i>Kluyveromyces wickerhamii</i>	99
			<i>Kluyveromyces aestuarii</i>	98

Hackstein (2004) reporta que *Kluyveromyces* apresenta genes de hidrogenase, sugerindo que este organismo poderia estar competindo pela produção de hidrogênio com as bactérias.

Galactomyces é reportado por metabolizar o ácido láctico em pH de 5,07 a 5,43, um dos subprodutos do processo fermentativo, e na degradação de soro de queijo pode gerar: ácido acético, butírico, propiônico e formiato (WYDER et al., 1999). Dessa forma esta espécie poderia contribuir para a geração de ácidos nos sistemas aqui estudados.

Nielsen e Arneborg (2007) descrevem que fungos podem gerar etanol sob condições fermentativas, um dos subprodutos desta pesquisa.

Candida tropicales pode crescer em meios que contenham ácidos graxos ou

açúcares (glicose / sacarose) como única fonte de carbono (CHENG et al., 2005). Essa espécie é um agente candidêmico mais freqüente no Brasil (20–24%) presente em adultos e crianças (NUCCIA; COLOMBO, 2007), mostrando coerência na freqüência desta espécie em ambos os reatores, uma vez que o inóculo foi gerado de água de abastecimento não esterilizadas. Não foram encontrados artigos que possam relacionar os microrganismos *Candida sojae*, *Candida parapsilosis*, *Candida parapsilosis* e *Candida orthopsilosis* com sistemas fermentativos.

Figura 6.21: Análise filogenética de seqüências de rDNA 18S obtidas das amostras de leveduras (Kimura 2p e *neighbor-joining*, software MEGA 3.0). Valores de *bootstrap* ≥ 65 observados na árvore.

Outros autores citam que a produção de formiato intracelular na *C. tropicales* tem como objetivo aumentar a concentração de NADH (Reação 12 – Metabolismo do Formiato, via formiato desidrogenase - FDH) que, sob condições aeróbias, levam à formação de álcool a partir de açúcares (GRANSTRÖM et al., 2002). Entretanto, não há referência a

esse processo em condições anaeróbias. Cabe ressaltar que esta espécie apresenta enzimas desidrogenase, o que leva a crer que o contrário deva existir.

Boxma et al. (2005) observaram, em algumas *Candida* sp., a presença de gene hidrogenissomal, mas não se pode afirmar se essa espécie estaria produzindo hidrogênio.

6.2 Segunda Etapa – Diferentes Inóculos

6.2.1 Operação dos Reatores em Batelada da segunda etapa

Quatro inóculos provenientes de reatores anaeróbios foram incubados em reatores em batelada: três provenientes de reatores fermentativos de leito fixo projetados para produzir hidrogênio, com leito de argila expandida (A), carvão vegetal (B) e polietileno (C) e um proveniente de reator anaeróbio de manta de lodo, tratado termicamente (D).

Essa etapa teve como finalidade comparar o sistema de inoculação estabelecido nesta pesquisa (fermentação natural) com um sistema largamente empregado (pré-tratamento térmico) e comparar o efeito de concentrações de biomassas fermentativas na produção de hidrogênio.

Todos os inóculos foram extraídos de reatores, a fim de normalizar a comparação.

Os resultados apresentados (Figura 6.22) mostram que os inóculos apresentaram diferentes atividades de produção de hidrogênio. Os inóculos B e C apresentaram fase de adaptação (fase lag) rápida de quatro horas; o inóculo A apresentou fase lag de 14 horas e o inóculo D apresentou fase lag de 19 horas. A longa fase de adaptação, para o reator com inóculo D, pode ser devido ao baixo pH submetido, condição não adotada para sistemas metanogênicos.

O inóculo A apresentou longa fase lag, provavelmente devido à baixa concentração de biomassa inoculada no sistema e à alta relação F/M (substrato/microrganismo) igual a 1,08, comparado aos outros reatores, nos quais a relação F/M foi de aproximadamente 0,16, o que pode ter gerado um efeito inibitório no processo. Sendo assim, menores relações F/M poderiam ser mais vantajosas para gerar hidrogênio, e com melhor rendimento. Lay et al. (1999) observaram que a atividade específica de hidrogênio é mais eficiente para razões F/M inferiores a 0,4.

As massas de microrganismos presentes nos reatores A, B, C e D foram medidas no final do processo na forma de sólidos suspensos voláteis (SSV). A Tabela 6.9 apresenta

dados de SSV e atividades máximas específicas de produção de hidrogênio. Não foi detectada a presença de metano durante o tempo experimental.

Tabela 6.9: Massa microbiana e atividade específica de produção de hidrogênio dos reatores em batelada com diferentes inóculos.

Reator	Biomassa Inoculada (g SSV)	Atividades Específicas $\mu\text{mol H}_2 \cdot (\text{g de SSV} \cdot \text{h})^{-1}$
A (“Argila Expandida”)	0,23	155
B (“Carvão Vegetal”)	1,57	125
C (“Polietileno”)	1,50	98
D (“Tratamento térmico”)	1,47	66

O inóculo D apresentou menor atividade específica (Tabela 6.9) e rendimento de conversão de hidrogênio (Tabela 6.11), quando comparado com os inóculos fermentativos (B e C), que foram incubados com mesma concentração de biomassa.

Figura 6.22: Produção de hidrogênio específica para os diferentes inóculos: A - (■), B - (○), C- (△) e D - (▽)

Observaram-se altas conversões da sacarose (Figura 6.23) a ácido acético para todos os sistemas (Figura 6.23 e Tabela 6.10) e o principal álcool observado foi o etanol (Figura 6.24 e Tabela 6.10).

O reator A apresentou maior atividade específica, resultante da divisão da produção de hidrogênio pela biomassa (6,5 vezes menor que a usada nos outros sistemas).

A Tabela 6.11 mostra um comparativo do experimento realizado com os dados obtidos por Kawagoshi et al. (2005). Os resultados mostram que os diferentes processos de inativação de microrganismos metanogênicos apresentam diferentes rendimentos em função do inóculo empregado. Fica claro que a escolha do inóculo pode ser fundamental, assim como a escolha de um método coerente para inativação das populações prejudiciais ao processo de produção do hidrogênio. Outras pesquisas comprovam que a eficiência de produção é dependente do método de pré-tratamento adotado (MOHAN; SARMA, 2008).

Figura 6.23: Concentração de Sacarose no final do experimento para os reatores operados com diferentes inóculos (A- argila, B – Carvão, C – Polietileno, D – Tratado termicamente).

Figura 6.24: Produção de ácidos para os reatores operados com diferentes inóculos (A- argila, B – Carvão, C – Polietileno, D – Tratado termicamente).

Figura 6.25: Produção de álcoois para os reatores operados com diferentes inóculos (A- argila, B – Carvão, C – Polietileno, D – Tratado termicamente).

Tabela 6.10: Subprodutos da conversão da sacarose para os diferentes inóculos (A- argila, B – Carvão, C – Polietileno, D – Tratado termicamente).

	Subprodutos (mg.l ⁻¹)			
	Inóculo A	Inóculo B	Inóculo C	Inóculo D
Ac. Acético	80,66	178,11	251,74	251,76
Ac. Propiônico	-	10,39	8,19	0,973
Ac. Isobutírico	0,899	0,491	14,63	0,63
Ac. Butírico	11,05	46,16	165,8	0,92
Ac. Capróico	-	14,28	13,18	-
Etanol	158,46	215,82	164,27	202,15
Butanol	1,37	1,87	8,28	0

Tabela 6.11: Comparativo entre os dados rendimento de produção de hidrogênio e mol de hidrogênio por mol de substrato da segunda etapa (diferentes inóculos) e da literatura.

Inóculo	Substrato (S)	mol H ₂ / mol S	Rendimento %	Referência
A – Lodo Argila (ferm. natural)	Sacarose	0,55	6,82	Este trabalho
B – Lodo Carvão (ferm. natural)	Sacarose	2,54	31,72	
C – Lodo Polietileno (ferm. natural)	Sacarose	2,18	27,30	
D – Lodo Avícola (trat. térmico)	Sacarose	0,22	9,02	
Lodo ativado (trat. térmico)	Glicose	0,05	1,25	Kawagoshi et al. (2005)
Lodo ativado (choque de pH)	Glicose	0,70	17,50	
Lodo de Digestor (trat. térmico)	Glicose	1,38	34,50	
Lodo de Digestor (choque de pH)	Glicose	0,80	20,00	

Os resultados de Kawagoshi et al. (2005) mostram que lodos anaeróbios tratados termicamente são mais eficientes para produção de hidrogênio que lodos facultativos e mesmo que lodo anaeróbio submetido a choque de pH.

Os resultados obtidos nesse trabalho sugerem que o processo de fermentação natural é mais efetivo que o tratamento térmico de lodo anaeróbio, além de ser economicamente viável em sistemas em escala plena.

6.2.2 Análise Microbiana de segunda etapa

Os resultados de microscopia ótica de contraste de fase realizadas na biomassa ao final do experimento mostraram presença de bacilos e endósporos (Figura 6.26).

Figura 6.26: Biomassa presente nos reatores com inóculos provenientes de (a) Argila e (b); Avícola.

No lodo tratado termicamente, observou-se a presença de morfologias similares a *Metanosarsina* sp. (Figura 6.26d). Entretanto, sem observação de geração de metano.

6.3 Terceira Etapa - Produção de Hidrogênio/ Diferentes águas residuárias

6.3.1 Operação dos Reatores em Batelada na terceira etapa

A terceira etapa teve como objetivo avaliar a produção de hidrogênio a partir de diferentes águas residuária, usando para isso inóculo proveniente da fermentação natural da segunda fase da primeira etapa (250 mg de SSV. l^{-1}).

A escolha da água residuária levou em consideração o cenário brasileiro com expansão para uso de combustíveis renováveis, tais como: biodiesel e etanol, e a necessidade de dar uma destinação nobre aos resíduos dos mais diversos processos. Dessa forma, a escolha das águas residuárias foi estratégica: glicerol ou glicerina, principal resíduo do processamento do biodiesel; vinhaça, o principal resíduo da produção do etanol; e esgoto sanitário, que, apesar de ser uma água residuária de baixa carga orgânica, é gerado

em grandes e pequenas comunidades continuamente. Como controle, foi utilizada a sacarose como substrato em um dos reatores.

Os resultados obtidos mostraram que todas as águas residuárias estudadas apresentaram conversão de matéria orgânica em hidrogênio (Figura 6.27); degradaram os carboidratos presentes (Figura 6.28) e a concentração de matéria orgânica, medida como DQO, se manteve constante com reduções máximas de 13% dos valores iniciais (Figura 6.29). Outros autores também observaram baixas remoções de matéria orgânica em sistemas destinados à produção de hidrogênio (VAN GINKEL; LOGAN, 2005).

Figura 6.27: Produção de hidrogênio no headspace dos reatores em batelada contendo diferentes águas residuárias:(▲) vinhaça;(◆) sacarose;(●) esgoto sanitário e (■) glicerina

Todos sistemas apresentaram período de adaptação (fase lag) para a produção de hidrogênio, com fase lag de cinco horas para sacarose, esgoto sanitário e vinhaça, e sete horas para a glicerina (Figura 6.30).

As maiores produções de hidrogênio e velocidades específicas foram atingidas pelo reator contendo vinhaça (Figura 6.31 e Tabela 6.12). Os baixos rendimentos do reator controle contendo sacarose podem estar relacionados com a formação de etanol associada ao rápido consumo de carboidrato (Figura 6.32). Logan et al. (2002) observaram diferentes tempos de adaptação para diferentes substratos em reatores operados em batelada (glicose, sacarose, melaço, lactato, celulose e extrato de batata) e as máximas produções foram obtidas para o melaço e glicose, seguido da sacarose (sistemas com concentração inicial de 1g.l⁻¹ de DQO).

Figura 6.28: Conversão de Carboidrato nos reatores em batelada contendo diferentes águas residuárias:(▲) vinhaça;(◆) sacarose;(●) esgoto sanitário e (■) glicerina

Figura 6.29: Concentração de matéria orgânica (como DQO) nos reatores em batelada contendo diferentes águas residuárias:(▲) vinhaça;(◆) sacarose;(●) esgoto sanitário e (■) glicerina

Tabela 6.12: Máxima atividade específica de produção de hidrogênio e concentração de biomassa ao final da batelada operada com diferentes águas residuárias.

Água Residuária	Biomassa (mg SSV.l ⁻¹)	Máxima atividade específica mmol H ₂ .(g de SSV.h) ⁻¹
Sacarose	282,5	2,43
Esgoto Sanitário	305,0	1,05
Vinhaça	287,5	3,08
Glicerina	255,0	0,80

Figura 6.30: Produção de hidrogênio por grama de SSV dos reatores em batelada contendo diferentes águas residuárias:(▲) vinhaça;(◆) sacarose;(●) esgoto sanitário e (■) glicerina

Esperava-se uma baixa, ou mesmo nula, degradação do glicerol, devido à ausência de carboidratos no meio. Entretanto, alguns dados da literatura levam a supor que o inóculo empregado já havia sido submetido ao glicerol, uma vez que alguns fungos em condições de estresse osmótico podem metabolizar e acumular glicerol, principalmente para faixa de pH de 4,0 a 4,5 (NIELSEN; ARNEBORG, 2007).

Os reatores geraram diversos ácidos e álcoois e em concentrações distintas, o que caracteriza a ocorrência de diferentes rotas metabólicas (Figura 6.32 e Tabela 6.13).

A Tabela 6.14 mostra um comparativo de produção de hidrogênio obtido em diversas pesquisas para diferentes águas residuárias. Os resultados mostraram que o inóculo fermentado e a baixa concentração de matéria orgânica aplicada foram fundamentais para os bons resultados do processo.

Figura 6.31: Porcentagem de ácidos ao final do processo operado com diferentes águas residuárias.

Tabela 6.13: Concentração de ácidos no início e no final do processo operado com diferentes águas residuárias.

Ácidos	Sacarose		Esgoto Sanitário		Vinhaça		Glicerol	
	Tempo (h)							
	0	25	0	25	0	25	0	25
	Concentração de ácidos (mg.l ⁻¹)							
	Ácido láctico	0,00	8,09	103,97	38,93	9,09	2,31	0,30
Ácido Fórmico	0,00	5,41	8,52	2,82	13,66	3,77	0,00	6,95
Ácido Acético	0,00	37,20	63,41	24,49	10,15	25,87	8,75	39,84
Ácido Propiônico	0,00	11,31	10,36	7,77	0,00	11,73	0,00	0,00
Ácido Isobutírico	0,00	9,97	11,29	52,46	8,36	27,17	8,47	12,48
Ácido Butírico	0,00	9,73	5,52	7,51	5,01	11,09	5,08	28,16
Ácido Isovalérico	0,00	7,19	9,08	2,21	6,1	7,70	0,00	12,15
Ácido Valérico	0,00	0,00	0,00	2,73	0,00	0,00	0,00	0,00
Ácido Capróico	0,00	11,10	7,68	0,00	9,42	10,36	8,87	0,00

Figura 6.32: Produção de etanol nos reatores em batelada contendo diferentes águas residuárias:(▲) vinhaça;(◆) sacarose;(●) esgoto sanitário e (■) glicerina

Tabela 6.14: Comparação entre processos de produção de hidrogênio usando diferentes águas residuárias.

Água Residuária	DQO (mg.l ⁻¹)	Procedência Inóculo	Reator	Atividade Específica de H ₂ ml de H ₂ .(g de SSV.h) ⁻¹	mlH ₂ .g ⁻¹ DQO mmolH ₂ .g ⁻¹ DQO	Referência
Esgoto Sanitário	250	Reator fermentativo	Batelada	22,25	200	Este Trabalho
Vinhaça	250		(escala bancada)	86,81	579	
Glicerina	250			31,30	200	
Sacarose	250			67,25	270	
					12,76	
Sacarose	300	Digestor anaeróbio	Batelada	3	45	CHEN et al. (2006)
Efluente simulado (alimentos)	1100		(escala bancada)	39	52	
					-	
Melaço	3000	Estação de tratamento de Esgoto Sanitário	Reator fermentativo de	-	-	REN et al. (2006)
			fluxo ascendente (escala piloto)		26,13	

Os resultados de produção volumétrica de hidrogênio variaram de 200 a 579 ml $\text{H}_2\cdot\text{g}^{-1}\text{DQO}$ (Tabela 6.14), valores superiores aos obtidos para produção de metano em reatores anaeróbios (0,29 - 315,15 ml $\text{CH}_4\cdot\text{g}^{-1}\text{DQO}$). Além de apresentar produções volumétricas mais elevados, o hidrogênio é três vezes mais energético que o metano, o que torna o processo intermediário ao processo anaeróbio completo vantajoso (DE VRIJE; CLAASSEN, 2003).

Um artigo publicado na Revista Pesquisa Fapesp (2004) cita que a compra do hidrogênio tem custo de R\$ 0,60 por metro cúbico, inviabilizando o uso para abastecimento energético. Entretanto, se houver a produção via processo biológico o custo cai para R\$ 0,00025 por metro cúbico (DE VRIJE; CLAASSEN, 2003), tornando o processo viável.

6.3.2 Análise Microbiana da terceira etapa

As populações avaliadas ao final do experimento por meio de microscopia ótica de contraste de fase (Figura 6.34) e por PCR/DGGE (Figura 6.33) não se diferiram do inóculo. A análise de Gram mostrou a presença de microrganismos Gram negativos e Gram positivos (Figura 6.34) e as morfologias observadas foram similares a bacilos, endosporos e leveduras.

Figure 6.33: Visualização das bandas no gel de DGGE para “*primer*” de Domínio *Bactéria*, gradiente 30%-70%.: I – Inóculo; S- Sacarose; ES – Esgoto Sanitário; V – Vinhaça e G - Glicerol. (Bandas seqüenciadas enumeradas de 1 a 9)

Figura 6.34: Análises microscópicas da biomassa nos reatores da terceira fase contendo diferentes águas residuárias: (a) sacarose; (c) vinhaça; (e) inóculo; Análises de Gram: (b) sacarose; (d) glicerina e (f) inóculo.

Nove bandas do gel de DGGE foram recortadas e seqüenciadas (Figura 6.33)

A Tabela 6.15 apresenta as bandas recortadas no DGGE, re-amplificadas e seqüenciadas, das amostras provenientes do DGGE para “*primer*” de Domínio Bactéria (Figura 6.43).

As Banda 1, 3 e 5 apresentam similaridade com a espécie *Klebsiella sp.*, espécie descrita anteriormente na primeira etapa.

As Bandas 5 e 8 apresentam similaridade com a espécie *Bacteroides sp.*, microrganismos associados com a produção de hidrogênio (REN et al., 2007).

Tabela 6.15: Informação das seqüências obtidas das bandas recortadas no DGGE com primers para o Domínio *Bacteria* de amostras provenientes dos reatores operados com diferentes inóculos.

Bandas	Microrganismo	# acesso	Similaridade%	Referência
Banda 1,3,7	<i>Klebsiella sp.</i>	EF522816	95	SUN; HONG(2007)
Banda 2,4,6,9	Bactéria não cultivada	AY563467	97	LEE et al. (2004)
Bandas 5,8	<i>Bacteroides sp.</i>	DQ168847	98	KIM et al. (2005)

Hawkes et al. (2007) descrevem que o aumento da velocidade de produção de hidrogênio está associado com o aumento das populações de *Ethanolobacterium sp.*, *Clostridium sp.* and *Spirochaetes*, sendo que alguns tipos de *Clostridium sp.*, *Acidovorax sp.*, *Kluyvera sp.* e *Bacteriodes* são populações dominantes. Essa constatação demonstra que a produção de hidrogênio depende também dos co-metabólitos dessas comunidades.

A Figura 6.35 mostra a árvore filogenética de consenso com *primers* para o Domínio *Bacteria* proveniente da informação de seqüências obtidas dos experimentos.

Figura 6.35: Árvore filogenética de consenso baseado nas seqüências das bandas recortadas do DGGE com *primers* para o Domínio *Bacteria*, das amostras provenientes dos reatores contendo diferentes águas residuárias. Os valores presentes nos nós das árvores indicam porcentagens que o ramo se repetiu (500 reamostragens de *bootstraps*).

7. CONCLUSÕES

A partir dos resultados experimentais é possível concluir que:

Os materiais suportes para aderência microbiana pouco influenciaram na produção de hidrogênio, sendo que esse resultado pode ser comprovado pela alta similaridade das populações de bactérias presentes nos reatores. Da mesma forma, o emprego de diferentes TDHs não provocou alterações nas comunidades microbianas.

Os TDHs empregados (0,5 e 2,0 h) e as porosidades de leito de 50 e 75% promoveram a produção de hidrogênio por curto período de tempo devido ao favorecimento de rotas de formação de ácidos e álcoois que provocam o consumo do hidrogênio e à redução do volume útil dos reatores.

A operação do sistema com TDH de 2 h mostrou ser vantajosa se a finalidade for a obtenção de ácidos e álcoois.

A porosidade do leito de 91%, para o reator operado com TDH de 0,5 h, apresentou resultados positivos, com produção cíclica, porém contínua, de hidrogênio, que pode ser explicada pela baixa redução do volume útil, maior interação entre células suspensas e aderidas, que pode ser constatada com menores reduções de pH no sistema. pH superior a 5,0 mostrou ser mais efetivo para produção de hidrogênio, desfavorecendo rotas indesejáveis.

Foi observada a presença de fungos (leveduras) em todos os reatores, porém com baixa diversidade, que podem ter contribuído para o processo global de formação e consumo de sacarose, hidrogênio e subprodutos.

As principais bactérias encontradas foram *Clostridium* sp. e *Enterobacter* sp., amplamente pesquisadas quanto à produção de hidrogênio.

A escolha de inóculos e do método de inoculação podem ser fundamentais para a eficiência do processo de produção de hidrogênio.

A inoculação de biomassa proveniente de fermentação natural foi mais eficiente para produção de hidrogênio.

Diferentes águas residuárias podem ser usadas para geração de hidrogênio e a sua efetividade está diretamente relacionada com a disponibilidade de matéria orgânica facilmente degradável e condições nutricionais. O emprego da vinhaça e esgoto sanitário para geração de hidrogênio mostrou ser viável e promissor. A utilização de glicerol pode ser viável, mas estudos mais aprofundados devem ser feitos com esse resíduo.

Foi observada baixa diversidade microbiana para os reatores contendo diferentes águas residuárias.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

A partir dos resultados experimentais é possível propor sugestões para os futuros trabalhos, tais como:

1. Avaliar a produção de hidrogênio a partir de fungo (leveduras);
2. Produzir hidrogênio a partir de diferentes águas residuárias em reatores contínuos;
3. Avaliar outras formas de inoculação de biomassa para sistemas aplicados a produção de hidrogênio;
4. Estudar diferentes concentrações a fim de avaliar os efeitos inibitórios e eficiências no processo;
5. Avaliar a influência da temperatura na produção de hidrogênio;
6. Testar sistemas com células suspensas, tanto adaptando a biomassa como promovendo a granulação da biomassa;
7. Testar diversas configurações de reatores a fim de avaliar qual seria mais adequada para produção de hidrogênio.

REFERÊNCIAS

Alzate-Gaviria LM, Sebastiana PJ, Pérez-Hernández A, Eapen D. Comparison of two anaerobic systems for hydrogen production from the organic fraction of municipal solidwaste and syntheticwastewater. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2007; 32: 3141 – 3146.

APHA, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (1998). 20th ed, American Public Health Association / American Water Works Association / Water Environment Federation, Washington DC, USA.

Arnold JL, Knapp JS, Johnson CL. The Use of Yeasts to Reduce The Polluting Potential of Silage Effluent. *Wat. Res.* 2000; 34 (15): 3699- 3708.

Arooj MF, Han SK, Kim SH, Kim DH, Shin HS. Sludge characteristics in anaerobic SBR system producing hydrogen gas. *Water research*. 2007; 41: 1177 – 1184.

Boxma B, de Graaf RM, Van der Staay GWM, Van Alen TA, Ricard G, Gabaldon T, Van Hoek AHAM, Moon-Van der Staay SY, Koopman WJH, Van Hellemond JJ, Tielens AGM, Friedrich T, Veenhuis M, Huynen MA, Hackstein JHP. An anaerobic mitochondrion that produces hydrogen. *Nature*. 2005; 434 (7029): 74-79.

Camilli M, Pedroni PM. Comparison of the performance of three different reactors for BioHydrogen production via dark anaerobic fermentations *Proceedings International Hydrogen Energy Congress and Exhibition IHEC 2005 Istanbul, Turkey, 13-15 July 2005*.

Carepo M, Baptista A, Pamplona A, Fauque G, Moura JJG, Reis MAM. Hydrogen metabolism in *Desulfovibrio desulfuricans* strain New Jersey (NCIMB 8313) – comparative study with *D. Vulgaris* and *d.gigas* specieis. *Anaerobe*. 2002; 8: 325-332.

CEPAGRI/ Unicamp - Centro de Pesquisas Meteorológicas e Climáticas Aplicadas à Agricultura. Acessado em Janeiro de 2007.

Chang FY, Lin CY. Biohydrogen production using an up-flow anaerobic sludge blanket reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2004; 29: 33 – 39.

Chang JJ, Wu JH, Wen FS, Hung KY, Chen YT, Hsiao CL, Lin CY, Huang CC. Molecular monitoring of microbes in a continuous hydrogen-producing system with different hydraulic retention time. *International Journal of Hydrogen Energy*. in press.

Chang, JS, Lee KS, Lin PJ. Biohydrogen production with fixed-bed bioreactor, *Intern. Journ. Hydrogen Energy*. 2002; 27: 1167-1174.

Chen CC, Chen HP, Wu JH, Lin CY. Fermentative hydrogen production at high sulfate concentration. *International Journal of Hydrogen Energy*. in press.

Chen CC, Lin CY, Chang JS. Kinetics of hydrogen production with continuous anaerobic, *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2001; 57:56–64

Chen CC, Lin CY. Using sucrose as a substrate in an anaerobic hydrogen-producing reactor. *Advances in Environmental Research*. 2001; 7: 695-699.

Chen CC, Lin CY. Using sucrose as a substrate in an anaerobic hydrogen-producing Reactor. *Advances in Environmental Research*. 2003; 7: 695–699.

Chen WH, Chen SY, Khanal SK., Sung S. Kinetic Study of Biological Hydrogen Production by Anaerobic Fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2006; 31(15): 2170-2178.

Cheng Q, Sanglard D, Vanhanen S, Liu HT, Bombelli P, Smith A, Slabas AR. Candida yeast long chain fatty alcohol oxidase is a c-type aemoprotein and plays an important role in long chain fatty acid metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2005; 1735:192 – 203.

Cheong DY, Hansen DL, Stevens DK. Production of Bio-Hydrogen by Mesophilic Anaerobic Fermentation in an Acid-Phase Sequencing Batch Reactor. *Biotechnology and Bioengineering*. 2007; 96 (3): 2007.

Cienciaapt. Carro movido a pilha de hidrogénio em 2010. Tema: Tecnologia Inovação Veículos - 27/05/2004, Disponível em: www.cienciaapt.net: .Adquirido em 04 de outubro

de 2004.

Climatecentro, Disponível em: www.climatecentre.org. Acessado em: Janeiro de 2008.

Das D, Veziroglu TN. Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2001; 26: 13-28.

De Vrije T, Claassen PAM. Bio-methane & Bio-hydrogen. Status and perspectives of biological methane and hydrogen production Edited by: J.H. Reith, R.H. Wijffels and H. Barten 2003 Dutch Biological Hydrogen Foundation. Layout & cover design by Ton Wienbelt, The Hague. Printed by Smiet offset, The Hague. Advice & project support by .DOC, The Hague. 2003; 103-121.

Del Nery, V. Utilização de lodo anaeróbio imobilizado em gel no estudo de partida de reatores de fluxo ascendente com manta de lodo. [dissertação] São Carlos, Escola de Engenharia de São Carlos, USP; 1987.

Doyle EM. *Clostridium perfringens* Growth during Cooling of Thermal Processed Meat Products. FRI Briefings, in March. Food Research Institute, University of Wisconsin-Medison, Wisconsin; 2002.

Drake HL, Kusel K. Acetogenic clostridia. In: Durre P, editor. *Handbook on clostridia*. Boca Raton, FL: Taylor and Francis. 2005; 719–45.

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

Dubois SM, Gilles KA, Hamilton JL, Rebers PA, Smith F. Colorimetric Methods for determination of sugar e related substance. *Analytical Chemistry*, 1956; 228: 13-21.

Fabiano B, Perego P. Thermodynamic study and optimization of hydrogen production by *Enterobacter aerogenes*. *Int J Hydrogen Energy* 2002; 27:149–56.

Fang HHP, Liu H, Zhang T. Characterization of a hydrogen-producing granular sludge. *Biotechnol Bioeng* 2002; 78: 44–52.

Fang HP, Liu H. Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture, *Biores. Technol.* 2002; 82: 87-93.

Ghosh, S. Personal communication. EnviroEnergetics. 1281 E. Federal Heights Dr., Salt Lake City, UT 84103. 2003.

Ginkel SWV, Logan B. Increased biological hydrogen production with reduced organic loading. *Water Reseach.* 2004; 39, 3819-3826.

Gomes NCO, Fagbola R, Costa NG, Rumjanek A, Buchner L, Mendonca-Hagler, Smalla K. Dynamics of fungal communities in bulk and maize rhizosphere soil in the tropics. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004; 69:3758–3766.

Granström T, Aristidou AA, Leisola M. Metabolic Flux Analysis of *Candida tropicalis* Growing on Xylose in an Oxygen-Limited Chemostat. *Metabolic Engineering.* 2002; 4: 248–256.

Griffiths RI, Whiteley AS, O'donnell AG. Rapid Method for coextration of DNA from natural environments for analysis of ribossomal DNA and rRNA-based microbial community composition. *Applied and Environmental Microbiology.* 2000; 66: 5488-5491.

Guwy AJ, Hawkes FR, Hawkes DL, Rozzi AG. Hydrogen Production In A High Rate Fluidised Bed Anaerobic Digester. *Wat. Res.* 1997; 31(6): 1291-1298.

H. Yokoi et al. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 2001; 7(6): 609-613

Hackstein JHP. Eukaryotic Fe-hydrogenases – old eukaryotic heritage or adaptive acquisitions? *International Hydrogenases Conference.* 2004; 47.

Hallenbeck PC. Fundamental of the fermentative production of hydrogen, *Anaerobic Digestion*, 10th World Congress Moreal, Canada. 2004; 1: 249-252.

Han SK, Shin HS. Biohydrogen production by anaerobic fermentation of food waste, *Int. Jounal. of Hydrogen Energy.* 2004; 29: 569-577.

Hawkes FR, Dinsdale R, Hawkes DL, Hussy I. Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimization. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2007; 27: 1339 – 1347.

Hawkes FR, Forsey H, Premier GC, Dinsdale RM, Hawkes DL, Guwy AJ, Cherryman JMS, Shine J, Auty D. Fermentative production of hydrogen from a wheat flour industry co-product. *Bioresource Technology* . in press.

Hawkes FR, Hussy I, Kyazze G, Dinsdale R, Hawkes DL. Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: Principles and progress *International Journal of Hydrogen Energy*. 2007 32: 172 – 184

Holt JG. *Bergey's manual of systematic bacteriology: grampositive bacteria other than Actinomycetes*, 1st ed. vol. 2. Baltimore, MD:Williams & Wilkins; 1986.

Hu B, Chen S. Pretreatment of methanogenic granules for immobilized hydrogen fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2007 32: 3266 – 3273.

Huang GH, Hsu SF, Liang TM, Huang YH. Study on hydrogen production with hysteresis in UASB, *Chemosphere*. 2004; 54: 815-821.

Hung CH, Cheng CH, Cheng LH, Liang CM, Lin HY. Application of *Clostridium*-specific PCR primers on the analysis of dark fermentation hydrogen-producing bacterial community. *International Journal of Hydrogen Energy*. in press.

Hung CH, Lee KS, Cheng LH, Huang YH, Lin PJ, Chang JS. Quantitative analysis of a high-rate hydrogen-producing microbial community in anaerobic agitated granular sludge bed bioreactors using glucose as substrate. *Journal Applied Microbiology and Biotechnology*. 2007; 75 (3): 693-701.

Ito T, Nakashimada Y, Senba K, Matsui T, Nishio N. Hydrogen and Ethanol Production from Glycerol-Containing Wastes Discharged after Biodiesel Manufacturing Process. *Journal of bioscience and bioengineering*. 2005; 100 (3): 260–265.

Iyer P, Bruns MA, Zhang H, Van Ginkel S, Logan BE. H₂-producing bacterial communities from a heat-treated soil inoculum. *Appl Microbiol Biotechnol* 2004; 66: 166–17323.

Junker M, Bocquet L, Bendif M, Bendif M, Karboviac D. Hydrogen for road transportation: achievements and developments. *Annales de Chimie-Science des Materiaux*. 2001; 26(4): 117-130.

Kawagoshi Y, Hino N, Fujimoto A, Nakao M, Fujita Y, Sugimura S., Furukawa, K. Effect of Inoculum Conditioning on Hydrogen Fermentation and pH Effect on Bacterial Community Relevant to Hydrogen Production. *Journal of Bioscience e Bioengineering*, 2005; 100(5): 524-530.

Kalia VC, Jain SR, Kumar A, Joshi AP. Fermentation of biowaste to H₂ by *Bacillus licheniformis*. *World J Microbiol Biotechnol* 1994; 10:224–7.

Khanal SK, Chen WH, Li L, Sung S. Biological hydrogen production: effects of pH and intermediate products. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2004; 29: 1123 – 1131.

Kim JS, Wongtanet J, Kim DK, Sang BI. Fermentative biohydrogen production using heated anaerobic sludge. Unpublished, reference 2 (bases 1 to 1460). Submitted (11-AUG-2005) Water Environment & Remediation Research Center, Korea Institute of Science and Technology, 39-1, Hawolgok-Dong, Seongbuk-Gu, Seoul 136-791, Korea.

Kim S, Seol E, Raj SM, Park S, Oh YK, Ryu DDY. Various hydrogenases and formate-dependent hydrogen production in *Citrobacter amalonaticus* Y19. *International Journal of Hydrogen energy*. in press

Kim SH, Han SK, Shin HS. Effect of substrate concentration on hydrogen production and 16S rDNA-based analysis of the microbial community in a continuous fermenter. *Process Biochem* 2006; 41 (1): 199–207.

Kimura, M. A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*. 1980; 16: 111-120.

Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*. 2004; 5: 150-153.

Lay JJ, Lee YJ, Noike T. Feasibility of biological hydrogen production from organic fraction of municipal solid waste. *Water Res*. 1999; 33:2579–86.

Lee J, Kim BH. Bacterial diversity of copiotrophic artificial wastewater enriched microbial fuel cell. Unpublished, reference 2 (bases 1 to 1509). Submitted (02-MAR-2004) Water Environment Center, KIST, 39-1, Hawolgokdong, Seoul, Korea.

Lee KS, Lin PJ, Fangchiang K, Chang JS. Continuous hydrogen production by anaerobic mixed microflora using a hollow-fiber microfiltration membrane bioreactor. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2007 32: 950 – 957.

Lee, KS, Lo YS, Lo YC, Lin PJ, Chang JS. H₂ production with anaerobic sludge using activated-carbon supported packed-bed bioreactor. *Biotechn. Letter*. 2003; 25: 133-138.

Leite JAC, Foresti E, Barboza M, Zaiat M. Produção e ácidos graxos voláteis por fermentação acidogênica em reator anaeróbio de leio fixo com argila expandida com suporte da biomassa, XIV SINAFERM; 2003; Florianópolis, SC, 2003.

Leite JAC, Fernandes BS, Pozzi E, Barboza M, Zaiat M. Application of anaerobic packed-bed bioreactor for the production of hydrogen and organic acids. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2008; 33: 579-586.

Levenspiel, O. Engenharia das Reações Químicas, tradução da 3ª Edição, Editora Edgard Blücher LTDA 2005.

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

Li J, Li B, Zhu G, Ren N, Bo L, He J. Hydrogen production from diluted molasses by anaerobic hydrogen producing bacteria in an anaerobic baffled reactor (ABR).

International Journal of Hydrogen Energy. 2007; 32: 3274 – 3283.

Li YF, Ren NQ, Chen Y, Zheng GX. Ecological mechanism of fermentative hydrogen production by bacteria. International Journal of Hydrogen Energy. in press.

Lin CY, Chang RC. Fermentative hydrogen production at ambient temperature. International Journal of Hydrogen Energy. 2004; 29: 715 – 720.

Lin CY, Lay CH. A nutrient formulation for fermentative hydrogen production using anaerobic sewage sludge microflora. International Journal of Hydrogen Energy. 2005; 30: 285 – 292.

Lin CY, Shei SH. Heavy metal effects on fermentative hydrogen production using natural mixed microflora. International Journal of Hydrogen Energy. in press

Lior N Review Energy resources and use: The present situation and possible paths to the future Energy. in press

Liu H, Fang HHP. Hydrogen production from wastewater by acidogenic granular sludge, Water Science and Technol. 2002; 47(1): 153-158.

Liu X, Zhu Y, Yang ST. Butyric acid and hydrogen production by *Clostridium tyrobutyricum* ATCC 25755 and mutants. Enzyme and Microbial Technology. 2006; 38: 521–528.

Logan B, Oh SE, Kim I, Van Ginkel EW. Biological Hydrogen Production Measured in Batch AnaerobicRespirometers. Environ. Sci. Technol. 2002; 36: 2530-2535

Maeda T, Vardar G, Self WT, Wood TK. Inhibition of hydrogen uptake in *Escherichia coli* by expressing the hydrogenase from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. BMC Biotechnology. 2007; 7: 2-5.

Maier RJ, Olczak A, Maier S, Soni S, Gunn J. Respiratory Hydrogen Use by *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Is Essential for Virulence. Infect Immun. 2004; 72(11): 6294–6299.

Maxam AM, Gilbert W. A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad. Sci USA*. 1977; 74: 560-564.

MCT, Disponível em: http://www.mct.gov.br/upd_blob/0015/15132.pdf. Acessado em: Janeiro de 2008.

Mizuno O, Dinsdale R, Hawkes FR, Hawkes DL, Noike T. Enhancement of hydrogen production from glucose by nitrogen gas sparging. *Bioresource Technology* 2000; 73: 59-65.

Mohan SV, Babu VL, Sarma PN. Effect of various pretreatment methods on anaerobic mixed microflora to enhance biohydrogen production utilizing dairy wastewater as substrate. *Bioresource Technology*. 2008; 99: 59–67.

Mohan SV, Mohanakrishna G, Ramanaiah SV, Sarma PN. Simultaneous biohydrogen production and wastewater treatment in biofilm configured anaerobic periodic discontinuous batch reactor using distillery wastewater. *International Journal of Hydrogen Energy*, in press.

Moraes EM, Adorno MAT, Zaiat M, Foresti E. Determinação de ácidos voláteis por cromatografia gasosa em efluentes de reatores anaeróbios tratando resíuos líquidos e sólidos. *Anais, Vol. II da Oficina e Seminário Latino Americano sobre Digestão Anaeróbia*. 5 a 9 novembro de 2000, Recife. 2000; 146-149.

Mu Y, Yu HQ, Wang G. A kinetic approach to anaerobic hydrogen-producing process. *Water Research* . 2007 41: 1152 – 1160.

Mu Y, Yu HQ. Biological hydrogen production in a UASB reactor with granules I: physicochemical characteristics of hydrogen-producing granules. *Biotechnol Bioeng* 2006; 94(5):980–7.

Nguyen TAD, Kim JP, Kim MS, Oh YK, Sim SJ. Optimization of hydrogen production by hyperthermophilic eubacteria, *Thermotoga maritima* and *Thermotoga neapolitana* in batch fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*. in press.

Nielsen AT, Amandusson H, Bjorklund R, Dannerun H, Ejlertsson J, Ekedahl L, Lundström I, Svensson BH. Hydrogen production from organic water, *International Journal of Hydrogen Energy*. 2001; 26: 547-550.

Nielsen MK, Arneborg N. The effect of citric acid and pH on growth and metabolism of anaerobic. *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailii* cultures. *Food Microbiology*. 2007; 24: 101–105.

Nuccia M, Colombo AL. Candidemia due to *Candida tropicalis*: clinical, epidemiologic, and microbiologic characteristics of 188 episodes occurring in tertiary care hospitals. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2007; 58: 77–82.

Oh SE, Van Ginkel S, Logan BE. The relation effectiveness of pH control and heat treatment for enhancing biohydrogen gas production. *Environ. Sci. Technol*. 2003; 37: 5186-5190.

Piveli R. Curso de especialização engenharia de controle de poluição ambiental, Departamento de Saúde Ambiental, USP. 1999.

Ren N, Li J, Li B, Wang Y, Liu S. Biohydrogen production from molasses by anaerobic fermentation with a pilot-scale bioreactor system. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2006; 31: 2147 – 2157.

Ren NQ, Chua H, Chan SH, Tsang YF, Wang YJ, Sin N. Assessing optimal fermentation type for bio-hydrogen production in continuous-flow acidogenic reactors. *Bioresource Technology*. 2007; 98(9): 1774-1780.

Revista Pesquisa Fapesp, Eletricidade do hidrogênio, São Paulo, ed. Fapesp, no 103, Setembro 2004.

Revista Veja, Veloz e limpo: Movido a hidrogênio, que não polui o ar, o novo protótipo da BMW anda a 300 Km por hora. São Paulo, ed. Abril, no. 1874, 6 de Outubro de 2004.

Ribeiro R, Varesche MBA, Foresti E, Zaiat M. Influence of extracellular polymeric

Substances on the anaerobic biofilm formation onto polyurethane foam matrices. Environm. Eng. Science. 2003; 20 (3): 249-257.

Rogers P, Gottschalk G. Biochemistry and regulation of acid and solvent production in Clostridia. In: Woods, D.R. (Ed.), The Clostridia and Biochemistry. Butterworth-Heinemann, Stoneham, Mass. 1993; 25–50.

Saitou N, Nei M. The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic tress. Mol. Biol. Evol. 1987; 4(4): 406-25.

Sambrooke J, Fritsch EF, Maniats T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY. 1989.

Seveg O, Abeliovich A, Kushmaro A. Biodegradation of dibromoneopentyl glycol by a bacterial community. Chemosphere. 2007; 68: 958-964.

Schröder U, Scholz F. Bacterial batteries. Nature Biotechnology. 2003; 21(10): 1151-1152.

Shin JH, Yoon JH, Ahn EK, Kim MS, Sim SJ, Park TH. Fermentative hydrogen production by the newly isolated *Enterobacter asburiae* SNU-1. International Journal of Hydrogen Energy. 2007; 32: 192 – 199

Silva, AJ, Zaita M. Avaliação de material suporte para imobilização de bactéria redutora de sulfato e arqueas metanogênicas. I Seminário do Proj. Temático. 2002; 191-200.

SiriwongrungsonV, Zeng RJ, Angelidaki I. Homoacetogenesis as the alternative pathway for H₂ sink during thermophilic anaerobic degradation of butyrate under suppressed methanogenesis. Water Research. 2007; 41: 4204 – 4210.

So C, Young L. Isolation and characterization of sulfate-reducing bacterium that anaerobically degrades alkanes. Applied and Environmental Microbiology, 1999; 65: 2969-2976.

Stenerson K. Analysis of Permanent Gases, The Reporter, 2004; 3(1): 3.

Sun Q, Hong K. Identification of Marine Bacteria with Antimicrobial and Cytotoxic Activity. Unpublished, referencia (bases 1 to 1408), Submitted (26-MAR-2007) Laboratory of Tropical Crop Biotechnology, Chinese Academy for Tropical Agriculture Sciences, Chengxi, Haikou, Hainan 571101, China.

Taguchi F, Mikukami N, Saito-Taki T, Hasegawa K. Hydrogen production from continuous fermentation of xylose during growth of *Clostridium* sp. Strain No. 2. *Can. J. Microbiol.* 1995; 41: 536–540.

Tanisho S, Ishiwata Y. Continuous Hydrogen Production from Molasses by Fermentation Using Urethane Foam As A Support Of Flocks. *Int. J. Hydrogen Energy.* 1995; 20 (I): 541-545, 1995.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ, Clustal W. Improving the sensitivy of progressive multiple alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research.* 1994; 22: 4673-4680.

Turcot J, Bisailon A, Hallenbeck PC. Hydrogen production by continuous cultures of *Escherchia coli* under different nutrient regimes. *International Journal of Hydrogen Energy.* in press.

Ueno Y, Haruta S, Ishii M, Igarashi Y. Microbial community in anaerobic hydrogen-producing microflora enriched from sludge compost. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2001; 57: 555–62.

Ueno Y, Kawai T, Sato S, Otasuka S, Morimoto M. Biological production of hydrogen from cellulose by natural anaerobic microflora. *J Ferment Bioeng* 1995; 79(4):395–7.

Ust'aka S, Havrland B, Muñoz JOJ, Fernández EC, Lachman J. Experimental verification of various methods for biological hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy.* in press

Valdks-Stauber N, Scherer S, Seiler H. Identification of yeasts and coryneform bacteria from the surface microflora of brick cheeses. *International Journal of Food Microbiology.* 1997; 34: 115- 129.

Van Ginkel SW, Logan B. Increased biological hydrogen production with reduced organic loading. *Water Research*. 2005; 39: 3819–3826.

Vanio EJ, Hantula, J. Direct analysis of wood-inhabiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA. *Mycol. Res*. 2000; 104:927–936.

Vazquez IV, Sparling R, Risbey D, Seijas NR, Varaldo HMP. Hydrogen generation via anaerobic fermentation of paper mill wastes. *Bioresource Technology*. 2005; 96: 1907–1913.

Zang T, Fang HHP. Digitization of DGGE profile and cluster analysis of microbial communities. *Biotechnol. Lett*. 2000; 22: 399-404.

Wu SY, Lin CN, Chang JS, Lee KS, Lin PJ. Microbial hydrogen production with immobilized sewage sludge, *Biotechnol. Prog*. 2002; 18: 921-926.

Wu SY, Lin, CN, Chang JS, Lee, KS, Lin PJ, Hydrogen production with immobilized sewage sludge in three-phase fluidized-bed bioreactor, *Biotechnol. Prog.*, 2003; 19: 828-832.

Wyder MT, Bachmann HP, Puhon Z. Role of Selected Yeasts in Cheese Ripening: An Evaluation in Foil Wrapped. Raclette Cheese. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol*. 1999; 32: 333-343.

Xing D, Ren N, Gong M, Li J, Li Q. Monitoring of microbial community structure and succession in the biohydrogen production reactor by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Sci China Ser C* 2005; 48 (2):155–62.

Yang P, Zhang R, McGarvey JA, Benemann JR. Biohydrogen production from cheese processing wastewater by anaerobic fermentation using mixed microbial communities. *International Journal of Hydrogen Energy*. in press

Yarlett N, Hackstein JHP. Hydrogenosomes: One organelle, multiple origins. *Bioscience*. 2005; 55 (8): 657-668.

Yokoyama H, Waki M, Ogino A, Ohmori H, Tanaka Y. Hydrogen Fermentation Properties of Undiluted Cow Dung. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2007; 104(1): 82–85.