SANDRA IMACULADA MAINTINGUER

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FILOGENÉTICA DE CONSÓRCIO BACTERIANO
UTILIZADO EM REATOR ANAERÓBIO EM BATELADA APLICADO À PRODUÇÃO
DE HIDROGÊNIO**

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
Orientadora: Profa. Assoc. Maria Bernadete Amâncio Varesche Silva

São Carlos
2009

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

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

M226o Maintinguer, Sandra Imaculada
Obtenção e caracterização filogenética de consórcio bacteriano utilizado em reator anaeróbico em batelada aplicado à produção de hidrogênio / Sandra Imaculada Maintinguer ; orientador Maria Bernadete Amâncio Varesche Silva. -- São Carlos, 2009.

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, 2009.

1. Sacarose. 2. Xilose. 3. Hidrogênio. 4. Fermentação. 5. *Clostridium* sp. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Ecóloga **SANDRA IMACULADA MAINTINGUER**

Tese defendida e julgada em 20/03/2009 perante a Comissão Julgadora:

Profa. Dra. **MARIA BERNADETE AMÂNCIO VARESCHE** (Orientadora)
(Escola de Engenharia de São Carlos/USP)

Aprovada

Prof. Titular **EUGENIO FORESTI**
(Escola de Engenharia de São Carlos/USP)

Aprovada

Dra. **ISABEL KIMIKO SAKAMOTO**
(Pós-doutoranda/CNPq)

Aprovada

Profa. Dra. **VALÉRIA MAIA DE OLIVEIRA**
(Universidade Estadual de Campinas/UNICAMP)

Aprovada

Profa. Dra. **CLAUDIA ETCHEBEHERE ARENAS**
(Facultad de Química/Uruguay)

Aprovada

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

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

Aos meus grandes incentivadores, José Eduardo e Guilherme
Henrique, com carinho e amor

Agradecimentos

À Deus, por mais essa oportunidade de aprender, crescer e vencer.

À minha família, minha grande força, pelo incentivo, confiança, carinho e amor.

À Profa. Dra. Maria Bernadete Amâncio Varesche, mais que orientadora; grande amiga e companheira, pela amizade, conselhos, sugestões e, principalmente ter apostado e acreditado em meu potencial e capacidade em todos os momentos.

À Profa. Dra. Odete Rocha, pela amizade, conselhos, companheirismo e apoio incondicional no ingresso do doutorado.

Aos pesquisadores Dr. Marcelo Zaiat, Dra. Isabel Sakamoto e Dra. Iolanda Duarte pela participação e sugestões nos exames de qualificação preliminares.

Às técnicas: Maria Angela Tallarico Adorno, Eloisa Pozzi e Elisabeth Moraes pelo apoio e ajuda nas análises, cálculos para o preparo de soluções e microscopia.

À Tininha e Katita, grandes amigas, pela ajuda nas análises de Biologia Molecular.

Aos pesquisadores Dagoberto e Julia pela ajuda em todos os momentos de conclusão e formatação da Tese.

Aos colegas de pesquisa do LPB: Flavia Saia, Gunther, Mercia, Luis Ricardo, Márcia, Fabio, Arnaldo, Betão, Alexandre Ono, Daniele, Estela, Cattony, Kelly, Ari, Eduardo Amorim, Guilherme, Renata Médici, Renata Barreira, Theo, Bruna, Marcelinho, Maurício, Leonardo Damasceno, Orlando, pelo companheirismo em todas as horas.

À Dra. Bruna Fernandes pela amizade e ajuda incondicional no desenvolvimento da pesquisa e publicação do artigo.

Aos colegas de pesquisa que se tornaram grandes amigos: Bruna, Dalva, Tiagão, Dagoberto, Lorena, Tininha, Kátia, Janja, Regiane, Carol Zampol, Julia e Isabel.

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

Enfim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente, para que essa pesquisa fosse realizada.

OBRIGADA!

“Tudo posso Naquele que me fortalece”

Filipenses 4,13

RESUMO

MAINTINGUER, S.I. (2009). *Obtenção e caracterização filogenética de consórcio bacteriano utilizado em reator anaeróbico em batelada aplicado à produção de hidrogênio*. Tese (doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos – Departamento de Hidráulica e Saneamento.

O pré-tratamento a quente do inóculo associado ao controle do pH tem sido aplicado para selecionar bactérias produtoras de hidrogênio, como por exemplo, *Clostridium* sp. Nesse sentido, o objetivo desse trabalho foi obter consórcio de bactérias anaeróbicas produtoras de hidrogênio a partir de inóculo proveniente de lodo granulado de reator UASB, usado no tratamento de dejetos de suinocultura. Para tanto, foi realizado tratamento a quente do inóculo e, posterior, enriquecimento com diluições seriadas visando obter consórcio anaeróbico. Foram utilizados 20% (v/v) desse consórcio como inóculo nos ensaios de determinação de gás hidrogênio em reatores com diferentes concentrações de sacarose e xilose. Os reatores anaeróbicos (2L) foram alimentados com sacarose e xilose, separadamente, em triplicata, a 37° C, pH 5,5 e *headspace* com He (100%) para as seguintes condições: (1) 630,0 mg sacarose/L; (2) 1184,0 mg sacarose/L; (3) 1816,0 mg sacarose/L, (4) 4128,0 mg sacarose/L, (5) 630,0 mg xilose/L; (6) 1341,0 mg xilose/L; (7) 1848,0 mg xilose/L e (8) 3588,0 mg xilose/L. A produção de H₂ foi verificada em todos os reatores anaeróbicos e não houve geração de metano. Os rendimentos de substrato a H₂ para as condições (1), (2), (3), (4), (5), (6), (7) e (8) foram, respectivamente, 15% (1,2 mol H₂/mol sacarose), 20% (1,6 mol H₂/mol sacarose), 15% (1,2 mol H₂/mol sacarose), 4% (0,3 mol H₂/mol sacarose); 3,0 % (0,2 mol H₂/mol xilose), 8,0 % (0,5 mol H₂/mol xilose), 10,0 % (0,6 mol H₂/mol xilose) e, 14% (0,8 mol H₂/mol xilose). Em todos os reatores foram detectados os ácidos acético e butírico e etanol. A morfologia predominante foi de bacilos Gram positivos e formadores de endósporos. Análises de clonagem e sequenciamento do consórcio bacteriano revelaram semelhanças com *Clostridium*, *Burkholderia*, *Klebsiella* e bactérias não cultivadas. A produção biológica de gás hidrogênio foi devida a consórcios de bactérias que estiveram presentes nas condições estudadas, identificados, principalmente, por espécies de, *Clostridium* sp., *Clostridium acidotolerans* e *Klebsiella pneumoniae*, reconhecidas como geradoras de H₂ e ácidos voláteis.

Palavras-chave: sacarose, xilose, hidrogênio, fermentação, *Clostridium* sp.

ABSTRACT

MAINTINGUER, S.I. (2009). *Collection and phylogenetic characterization of bacterial consortium used in batch anaerobic reactor applied to hydrogen production* PhD. Thesis – Escola de Engenharia de São Carlos – Departamento de Hidráulica e Saneamento.

The heat treatment of the inoculum associated with the pH control has been applied to select hydrogen-producing bacteria such as *Clostridium* sp. Therefore, this study aimed at preserving and keeping the anaerobic bacteria cultures producing hydrogen that comes from the granular sludge in UASB reactor, used to treat waste from pig farming, after heat treatment. For this, heat treatment of the inoculum was done and later, enrichment with serial dilutions to get anaerobic consortium. The 20% (v/v) of the bacterial consortium was used in essays for determination of hydrogen gas in reactors with different concentrations of sucrose and xylose. The reactors (2L), fed with sucrose and xylose, separately, in triplicate, to 37° C, pH 5.5 and headspace with He (100%) for the conditions: (1) 630.0 mg sucrose/L, (2) 1184.0 mg sucrose/L, (3) 1816.0 mg sucrose/L, (4) 4128.0 mg sucrose/L, (5) 630.0 mg xylose/L, (6) 1341.0 mg xylose /L, (7) 1848.0 mg xylose/L and (8) 3588.0 mg xylose/L. H₂ production was detected in all the anaerobic reactors and there was no methane generation. H₂ yield for the conditions (1), (2), (3), (4), (5), (6), (7) and (8) were, respectively, 15% (1, 2 mol H₂/mol sucrose), 20% (1.6 mol H₂/mol sucrose), 15% (1.2 mol H₂/mol sucrose), 4% (0.3 mol H₂/mol sucrose), 3.0 % (0.2 mol H₂/mol xylose), 8.0% (0.5 mol H₂/mol xylose), 10.0% (0.6 mol H₂/mol xylose), and 14% (0.8 mol H₂/mol xylose). The metabolic intermediarie products were acetic, butyric acid and ethanol in all anaerobic reactors. The main morphology was Gram positive bacilli and endospores formers. The cloning and sequencing analysis of the bacterial consortium revealed the presence of *Clostridium* genus (57%), *Burkolderia* genus (30%), *Klebsiella* genus (8%) and uncultivated bacteria (5%). The hydrogen gas production was due to bacterial consortium that were present in the studied conditions, marked mainly by species *Clostridium* sp., *Clostridium acidotolerans* and *Klebsiella pneumoniae*, recognized as H₂ and volatile acids producing.

Keywords: sucrose, xylose, hydrogen, fermentation, *Clostridium* sp.

Sumário

Lista de Figuras	iv
Lista de Tabelas	vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
2.1 Geral	4
2.2 Específicos	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1 Produção de Hidrogênio em Processos Fermentativos	5
3.2 Microrganismos Envolvidos na Produção de Hidrogênio	16
3.3 Caracterização Microbiana por Técnicas Tradicionais e de Biologia Molecular	23
3.4 Considerações Finais	34
4. MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1 Esquema Operacional	36
4.2 Substrato Sintético	40
4.3 Inóculo	41
4.4 Enriquecimento e manutenção do inóculo pré-tratado	41
4.5 Reativação da biomassa enriquecida	43
4.6 Análise do Crescimento Celular	43
4.7 Ensaios com reatores anaeróbios alimentados com sacarose e xilose	44
4.8 Análises Cromatográficas	46
4.9 Análises dos consumos de sacarose e xilose	47
4.10 Análises de pH	48
4.11 Análise da Pressão Parcial de H ₂	48
4.12 Análises microbiológicas	49
4.12.1 Exames microscópicos	49
4.12.2 Biologia Molecular	49
4.12.2.1 Clonagem do gene RNAr 16S	49
4.12.2.2 Sequenciamento do gene RNAr 16S	52
4.12.2.3 Análise da Diversidade Microbiana	53
4.12.2.4 Extração dos Ácidos Nucléicos	54
4.12.2.5 Reação de polimerização em cadeia	55
4.12.2.6 Eletroforese em gel de gradiente desnaturante	57
4.12.2.7 Purificação do Produto do PCR para reação de sequenciamento	59
4.12.2.8 Reação de Sequenciamento	60
4.12.2.9 Análise Filogenética	61
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
5.1 Obtenção do Consórcio Microbiano	62
5.2 Caracterização do Consórcio Microbiano	65
5.3 Ensaios com reatores anaeróbios alimentados com sacarose	71
5.3.1 Condição (1) - 630,0 mg sacarose/L	71
5.3.2 Condição (2) - 1184,0 mg sacarose/L	76
5.3.3 Condição (3) - 1816,0 mg sacarose/L	81

5.3.4 Condição (4) - 4128,0 mg sacarose/L	86
5.3.5 Análise da diversidade microbiana	92
5.3.6 Análise Comparativa dos reatores anaeróbios alimentados com sacarose	97
5.4 Ensaios com reatores anaeróbios alimentados com xilose.....	105
5.4.1 Condição (5) - 630,0 mg xilose/L	105
5.4.2 Condição (6) - 1341,0 mg xilose/L	111
5.4.3 Condição (7) - 1848,0 mg xilose/L	117
5.4.4 Condição (8) - 3588,0 mg xilose/L	122
5.4.5 Análise da diversidade microbiana	128
5.4.6 Análise comparativa dos reatores anaeróbios alimentados com xilose	129
5.5 Considerações Finais	134
6. CONCLUSÕES.....	137
6.1 Obtenção do Consórcio microbiano.....	137
6.2 Caracterização do Consórcio Microbiano.....	137
6.3 Ensaios com reatores anaeróbios alimentados com sacarose.....	138
6.4 Ensaios com reatores anaeróbios alimentados com xilose.....	139
7. PERSPECTIVAS FUTURAS	141
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	142
APÊNDICE I	150
Tabela I.1 Medidas de absorvância e Massa Seca de duplicata de reatores anaeróbios operados com 2000 mg sacarose/L.....	150
Figura I.1 Obtenção da equação que relaciona absorvância e massa seca para reatores anaeróbios operados com 2000 mg sacarose/L	150
APÊNDICE II	151
Tabela II.1 Medidas de absorvância e Massa Seca de duplicata de reatores anaeróbios operados com 2000 mg xilose/L	151
Figura II.1 Obtenção da equação que relaciona absorvância e massa seca para reatores anaeróbios operados com 2000 mg xilose/L	151
APÊNDICE III.....	152
Tabela III.1 Volumes de H ₂ injetados e área cromatográfica obtida para curva de calibração de medidas de H ₂ em cromatógrafo gasoso GC 2010	152
Figura III.1 - Obtenção da equação que relaciona mols de H ₂ e área cromatográfica	153
APÊNDICE IV.....	154
Tabela IV.1 Equações das curvas de calibração e R ² – y = fator de resposta e x = concentração (mg/L)	154
APÊNDICE V	155
Tabela V.1 Medidas de absorvância obtidas a partir de soluções com concentrações diferentes de sacarose	155
Figura V.1 Obtenção da equação que relaciona absorvância e concentração de sacarose	155
Tabela V.2 Medidas de absorvância obtidas a partir de soluções com concentrações diferentes de xilose	156
Figura V.2 Obtenção da equação que relaciona absorvância e concentração de xilose	156

APÊNDICE VI	157
Tabela VI.1 Variação temporal do crescimento celular e consumo de sacarose nos reatores anaeróbios da condição (1) com 630,0 mg sacarose/L	157
Tabela VI.2 Variação temporal da porcentagem e pressão parcial de gás H ₂ nos reatores anaeróbios da condição (1) com 630,0 mg sacarose/L	158
Tabela VI.3 Variação temporal do crescimento celular e consumo de sacarose dos reatores anaeróbios da condição (2) com 1184,0 mg sacarose/L	159
Tabela VI.4 Variação temporal da porcentagem e pressão parcial de gás H ₂ nos reatores anaeróbios da condição (2) com 1184,0 mg sacarose/L	160
Tabela VI.5 Variação temporal do crescimento celular e consumo de sacarose dos reatores anaeróbios da condição (3) com 1816,0 mg sacarose/L	161
Tabela VI.6 Variação temporal da porcentagem e pressão parcial de gás H ₂ nos reatores anaeróbios da condição (3) com 1816,0 mg sacarose/L	162
Tabela VI.7 Variação temporal do crescimento celular e consumo de sacarose dos reatores anaeróbios da condição (4) com 4128,0 mg sacarose/L	163
Tabela VI.8 Variação temporal da porcentagem e pressão parcial de gás H ₂ nos reatores anaeróbios da condição (4) com 4128,0 mg sacarose/L	164
Tabela VI.9 Medidas de Absorbância, SSV, Xilose e %H ₂ (v/v) no headspace dos reatores anaeróbios da condição (5) com 630,0 mg xilose/L	165
Tabela VI.10 Medidas de Absorbância, SSV, Xilose e %H ₂ (v/v) no headspace dos reatores anaeróbios da condição (5) com 1341,0 mg xilose/L	165
Tabela VI.11 Medidas de Absorbância, SSV, Xilose e %H ₂ (v/v) no headspace dos reatores anaeróbios da condição (7) com 1848,0 mg xilose/L	166
Tabela VI.12 Medidas de Absorbância, SSV, Xilose, e %H ₂ (v/v) no headspace dos reatores anaeróbios da condição (8) com 3588,0 mg xilose/L	167

Lista de Figuras

Figura 3.1 Estrutura Molecular da Sacarose	9
Figura 3.2 Fórmula estrutural da xilose	14
Figura 4.1 Esquema operacional	37
Figura 4.2 Esquema operacional realizado para os ensaios dos reatores anaeróbios alimentados com sacarose	38
Figura 4.3 Esquema operacional realizado para os ensaios de reatores anaeróbios alimentados com xilose	39
Figura 4.4 Enriquecimento celular do inóculo pré-tratado: (1) <i>headspace</i> e (2) inóculo com meio de cultivo	42
Figura 4.5 Triplicatas de reatores anaeróbios utilizados nos ensaios	46
Figura 4.6 Organograma das técnicas de Biologia molecular aplicadas nas amostras dos reatores alimentados com sacarose	54
Figura 5.1 Exames microscópicos do consórcio microbiano em reatores de enriquecimento celular: (a) bacilos Gram positivos e Gram negativos; (b) endósporo terminal e bacilos; (c) endósporos e bacilos; e (d) bacilos	63
Figura 5.2 Variação temporal da produção de gás hidrogênio nos reatores em batelada de enriquecimento	64
Figura 5.3 Porcentagem de distribuição filogenética dos clones do consórcio microbiano da identificação de fragmentos do RNAr 16 S para o Domínio Bacteria	67
Figura 5.4 Árvore filogenética de consenso baseada nas sequências dos clones do consórcio microbiano com <i>primers</i> para o Domínio Bacteria. Os valores presentes nos nós da árvore indicam a porcentagem que o ramo se repetiu (500 reamostragens de <i>bootstraps</i>)	70
Figura 5.5 Crescimento microbiano nos reatores anaeróbios da condição (1) com 630,0 mg sacarose/L	71
Figura 5.6 Variação temporal do consumo de sacarose dos reatores anaeróbios da condição (1) com 630,0 mg sacarose/L	72
Figura 5.7 Velocidade global específica da produção de gás H ₂ dos reatores anaeróbios da condição (1) com 630,0 mg sacarose/L	73
Figura 5.8 Variação temporal das proporções de ácidos voláteis nos reatores anaeróbios para a condição (1) com 630,0 mg sacarose/L	75
Figura 5.9 Variação temporal das proporções de acetona, metanol e etanol nos reatores anaeróbios da condição (1) com 630,0 mg sacarose/L	75
Figura 5.10 Crescimento microbiano nos reatores anaeróbios da condição (2) com 1184,0 mg sacarose/L	76
Figura 5.11 Variação temporal do consumo de sacarose nos reatores anaeróbios da condição (2) com 1184,0 mg sacarose/L	77
Figura 5.12 Velocidade global específica de produção de gás H ₂ nos reatores anaeróbios da condição (2) com 1184,0 mg sacarose/L	79
Figura 5.13 Variação temporal das proporções de ácidos voláteis nos reatores anaeróbios da condição (2) com 1184,0 mg sacarose/L	80
Figura 5.14 Variação temporal das proporções de acetona, metanol e etanol nos reatores anaeróbios da condição (2) com 1184,0 mg sacarose/L	80
Figura 5.15 Crescimento microbiano nos reatores anaeróbios da condição (3) com 1816,0 mg sacarose/L	81

Figura 5.16 Variação temporal do consumo da sacarose nos reatores anaeróbios da condição (3) com 1816,0 mg sacarose/L.....	82
Figura 5.17 Velocidade global específica de produção de gás H ₂ nos reatores anaeróbios da condição (3) com 1816,0 mg sacarose/L	84
Figura 5.18 Variação temporal das proporções de ácidos voláteis gerados nos reatores anaeróbios da condição (3) com 1816,0 mg sacarose/L	85
Figura 5.19 Variação temporal das proporções de acetona, metanol e etanol gerados nos reatores anaeróbios da condição (3) com 1816,0 mg sacarose/L	86
Figura 5.20 Crescimento microbiano nos reatores anaeróbios da condição (4) com 4128,0 mg sacarose/L	87
Figura 5.21 Variação temporal do consumo de sacarose nos reatores anaeróbios da condição (4) com 4128,0 mg sacarose/L.....	88
Figura 5.22 Velocidade global específica da produção de gás hidrogênio nos reatores anaeróbios da condição (4) com 4128,0 mg sacarose/L	89
Figura 5.23 Variação temporal das proporções de ácidos voláteis gerados nos reatores anaeróbios da condição (4) com 4128,0 mg sacarose/L	91
Figura 5.24 Variação temporal das proporções acetona, metanol e etanol nos reatores anaeróbios da condição (4) com 4128,0 mg sacarose/L	91
Figura 5.25 Microscopia de contraste de fase e luz comum da biomassa dos reatores anaeróbios alimentados com sacarose: (a) bacilos e bacilo com endósporo terminal; (b) bacilos com endósporos; (c) bacilos Gram positivos e Gram negativos; (d) bacilos ...	92
Figura 5.26 Perfil das bandas de DGGE de amostras dos reatores anaeróbios alimentados com sacarose com <i>primer</i> específico para o Domínio <i>Bacteria</i> ; (A) 630,0 mg sacarose/L; (B) 1184,0 mg sacarose/L; (C) 1816,0 mg sacarose/L e; (D) 4128,0 mg sacarose/L. % do gradiente em gel desnaturante: 30% - 70%	93
Figura 5.27 Árvore filogenética de consenso baseado nas sequências das bandas recortadas do DGGE com <i>primers</i> para o Domínio <i>Bacteria</i> , obtidas dos reatores anaeróbios alimentados com sacarose. Os valores presentes nos nós das árvores indicam porcentagens que o ramo se repetiu (500 re-amostragens de <i>bootstraps</i>).	96
Figura 5.28 Velocidade global específica de produção de gás H ₂ nos reatores anaeróbios alimentados com sacarose: (■) 630,0 mg/L; (●) 1183,0 mg/L; (□) 1816,0 mg/L; (▲) 4128,0 mg/L.....	98
Figura 5.29 Velocidades globais específicas de produção de H ₂ nos reatores anaeróbios alimentados com sacarose para quatro condições estudadas.....	102
Figura 5.30 Rendimentos de sacarose a H ₂ nos reatores anaeróbios alimentados com sacarose para as quatro condições estudadas	102
Figura 5.31 Pressão parcial máxima de H ₂ exercida nos reatores anaeróbios alimentados com sacarose para quatro condições estudadas	103
Figura 5.32 Exames microscópicos da biomassa em reatores de enriquecimento celular: (a) bacilos Gram positivos com endósporos e Gram negativos e (b) bacilo com endósporo.....	105
Figura 5.33 Crescimento microbiano nos reatores anaeróbios da condição (5) com 630,0 mg xilose/L	106
Figura 5.34 Variação temporal do consumo de xilose dos reatores anaeróbios da condição (5) com 630,0 mg xilose/L	107
Figura 5.35 Velocidade global específica de produção de H ₂ para reatores anaeróbios da condição (5) com 630,0 mg xilose/L	109
Figura 5.36 Variação temporal das proporções de ácidos graxos voláteis gerados nos reatores anaeróbios da condição (5) com 630,0 mg xilose/L	110

Figura 5.37 Variação temporal das proporções de acetona e álcoois gerados nos reatores anaeróbios da condição (5) com 630,0 mg xilose/L	111
Figura 5.38 Crescimento microbiano nos reatores anaeróbios da condição (6) com 1341,0 mg xilose/L.....	112
Figura 5.39 Variação temporal do consumo de xilose nos reatores anaeróbios da condição (6) com 1341,0 mg xilose/L.....	113
Figura 5.40 Velocidade global específica de produção de H ₂ nos reatores anaeróbios da condição (6) com 1341,0 mg xilose/L.....	115
Figura 5.41 Variação temporal das proporções de ácidos graxos voláteis gerados nos reatores anaeróbios da condição (6) com 1341,0 mg xilose/L.....	115
Figura 5.42 Variação temporal das proporções de acetona e álcoois gerados nos reatores anaeróbios da condição (6) com 1341,0 mg xilose/L.....	116
Figura 5.43 Crescimento microbiano nos reatores anaeróbios da condição (7) com 1848,0 mg xilose/L.....	117
Figura 5.44 Variação temporal do consumo de xilose nos reatores anaeróbios da condição (7) com 1848,0 mg xilose/L.....	118
Figura 5.45 Velocidade global específica da produção de H ₂ nos reatores anaeróbios da condição (7) com 1848,0 mg xilose/L.....	120
Figura 5.46 Variação temporal das proporções de ácidos graxos voláteis gerados nos reatores anaeróbios da condição (7) com 1848,0 mg xilose/L	121
Figura 5.47 Variação temporal das proporções de acetona e álcoois gerados nos reatores anaeróbios da condição (7) com 1848,0 mg xilose/L	122
Figura 5.48 Crescimento microbiano nos reatores anaeróbios da condição (8) com 3588,0 mg xilose/L.....	123
Figura 5.49 Variação temporal do consumo de xilose nos reatores anaeróbios da condição (8) com 3588,0 mg xilose/L.....	123
Figura 5.50 Variação temporal da geração de H ₂ nos reatores anaeróbios da condição (4) com 3588,0 mg xilose/L.....	124
Figura 5.51 Variação temporal das proporções de ácidos graxos voláteis gerados nos reatores anaeróbios da condição (8) 3588,0 mg xilose/L	126
Figura 5.52 Variação temporal das proporções de acetona e álcoois gerados nos reatores anaeróbios da condição (8) com 3588,0 mg xilose/L	127
Figura 5.53 Microscopia de contraste de fase e óptica comum da biomassa em reatores anaeróbios alimentados com xilose: (a) bacilo; (b) bacilo; (c) bacilos Gram positivos e Gram negativos e (d) bacilos.....	128
Figura 5.54 Velocidade global específica da produção de H ₂ nos reatores anaeróbios alimentados com xilose: (■) 630,0 mg/L; (●) 1341,0 mg/L; (□) 1848,0 mg/L; (▲) 3588,0 mg/L.....	129
Figura 5.55 Variação temporal do crescimento microbiano nos reatores anaeróbios com xilose: (■) 630,0 mg/L; (●) 1341,0 mg/L; (□) 1848,0 mg/L; (▲) 3588,0 mg/L	130
Figura 5.56 Variação temporal no consumo de xilose dos reatores anaeróbios para condições: (■) 630,0 mg/L; (●) 1341,0 mg/L; (□) 1848,0 mg/L; (▲) 3588,0 mg/L.....	131

Lista de Tabelas

Tabela 3.1 Rendimento máximo de açúcar a hidrogênio em processos fermentativos.....	8
Tabela 3.2 Caracterização do despejo bruto de uma indústria de refrigerantes (amostras compostas).....	9
Tabela 3.3 Produção acumulativa de hidrogênio (P), produção específica potencial de hidrogênio (P_s) e duração da fase lag (λ) nos reatores alimentados com sacarose e amido para variações de pH.....	11
Tabela 3.4 Bactérias fermentativas utilizadas na produção de gás hidrogênio.....	17
Tabela 3.5 Produção de hidrogênio em processos biológicos por bactérias fermentativas.....	18
Tabela 3.6 Comparação da produção de hidrogênio em culturas contínuas por bactérias anaeróbias.....	19
Tabela 3.7 Produtos da fermentação da celulose nos reatores anaeróbios.....	20
Tabela 3.8 Identificação de bactérias por meio do sequenciamento parcial do gene RNAr 16S proveniente de bandas de DGGE.....	24
Tabela 3.9 Comportamento da Produção de Hidrogênio nas séries 1, 2 e 3.....	31
Tabela 4.1 Composição do Meio nutricional Del Nery.....	40
Tabela 4.2 Composição da solução de vitaminas.....	41
Tabela 4.3 Composição dos reatores anaeróbios em batelada de enriquecimento celular.....	42
Tabela 4.4 Montagem dos Ensaios em reatores anaeróbios com sacarose.....	45
Tabela 4.5 Composição do substrato sintético dos reatores anaeróbios com xilose.....	45
Tabela 4.6 Composição do Meio LB.....	51
Tabela 4.7 Composição da solução de acetato de potássio pH 4,8.....	51
Tabela 4.8 Composição da solução de GTE.....	51
Tabela 4.9 Programação do termociclador para reações de sequenciamento.....	53
Tabela 4.10 Procedimento para o preparo da solução de PCR.....	55
Tabela 4.11 Programação do termociclador para amplificação dos fragmentos de ácidos nucleicos pela reação de polimerização em cadeia (PCR).....	55
Tabela 4.12 <i>Primers</i> utilizados nas análises de PCR.....	56
Tabela 4.13 Procedimentos para o preparo do gel em gradiente desnaturante.....	57
Tabela 4.14 Constituição das soluções de gel desnaturante para o Domínio <i>Bacteria</i>	58
Tabela 4.15 Procedimento para preparo da amostra a ser seqüenciada.....	60
Tabela 5.1 Identificação dos clones do Domínio <i>Bacteria</i>	66
Tabela 5.2 Variação temporal dos produtos intermediários gerados nos reatores anaeróbios da condição (1) com 630,0 mg sacarose/L.....	74
Tabela 5.3 Variação temporal dos produtos intermediários gerados nos reatores anaeróbios da condição (2) com 1184,0 mg sacarose/L.....	78
Tabela 5.4 Variação temporal dos produtos intermediários gerados nos reatores anaeróbios para a condição (3) com 1816,0 mg sacarose/L.....	83
Tabela 5.5 Variação temporal dos produtos intermediários gerados nos reatores anaeróbios da condição (4) com 4128,0 mg sacarose/L.....	90
Tabela 5.6 Identificação das bandas recortadas do DGGE dos reatores anaeróbios alimentados com sacarose, por meio do sequenciamento de fragmentos do RNAr 16S.....	94
Tabela 5.7 Resumo geral dos parâmetros obtidos dos reatores anaeróbios para as diferentes condições de alimentação com sacarose.....	100
Tabela 5.8 Variação temporal dos produtos intermediários nos reatores com 630,0 mg xilose/L.....	108

Tabela 5.9 Variação temporal dos produtos intermediários gerados nos reatores alimentados com 1341,0 mg xilose/L.....	114
Tabela 5.10 Variação temporal dos produtos intermediários gerados nos reatores alimentados com 1848,0 mg xilose/L.....	119
Tabela 5.11 Variação temporal dos produtos intermediários gerados nos reatores com 3588,0 mg xilose/L.....	125
Tabela 5.12 Resumo geral dos parâmetros obtidos dos reatores anaeróbios para as diferentes condições de alimentação com xilose	132
Tabela 5.13 Comparação dos melhores resultados obtidos no presente trabalho com a literatura	135

1. INTRODUÇÃO

A poluição ambiental tem crescido rapidamente, principalmente em função da industrialização e urbanização. Por esse motivo, tem-se procurado alternativas em fontes de energia mais limpas, buscando satisfazer o crescimento da demanda energética mundial. O hidrogênio pode ser considerado como combustível alternativo por sua eficiência elevada de conversão, ser reciclável e natureza não poluente.

Os processos biológicos de produção de hidrogênio podem ocorrer utilizando-se os seguintes caminhos: (a) biofotólise da água utilizando alga e cianobactéria; (b) fotossíntese anoxigênica com compostos orgânicos por bactéria fototrófica; (c) produção fermentativa de hidrogênio por meio de compostos orgânicos e; (d) sistemas híbridos utilizando bactérias fototrófica e fermentativa.

As possibilidades indicadas anteriormente salientam, portanto, que a conversão fermentativa de substratos orgânicos com geração de gás H_2 pode ser um dos caminhos ambientalmente corretos e promissores para geração de biotecnologia energética. Bactérias fermentativas produtoras de gás hidrogênio têm potencial para tratar águas residuárias enquanto produzem energia limpa e renovável em seu processo (Salermo *et al.*, 2006).

A produção biológica de gás hidrogênio, em processos fermentativos, pode ser facilitada com inibição da metanogênese, por meio do pré-tratamento do inóculo; uma vez que arqueias metanogênicas consomem este gás nos processos biológicos anaeróbios. Por outro lado, metodologias como controle do pH e pré-tratamento a quente do inóculo têm sido aplicadas para favorecer a produção de hidrogênio e crescimento de *Clostridium*, bactérias formadoras de endósporos, tolerantes a temperaturas elevadas e condições ambientais adversas (Kawagoshi *et al.*, 2005).

Quando se impõe controle de pH, há formação de ácidos graxos voláteis, favorecendo a seleção microbiana e consequente a produção de gás H_2 . Processos fermentativos de produção de hidrogênio com bactérias anaeróbias acidogênicas, como *Clostridium*, têm sido usados frequentemente por diversos autores (Ueno *et al.*, 2001; Fan *et al.*, 2004; Khanal *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2006, Hawkes *et al.*, 2007; Kotay *et al.*, 2007). Além disso, ácidos voláteis, tais como acético e butírico, são os produtos intermediários principais da fermentação de dissacarídeos, como sacarose e pentoses, como a xilose.

Reatores em batelada são usados para investigar requerimentos nutricionais e obter produtividades de hidrogênio a partir de substratos orgânicos (Hawkes *et al.*, 2007). A

produção de hidrogênio a partir de carboidratos complexos, como o amido, por exemplo, tem sido estudada em reator em batelada porque a matéria orgânica particulada pode dificultar a operação em outras configurações.

Produção de gás hidrogênio tem sido verificada para diferentes concentrações de substratos orgânicos. Todavia, a eficiência de produção de hidrogênio para concentrações elevadas de substratos orgânicos pode ser reduzida, tornando-se fator inibitório para o crescimento celular. Por outro lado, existem poucos estudos de produção de hidrogênio para concentrações reduzidas de substratos. Tal possibilidade seria compatível com efluente de indústria de refrigerantes, por exemplo, que poderia ser reaproveitado para a geração de energia.

Diversos compostos como glicose, isômeros de hexoses e polímeros na forma de amido ou celulose apresentam produções diferentes de hidrogênio por mol de substrato orgânico, dependendo da rota fermentativa e dos produtos finais. Os ácidos orgânicos obtidos são, principalmente, láctico, acético e butírico. As porcentagens de gás H_2 produzidos nesses processos oscilam geralmente entre 60-90% (v/v). Outros gases podem estar presentes na mistura, tais como dióxido de carbono (CO_2), metano (CH_4), sulfeto de hidrogênio (H_2S) e oxigênio (O_2), porém em pequenas quantidades (Das & Veziroglu, 2001; Levin *et al.*, 2004).

Várias fontes de inóculo têm sido testadas com eficiências confirmadas na produção biológica de hidrogênio, tais como amostras de solo, lodo de estações de tratamento de esgoto sanitário, lodo de estação de tratamento de águas residuárias, sedimento de lago, amostra de aterro sanitário, dentre outros. Porém, essas possibilidades de inóculos são na maioria descritas para clima temperado. Existem poucos estudos de geração de gás hidrogênio com inóculos provenientes de ambiente tropical como o Brasil.

Nesse sentido, buscou-se nesse trabalho verificar a produção biológica de gás hidrogênio em reatores anaeróbios em batelada, operados a 37 °C, alimentados com sacarose e xilose, separadamente, para quatro concentrações distintas e próximas de efluentes industriais, em pH inicial de 5,5. O inóculo testado foi originado de reator UASB, utilizado no tratamento de dejetos de suinocultura, instalado na UNESP de Jaboticabal – SP.

No desenvolvimento dessa pesquisa foram aplicados conhecimentos da literatura relacionados, por exemplo, com o trabalho desenvolvido por Ueno *et al.* (2001), no qual foram adicionados compostos complexos como peptona, com a finalidade de se obterem culturas anaeróbias produtoras de gás hidrogênio. As condições nutricionais que foram empregadas para alimentação de reatores anaeróbios foram desenvolvidas por Del Nery (1987), na Escola de Engenharia de São Carlos (USP). Técnicas de microbiologia de

anaeróbios e exames microbiológicos e de Biologia Molecular foram aplicadas de acordo com a rotina do Laboratório de Processos Biológicos – USP.

O inóculo usado nos ensaios foi enriquecido através de técnicas de pré-tratamento a quente e, posteriormente, alimentado separadamente com sacarose e xilose. Tal procedimento objetivou a inibição da metanogênese com o favorecimento de formação de endósporos, visando a produção de gás H_2 nos reatores anaeróbios em batelada.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a potencialidade do consórcio microbiano na geração de gás hidrogênio, em reatores anaeróbios em batelada, para quatro concentrações diferentes de sacarose e xilose.

2.2 Específicos

- Obter consórcio de bactérias anaeróbias produtoras de gás hidrogênio a partir de inóculo metanogênico, originado de reator UASB, usado no tratamento de dejetos de suinocultura, por meio de técnicas de tratamento a quente e controle de pH;
- Verificar a eficiência do tratamento a quente e controle do pH na seleção de culturas Gram-positivas formadoras de endósporos, por meio de técnicas de Microbiologia clássica;
- Caracterizar morfologicamente o consórcio anaeróbio por meio de técnicas de Microbiologia clássica;
- Enriquecer e purificar o consórcio anaeróbio obtido após pré-tratamento do inóculo;
- Identificar as bactérias produtoras de gás hidrogênio do consórcio enriquecido, por meio de técnicas de Biologia Molecular;
- Comparar a produção de gás hidrogênio para diferentes concentrações de sacarose e xilose em reatores anaeróbios em batelada;
- Avaliar a geração dos produtos intermediários, tais como produção de ácidos orgânicos voláteis e álcoois nos reatores em batelada.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Produção de Hidrogênio em Processos Fermentativos

O gás hidrogênio pode ser produzido por microrganismos anaeróbios fermentativos que utilizam carboidratos, os substratos preferenciais para a sua produção. As reações de fermentação podem ser operadas a temperaturas mesofílicas (25-40 C), termofílicas (40-65 C), termofílicas extremas (65-80 C) ou hipertermofílicas (>80 C) (Levin *et al.*, 2004).

A produção de hidrogênio e sua utilização por microrganismos envolvem a enzima específica denominada hidrogenase (Kalia *et al.*, 2003). Essa enzima age na reação, conforme equação (1), apresentada a seguir:

Enzimas capazes de produzir hidrogênio contêm centros metálicos complexos, com unidades ativas sintetizadas em processos envolvendo enzimas auxiliares e passos de maturação de proteínas. Duas hidrogenases participam desses processos: Fe-nitrogenase e NiFe nitrogenase (Hallenbeck *et al.*, 2004).

Muitas pesquisas têm sido feitas no sentido de tentar a enriquecimento da hidrogenase, através de isolamento de microrganismos. Existem dois problemas na purificação da enzima: a hidrogenase tem tendência a associar-se ao sistema de transporte de elétrons e tornar-se inativa na presença de oxigênio.

De acordo com Das & Veziroglu (2001), diversas bactérias agem na fermentação ácida ou na fermentação de butano 2,3 diol e liberam hidrogênio por meio da decomposição do formiato, como apresentado na reação (2):

O caminho da decomposição do piruvato, através da enzima acetil-CoA, produz formiato, como mostrado na reação (3):

A acetil CoA origina o surgimento de acetato ou etanol, de acordo com as reações (4) e (5):

Existe outro mecanismo para a formação de hidrogênio chamado “caminho NADH”. Esse processo ocorre por re-oxidação do NADH, como mostrado na reação (6):

NADH⁺ é produzido durante a conversão fermentativa da glicose a piruvato, no processo denominado glicólise. O caminho pode ser representado pela reação (7), descrita a seguir:

O caminho da hexose monofosfato no interior da célula ocorre com redução de energia vinda da glicose e geração de dióxido de carbono. A disponibilidade de CO₂ determina a produção de succinato, tal como apresentado nas reações (8) e (9):

De acordo com as equações anteriores é verificado que produções de ácido acético, ácido butírico, butanodiol e acetona poderiam ser aumentadas, enquanto a produção de ácido succínico e ácido fórmico poderiam diminuir e, assim, aumentar a produção de hidrogênio. Então, se o CO₂ for removido compulsoriamente da cultura líquida, os produtos, ácido fórmico e ácido succínico serão reduzidos, conforme descrito na reação (10):

Ruzicka (1996) desenvolveu modelo simples baseado no conceito bioquímico do efeito do hidrogênio na fermentação anaeróbia da glicose. Segundo esse modelo os produtos

intermediários formados foram ácido acético (11), ácido propiônico (12) ou ácido butírico (13), de acordo com as reações descritas a seguir:

De acordo com a formação dos produtos intermediários da degradação da glicose, $\text{NADH}^+ + \text{H}^+$ foram produzidos na via acetato (equação 11), consumidos na via propionato (equação 12) e não foram requeridos para a formação de ácido butírico (equação 13); além da produção de 2 mols de H_2 / mol de glicose (reações 11, 12 e 13).

A limitação principal para produção elevada de H_2 é o efeito inibitório que a pressão parcial de H_2 pode causar. Nesse modelo, como as concentrações de H_2 dissolvido no meio líquido aumentaram, a transferência de elétrons da molécula de glicose para H_2 tornou-se desfavorável.

Diversos estudos (Ni *et al.*, 2006; Van Ginkel *et al.*, 2005; Kim *et al.* 2006) têm apresentado que a produtividade de hidrogênio pode ser aumentada em culturas contínuas pela redução da pressão parcial de H_2 no reator. Três maneiras principais podem ser utilizadas para inibir o aumento da pressão parcial de H_2 , como descrito a seguir:

- (1) Aspergir gás N_2 no meio líquido para evitar *stripping* de hidrogênio;
- (2) Manter sistema de vácuo no *headspace*, que diminui a pressão parcial de gás no sistema e;
- (3) Reduzir a velocidade de produção de H_2 , permitindo *stripping* mais eficiente de H_2 da fase líquida por agitação.

Diversos compostos como glicose, isômeros de hexoses e polímeros na forma de amido ou celulose apresentam diferentes rendimentos de hidrogênio por mol de substrato orgânico, dependendo da rota fermentativa e dos produtos finais. A Tabela 3.1 descreve as seguintes rotas de degradação da glicose, sacarose (Khanal *et al.*, 2004) ou xilose que podem

ocorrer em processos fermentativos de produção de gás hidrogênio: (1) consumo do açúcar e geração de ácido acético e (2) consumo do açúcar e geração de ácido butírico.

Tabela 3.1 Rendimento máximo de açúcar a hidrogênio em processos fermentativos

Açúcar	Rota Metabólica	mol H₂/mol açúcar
Glicose	$C_6H_{12}O_6 + 2 H_2O \rightarrow 2 CH_3COOH + 4H_2 + 2 CO_2$	4
	$C_6H_{12}O_6 + 2 H_2O \rightarrow CH_2CH_2CH_2COOH + 2H_2 + 2 CO_2$	2
Sacarose	$C_{12}H_{22}O_{11} + 5 H_2O \rightarrow 4 CH_3COOH + 4 CO_2 + 8 H_2$	8
	$C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O \rightarrow 2 CH_3CH_2CH_2COOH + 4 CO_2 + 4H_2$	4
Xilose	$C_5H_{10}O_5 + 3 H_2O \rightarrow CH_3COOH + 3 CO_2 + 6 H_2$	6
	$C_5H_{10}O_5 + 2 H_2O \rightarrow \frac{1}{2} CH_3CH_2CH_2COOH + 3 CO_2 + 5H_2$	5

Quando ácido acético for o produto final o rendimento teórico máximo obtido será de 4 mols de hidrogênio por mol de glicose, 8 mols de hidrogênio por mol de sacarose e 6 mols de hidrogênio por mol de xilose. Quando butirato for o produto final, o rendimento teórico máximo obtido será de 2 mols de hidrogênio por mol de glicose, 4 mols de hidrogênio por mol de sacarose e 5 mols de hidrogênio por mol de xilose.

A maior produção teórica de hidrogênio prevê ácido acético como produto final da fermentação (Das & Veziroglu, 2001). Na prática, porém, a produção elevada de hidrogênio está associada com uma mistura dos produtos da fermentação, tais como, ácido acético e ácido butírico, enquanto que baixa produção de hidrogênio está associada à formação de ácido propiônico e produtos finais menos reduzidos como álcoois e ácido láctico (Levin *et al.*, 2004).

A sacarose (C₁₂H₂₂O₁₁) é um dissacarídeo que pode ser extraído de vegetais como cana de açúcar (*Sacharum officinarum*) e beterraba (*Beta vulgaris*). De acordo com APHA (2005) tem em sua formação uma molécula de glicose e uma de frutose, como ilustrado na Figura 3.1.

Figura 3.1 Estrutura Molecular da Sacarose

A sacarose pode ser fermentada; entretanto resiste a decomposição microbiana em concentrações elevadas.

Águas residuárias de indústrias de refrigerantes têm esse açúcar em sua constituição e podem estar no efluente das máquinas lavadoras de garrafas, da xaroparia, da lavagem de pisos e máquinas e no esgoto sanitário. A Tabela 3.2 fornece a constituição de despejo bruto de uma indústria de refrigerantes analisada pela CETESB.

Tabela 3.2 Caracterização do despejo bruto de uma indústria de refrigerantes (amostras compostas)

Parâmetros	Média	Varição
DBO (mg/L)	1188	940 – 1335
DQO (mg/L)	2149	1616 – 3434
Resíduo Total (mg/L)	2003	1704 – 2210
Resíduo Volátil (mg/L)	1532	1292 – 1724
Resíduo Não Filtrável (mg/L)	602	351 – 759
Resíduo Não Filtrável Vol. (mg/L)	495	236 – 655
Nitrogênio NTK Total (mg/L)	34,6	22 – 49
Nitrato (mg/L)	< 2,0	< 2,0
Nitrito (mg/L)	0,16	0,05 – 0,40
Fosfato Total (mg/L)	6,68	4,0 – 13
Surfactantes (mg/L)	0,45	0,22 – 0,80
Óleos e Graxas (mg/L)	87	69 – 115
pH	10,2	8,0 – 12,3
Temperatura (°C)	32,0	28 – 35

Fonte: CETESB “Levantamento dos Despejos de Indústria de Refrigerantes no Estado de São Paulo (1985)”

Fan *et al.* (2004) obtiveram produção biológica de hidrogênio em reatores alimentados com sacarose. A fonte de inóculo foi proveniente de estrume de gado do subúrbio de Zhengzhou, China. Os autores efetuaram choque térmico em 100 g de inóculo (100-105 °C, por 2 h) com objetivo de inibir microrganismos consumidores de hidrogênio e favorecer a formação de endósporos de bactérias que produzem esse gás.

Os autores (Op.cit.) realizaram experimentos em reatores montados em batelada (frascos de 100 mL), a 36 ± 1 °C e agitação de 150 rpm com concentrações iniciais de sacarose e pH que variaram respectivamente, de 2, 3, 4, 5 e 6 g sacarose/L e 4,5; 5,0; 5,5; 6,0 e 6,5.

Nesse estudo, o processo de produção biológica de H₂ a partir da sacarose com inóculo pré-tratado a quente ocorreu em quatro etapas: período *lag*, período preliminar de produção de H₂; período de produção de H₂ ininterrupta e período de decaimento. As porcentagens de H₂ produzidas nos reatores alimentados com 6 g/L de sacarose foram analisadas com relação ao tempo de incubação. Foi observado que a fase *lag* teve a duração de 20 h, iniciando-se, a seguir, produção de hidrogênio, atingindo valores máximos de 61% com 110 h de operação. Após, 200 h de operação, a sacarose foi consumida totalmente e a produção de hidrogênio teve redução.

Nos reatores alimentados com 5 g sacarose/L, pH inicial 6,0 e 250 h de operação foram obtidos os resultados, conforme descritos a seguir. A geração dos produtos intermediários, em concentrações máximas, foi de: ácido acético (791 mg/L), ácido propiônico (585 mg/L), ácido butírico (668 mg/L) e etanol (515 mg/L). No entanto, a geração dos ácidos ocorreu quando o pH reduziu de 6,0 para 5,2 no período de 27 a 63 h. Etanol foi formado a partir de 50 h de operação. A produção de hidrogênio foi interrompida a partir de 250 h de operação quando ácido propiônico foi consumido, enquanto o ácido acético e o ácido butírico não foram mais detectados no reator. Esse fenômeno foi explicado porque a produção de hidrogênio foi requerida para geração de álcoois e, portanto, foi mantida a pressão parcial positiva. As concentrações de ácidos voláteis gerados foram reduzidas quando etanol foi o produto principal do metabolismo da fermentação por espécies de *Clostridium* (Fan *et al.*, 2004).

Os resultados revelaram que variações de pH e de concentrações iniciais de sacarose afetaram a produção cumulativa de H₂. Os rendimentos máximos foram de 90 mL H₂/g de sacarose e 5,5 mL H₂/h de produção de hidrogênio. Tais resultados ocorreram para valores de pH de $5,4\pm 0,2$ e concentrações de sacarose de $4,0\pm 0,5$ g/L.

Os autores (Op. cit.) observaram que o tratamento a quente e o meio nutricional usado estimularam e enriqueceram populações de *Clostridium* produtoras de hidrogênio e

inativaram espécies não formadoras de endósporos, consumidoras desse gás. Os resultados experimentais demonstraram que os microrganismos advindos do inóculo tiveram função metabólica similar a espécies de *Clostridium*. Esse fato revelou que o inóculo pré-tratado a quente, advindo do meio ambiente, possuiu capacidade elevada para degradar carboidratos e gerar gás hidrogênio.

Khanal *et al.* (2004) estudaram produção biológica de hidrogênio em reatores em batelada de 250 mL, com inóculo proveniente de composteira da Universidade do Estado de Iowa (EUA) para valores iniciais de pH de 4,5; 5,0; 5,5; 6,0 e 6,5. Foram testados separadamente 2 substratos: sacarose (150 g/L) e amido (150 g/L). Nos reatores foram adicionadas solução macro mineral e água destilada até preencher 150 mL do volume líquido. Os reatores foram mantidos a 37 ± 1 °C e 180 rpm, sob atmosfera de N₂ para expulsar o oxigênio presente no *headspace*. Dois reatores controle foram montados sem adição de substrato.

Os melhores resultados ocorreram para valores de pH 4,5 tanto para os reatores alimentados com amido, quanto para sacarose. No entanto, nos reatores alimentados com sacarose foram obtidos valores superiores para os parâmetros analisados (Tabela 3.3). Os autores atribuíram esse fato à degradabilidade elevada da sacarose quando comparada ao amido (Khanal *et al.*, 2004).

Tabela 3.3 Produção acumulativa de hidrogênio (P), produção específica potencial de hidrogênio (P_s) e duração da fase lag (λ) nos reatores alimentados com sacarose e amido para variações de pH

Reator	pH	P (mL)	P _s (mL H ₂ /g DQO)	λ (horas)
Sacarose	4,5	350	214	20
	5,0	330	190	14
	5,5	325	170	14,2
	6,0	280	160	14,3
	6,5	250	150	15,1
Amido	4,5	230	125	23
	5,0	190	110	19
	5,5	180	100	19
	6,0	140	90	18
	6,5	110	60	17,8

Fonte: Khanal *et al.* (2004)

A equação de Gompertz modificada (14) foi usada para medir a curva de produção acumulativa de hidrogênio (H) (mL) para cada reator, com produção potencial de hidrogênio (P) (mL), produção de hidrogênio (R) (h) e duração da fase *lag* (λ) (h), produção máxima de hidrogênio (R_m) (mL/h), tempo de incubação (t) e ε exponencial (l) = 2,718.

$$H = P \exp . \left\{ - \exp \left[(R_m^\varepsilon / P) (\lambda - l) + l \right] \right\} \quad (14)$$

As produções específicas máximas de hidrogênio (R_s) foram obtidas pela divisão dos valores da produção máxima de hidrogênio (R_m) pela biomassa correspondente (SSV) em cada reator. Os resultados de R_m , tanto para reatores alimentados com sacarose quanto amido, ocorreu para valores de pH de 5,5 a 5,7.

A produção de hidrogênio foi acompanhada pela geração de ácidos e demais produtos intermediários. Os ácidos detectados, em maior quantidade, foram propiônico, acético e butírico. No entanto, foram detectadas maiores quantidades de ácido propiônico do que ácido acético e ácido butírico. Esses resultados sugeriram que, não somente *Clostridium butiricum* foi responsável pela produção de hidrogênio nos reatores, mas também outras espécies de *Clostridium* produtoras de ácido propiônico, tais como, *C. articum*, *C. novyi* e *C. propionicum*. Esse fato comprovou que consórcios de bactérias estiveram envolvidos na produção de hidrogênio.

Zhang *et al.* (2005) investigaram a produção biológica de hidrogênio em reatores em batelada, alimentados com sacarose e culturas mistas pré-tratadas a quente, com adição de FeSO_4 . Inicialmente, a cultura bacteriana foi enriquecida com cereais triturados que foram secos em estufa por 2,30 h com objetivo de inibir a atividade dos microrganismos consumidores de H_2 . Esse inóculo foi usado na operação de um reator de mistura completa e fluxo contínuo (CSTR), de 1 L de volume, alimentado com sacarose com TDH de 24 h a 35 C. Os microrganismos responsáveis pela produção de H_2 foram semelhantes a *Clostridium pasteurianum*. O volume de 500 mL do inóculo foi transferido para meio nutricional (1L), acrescido de 11,1 g de sacarose e solução macro mineral. Após crescimento microbiano de 30 dias esse inóculo foi utilizado nos demais experimentos. Os experimentos foram montados em reatores em batelada (120 mL) com volume líquido de 80 mL contendo: 20 mL de meio nutricional, 40 mL de inóculo e 20 mg de solução de FeSO_4 (com concentrações que variaram de 0 a 20g/L), a 35 C, pH inicial entre 7,4 e 7,6, sob agitação de 120 rpm. O *headspace* foi preenchido com Argônio para manter as condições de anaerobiose. O meio nutricional

continha sacarose, triptona e solução macro mineral. Foram montados reatores controle, sem adição de FeSO_4 , nas mesmas condições de pH, temperatura e meio nutricional.

Segundo os autores (Op. Cit.) as proporções de H_2 e CO_2 no *headspace* variaram de 35% a 54% e 46% a 65%, respectivamente. A porcentagem máxima de H_2 (54%) ocorreu para concentrações de 0,4g FeSO_4/L . Os valores finais de pH foram próximos de 4,6. O rendimento máximo gerado de H_2 (0,24 g) ocorreu com 48 h de operação e 1,6g FeSO_4/L . Para concentrações elevadas de 3,0, 4,0 e 5,0 g de FeSO_4 foram gerados rendimentos de H_2 de respectivamente 0,17, 0,19 e 0,21 g. Os produtos intermediários da fermentação da sacarose nos reatores controle foram ácidos acético (174,9 g/g sacarose), butírico (134,7 g/g sacarose) e propiônico (16,2 g/g sacarose). Os reatores alimentados com FeSO_4 tiveram rendimentos máximos de ácidos acético (181,2 mg / g sacarose), propiônico (33,1 mg/g sacarose) e butírico (241,9 mg/g sacarose) para concentrações de 0,001, 0,8 e 0,8 g FeSO_4/L , respectivamente.

Houve crescimento da biomassa com aumento nas concentrações de FeSO_4 . A concentração máxima atingida foi de 0,2202 g SSV/g sacarose para concentrações de 0,8 g FeSO_4/L . Segundo os autores (Op. cit.), o íon Fe foi indispensável para o crescimento microbiano e produção biológica de H_2 . No entanto, concentrações elevadas desse íon apresentaram-se tóxicas e inibiram a atividade microbiana com produções de hidrogênio reduzidas. Esse fato foi confirmado com o aumento da fase *lag* (17 a 22h) nos reatores operados com concentrações de respectivamente 3, 4 e 5 g FeSO_4/L e rendimentos de H_2 (2,02 a 2,39 mol H_2/mol sacarose) inferiores aos obtidos com reatores alimentados com variações de 0 a 1,6 g FeSO_4/L (1,94 a 2,73 mol H_2/mol sacarose) (Zhang *et al.*, 2005).

Van Ginkel *et al.* (2005) estudaram a elevação na produção biológica de hidrogênio com redução na carga orgânica aplicada. O inóculo (10 g) foi proveniente de amostra de solo agrícola que foi pré-tratado a quente (100 C por 2 h) para selecionar bactérias formadoras de endósporos que produzem hidrogênio, tais como, *Clostridium* ssp. Foram operados quatro reatores de mistura completa (quimiostato), a 30 °C para as concentrações de DQO devido à glicose em g/L: 10; 7,5; 5,0 e 2,5. Quatro tempos de detenção hidráulica diferentes foram testados: 10; 5; 2,5 e 1 h. A carga orgânica aplicada devido a glicose teve variação de 0,5 a 18,9 g DQO/h. Os reatores foram mantidos com 10 h de TDH e potencial de óxido-redução de -220mv. Os melhores rendimentos de produção de gás hidrogênio alcançados foram com 10 h de TDH e concentrações reduzidas de glicose conforme descrito a seguir: para 2,5 g DQO/L, 5,0 g DQO/L, 7,5 g DQO/L e 10 g DQO/L obteve-se, respectivamente rendimentos de 2,8 mol H_2/mol glicose; 2,5 mol H_2/mol glicose; 2,4 mol H_2/mol glicose e 2,2 mol H_2/mol

glicose. As proporções de gás hidrogênio no *headspace* variaram de 60 a 72% para todas as condições estudadas. As remoções de glicose foram superiores a 90% em todos os experimentos e 97% para concentrações de glicose de 2,5 g DQO/L (Van Ginkel *et al.*, 2005).

Os autores (Op. cit.) concluíram que as variações das concentrações de glicose e TDH tiveram efeito importante no rendimento da produção de hidrogênio nos reatores. Os rendimentos das produções de H_2 foram inversamente proporcionais às cargas orgânicas aplicadas no experimento. Ou seja, os rendimentos de produção de H_2 elevaram-se de 1,7 para 2,8 mol H_2 /mol glicose quando as cargas orgânicas decresceram de 18,9 para 0,5 g glicose/h.

Os ácidos produzidos foram acético (5,5 a 21,2 mM) e butírico (6 a 24,8 mM) e a relação molar de ácido acético/ácido butírico (HAc/Hbut) foi de $0,86 \pm 0,14$. Acetona, etanol, propanol, butanol e ácido propiônico foram detectados para as variações de 7,5 a 10 g DQO glicose/L, porém as concentrações desses compostos foram inferiores a 20 mg/L (Van Ginkel *et al.*, 2005).

O maior rendimento de produção de hidrogênio (2,6 mol H_2 /mol glicose) ocorreu para baixas cargas orgânicas (2,5 g glicose/L). A razão para esse aumento no rendimento a baixas cargas orgânicas pareceu ser devido à inibição de produtos finais (ácidos e álcoois) por super saturação de H_2 no meio líquido. Esse experimento sugeriu a aplicação imediata da produção biológica de hidrogênio no pré-tratamento de águas residuárias com açúcares diluídos como glicose e sacarose (Van Ginkel *et al.*, 2005).

A xilose ou açúcar da madeira é uma pentose de cadeia linear constituída de 5 átomos de carbono incluindo um grupo funcional aldeído (Figura 3.2). Sua fórmula química é $C_5H_{10}O_5$ e tem massa molecular igual a 150,13 g/mol (APHA, 2005).

Figura 3.2 Fórmula estrutural da xilose

As seguintes rotas de degradação de xilose podem ocorrer em processos fermentativos de produção de gás hidrogênio: (1) consumo de xilose e geração de ácido acético e (2)

consumo de xilose e geração de ácido butírico, conforme descrito na Tabela 3.1. As conversões estequiométricas de xilose a gás hidrogênio são as seguintes: 1 mol de xilose origina 6 mols de H_2 , na rota de degradação a ácido acético. Entretanto, se a xilose for convertida a ácido butírico ocorre geração de 5 mols de H_2 . Na prática, porém, a geração de hidrogênio está associada com uma mistura dos produtos da fermentação; principalmente, ácido acético e ácido butírico e, a produção de H_2 baixa à formação de ácido propiônico e produtos finais menos reduzidos como álcoois, descritos anteriormente.

Ampla variedade de águas residuárias orgânicas advindas da agricultura, indústria de papel e celulose, além daquelas relacionadas com processamento de madeiras, pode conter xilose em sua constituição.

Outros açúcares como glicose e sacarose têm sido estudados largamente na produção fermentativa de gás hidrogênio por diversos autores. No entanto, a produção fermentativa de gás hidrogênio a partir de xilose tem poucos relatos (Lin *et al.*, 2006).

Lin *et al.* (2006) estudaram produção fermentativa de hidrogênio a partir da xilose, com inóculo pré-tratado a quente (100 °C durante 45 minutos). Foram selecionadas quatro fontes de lodo biológico: (1) lodo de esgoto doméstico, (2) lodo de destilarias, (3) lodo de indústria de alimentos e (4) lodo de indústria de papel. Os reatores em batelada foram mantidos em triplicata, com 125 mL de volume, sob atmosfera de argônio, operados em 120 h, com variação de pH de 5 a 8 em intervalos de 0,5 unidades, com temperatura de 35 ± 1 °C. Os reatores foram operados em período de 76 horas. O reator operado com lodo de esgoto doméstico, a pH inicial 7,0 e 35 °C apresentou os melhores rendimentos, os quais foram os seguintes: 1,17 mol H_2 /mol xilose, velocidade de produção máxima de hidrogênio de 11,3 mL H_2 /h, com 46% de H_2 na composição do *headspace* e remoção de 68% de xilose ao final de 120 h de operação.

Segundo Lin *et al.* (2006), a produção de hidrogênio para os diferentes lodos foi a seguinte: 164 mL para inóculo do esgoto doméstico, 144 mL para a destilaria, , 88 mL para a indústria de alimentos e 33 mL para a indústria de papel. Esses resultados indicaram que a produção de gás hidrogênio e tempo de adaptação foram relacionados diretamente com a origem do inóculo. O inóculo obtido do lodo de esgoto doméstico foi uma fonte ótima para produção fermentativa do hidrogênio a partir da xilose.

Análises de biologia molecular foram feitas para os reatores alimentados com os 4 inóculos. As bandas apresentadas no DGGE foram recortadas e as espécies bacterianas sequenciadas como descrito a seguir. No lodo de esgoto foram identificadas células semelhantes a *Clostridium pasteurianum*; no de destilaria, *Klebsiella* sp. e *Streptococcus* sp. No

lodo proveniente da indústria de alimentos, não foi possível a identificação celular. No lodo obtido da indústria de papel foram identificadas bactérias semelhantes a *Clostridium*, muito citadas como eficientes na produção de H_2 , mas com pouco sucesso neste caso (Lin *et al.*, 2006).

Lin *et al.* (2008) verificaram a geração de H_2 em reatores anaeróbios (quimiostatos), com 4 L de volume e variação de temperatura de 30 a 55 °C em intervalos de 5 °C. O inóculo adveio de tanque de sedimentação da unidade de tratamento de esgoto municipal, pré-tratado à quente (100 °C durante 45 minutos). O reator foi operado a pH 7,1 e tempo de detenção hidráulica de 12h durante períodos próximos de 30 dias, até atingir o estado permanente, com 20 g DQO xilose/L. Os melhores resultados foram obtidos para temperaturas de 50 °C com rendimentos de 1,3 mol H_2 /mol xilose, $38,3 \pm 5,1$ % de H_2 no biogás e consumo de $74,6 \pm 7,5$ % de xilose. Ácido butírico (55%) foi o principal produto intermediário da degradação da xilose para a condição termofílica (55 °C) e etanol (34,6%) para a condição mesofílica. Sob temperaturas de 35 °C foram obtidos rendimentos de 0,7 mol H_2 /mol xilose, $7,2 \pm 1,1$ % de H_2 no biogás e consumo de $69,8 \pm 5,0$ % de xilose.

Segundo os autores (Op.cit) elevada produção de H_2 é comumente verificada para condições termofílicas. Foi efetuado DGGE para operação a 35 °C e 40 °C. Os resultados do sequenciamento das bandas revelaram que espécies de *Clostridium* foram identificadas para ambas as condições operacionais. Para a condição operacional de 35 °C foram identificadas espécies de *Clostridium intestinale*, e *Klebsiella pneumoniae*. Com operação mantida a 40 °C foram identificadas espécies de *C. sulfatireducens*, bactéria produtora de ácido butírico, e *Bacillus* sp.

3.2 Microrganismos Envolvidos na Produção de Hidrogênio

Os diversos microrganismos que participam na produção de hidrogênio podem ser classificados em quatro grupos: anaeróbios estritos, anaeróbios facultativos, aeróbios e fototróficos (Fang *et al.*, 2006), por exemplo, algas verdes, cianobactérias, bactérias fototróficas e bactérias fermentativas. As principais bactérias fermentativas conhecidas para produção de hidrogênio incluem espécies de *Enterobacter*, *Bacillus* e *Clostridium* (Kawagoshi, 2005).

A maioria dos trabalhos descreve, como responsáveis pela produção anaeróbia do hidrogênio, espécies de *Clostridium*, conhecidos também como microrganismos acidofílicos, ou seja, vivem em pH próximo de 4,0 (Fang *et al.*, 2006) e são Gram-positivos.

As principais bactérias produtoras de hidrogênio, quando submetidas em condição ambiental adversa, como tratamento a quente, formam endósporos. Essa formação ocorre principalmente em espécies de *Bacillus* e *Clostridium*. Os endósporos se desenvolvem no interior da célula procariótica, em determinadas posições e tamanhos, e serve de característica para seleção das bactérias Gram-positivas. As bactérias que formam endósporos geralmente o fazem durante a fase estacionária, em resposta a sinais ambientais como variações bruscas de temperatura, escassez de alimento e presença de tóxicos, dentre outras. O endósporo contém íons cálcio e ácido dipicolínico em sua composição, os quais provavelmente contribuem para sua natureza resistente (Black, 1999), necessitando de coloração especial para sua constatação. Uma vez colorido é de difícil descoloração.

Técnicas de Microbiologia Clássica, como Coloração de Gram e de Endósporos, podem auxiliar na caracterização da comunidade microbiana responsável pela produção de gás hidrogênio.

Na Tabela 3.4 estão descritas as principais bactérias fermentativas envolvidas na produção de hidrogênio em processos biológicos.

Tabela 3.4 Bactérias fermentativas utilizadas na produção de gás hidrogênio

Classificação	Espécies
Bactérias fermentativas	<i>Enterobacter aerogenes</i>
	<i>Enterobacter cloacae</i>
	<i>Clostridium acetobutyricum</i>
	<i>Clostridium butyricum</i>
	<i>Clostridium butylicum</i>
	<i>Clostridium Khuyveri</i>
	<i>Clostridium pasteurianum</i>
	<i>Desulfovibrio vulgaris</i>
	<i>Megashaera elsdenii</i>
	<i>Citrobacter intermedius</i>
	<i>Escherichia coli</i>

Fonte: Das & Veziroglu (2001), Fang *et al.*(2006)

Diversos microrganismos anaeróbios necessitam, em seu meio de cultivo, de nutrientes para crescer e fermentar substratos orgânicos para produzir H₂. Os principais compostos complexos usados são: peptona, triptona, polipeptona, extrato de levedura, soluções de vitaminas, dentre outros.

Microorganismos anaeróbios podem fermentar substratos orgânicos e produzir hidrogênio. Na Tabela 3.5 estão relacionados os principais microrganismos fermentativos produtores de hidrogênio utilizados em processos biológicos, com diferentes substratos e produtos finais.

Vários parâmetros podem influenciar na quantidade produzida de gás hidrogênio nos processos biológicos, tais como, pH, temperatura, substrato, intensidade luminosa, composição do inóculo, configuração do reator, características do meio-suporte, etc.

Na Tabela 3.6 encontra-se comparação referente a produção de hidrogênio para diferentes microrganismos e substratos envolvidos, condição da cultura e tempo de detenção hidráulica.

Tabela 3.5 Produção de hidrogênio em processos biológicos por bactérias fermentativas

Bactérias Fermentativas	Substrato	H ₂ produzido (mmol H ₂ /g cél. seca)	Produtos finais
Anaeróbias estritas <i>Clostridium butyricum</i>	Meio com glicose	7,3	H ₂ , CO ₂ , concentrações elevadas de ácidos orgânicos, biomassa
Anaeróbias facultativas <i>Citrobacter intermedius</i>	Celulose, amido, glicose	9,5	H ₂ , CO ₂ , concentrações elevadas de ácidos orgânicos, biomassa
<i>C. freundii</i>	Vinhaça	1,8	H ₂ , CO ₂ , concentrações elevadas de ácidos orgânicos, biomassa
<i>Enterobacter aerogenes</i> E82005	Cana-de-açúcar	17	H ₂ , CO ₂ , concentrações elevadas de ácidos orgânicos, biomassa
<i>Enterobacter cloacae</i> IIT BT-08	Meio com sacarose	29,63	H ₂ , CO ₂ , concentrações elevadas de ácidos orgânicos, biomassa

Fonte: Das & Veziroglu (2001)

Tabela 3.6 Comparação da produção de hidrogênio em culturas contínuas por bactérias anaeróbias

Microrganismo	Substrato	Condição da cultura	Tempo de detenção hidráulica	Rendimento (mol H₂/mol glicose)
<i>Clostridium butyricum</i> SC-E1	Glicose 10g/L	À pressão atmosférica a vácuo	8 h	1,4 – 2,0
			8 h	1,3 – 2,2
<i>Enterobacter aerogenes</i> E82005	Melaço cana de açúcar 2%	Contínuo	3 h	0,81
		Células suspensas	5 h	1,10
		Células imobilizadas	-	1,24
<i>Bacillus licheniformis</i>	Glicose 30 g/L	Células imobilizadas em leite de alginato	72 h	1,50
Enriquecimento anaeróbio	Sacarose 11 g/L	TDH ótimo	3 - 24 h	1,35
			6 h	1,59

Fonte: Kataoka *et al.* (1997)

Kataoka *et al.* (1997) estudaram a formação de ácidos orgânicos e produção de hidrogênio por bactéria anaeróbia, *Clostridium butyricum* SC-E1, em sistemas sob pressão ambiente e vácuo. As culturas foram inoculadas em reatores anaeróbios de 1040 mL de volume, com 600 mL de meio contendo a mistura de glicose e polipeptona como substratos, nas concentrações de 5,0 g/L e 10,0 g/L, pH 6,7; com 8 horas de tempo de detenção hidráulica, a 30 °C, em duplicata. Foram realizadas quatro séries de experimentos com culturas mantidas por 400 horas, tais como descritos a seguir: (1) 5,0 g/L glicose-polipeptona com operação à pressão atmosférica; (2) 10,0 g/L glicose-polipeptona com operação à pressão atmosférica; (3) 5,0 g/L glicose-polipeptona com operação a vácuo e; (4) 10,0 g/L glicose-polipeptona com operação a vácuo. Em todos os experimentos ocorreu consumo de 95% a 98% das concentrações iniciais de glicose.

Os experimentos (1) e (3) apresentaram os maiores rendimentos, ou seja, 1,8 a 2,3 mols H₂/ mol glicose, respectivamente. Os experimentos (2) e (4) apresentaram os menores rendimentos; ou seja, 1,4 a 2,0 mols H₂/ mol glicose, respectivamente. Destaca-se que a relação estequiométrica teórica da produção do hidrogênio na fermentação da glicose é 4 mols H₂/ mol glicose.

Segundo os autores (Op. cit.) as produções de ácidos orgânicos não apresentaram diferenças entre os quatro sistemas estudados. Os sistemas a vácuo e à pressão atmosférica apresentaram rendimentos de aproximadamente 2,0 mols H₂/mol glicose, sendo, portanto 50% menores que os valores estequiométricos. Os produtos da fermentação da glicose-polipeptona,

além do hidrogênio e dióxido de carbono, foram os seguintes: ácido fórmico, ácido acético, ácido láctico, ácido *n*-butírico e etanol.

Ueno *et al.* (2001) utilizaram inóculo de lodo de aeração forçada (15 g) em quimiostato de 5 L de volume e 3 L de meio basal com extrato de levedura, peptona e celulose em pó (10,0 g/L), sob agitação de 200 rpm, a 60 °C, pH de 6,4 e fluxo de gás argônio para manter as condições de anaerobiose. Os reatores foram mantidos em batelada durante o período inicial, que foi de três dias. Após esse período, foi obedecido regime de escoamento contínuo. Os reatores foram operados durante 12 dias. Os resultados da degradação ocorrida nos reatores estão descritos na Tabela 3.7. A produção do gás hidrogênio ocorreu após 18 h de operação. A composição do gás foi 57% hidrogênio, 42% CO₂ e não foi detectado metano.

Tabela 3.7 Produtos da fermentação da celulose nos reatores anaeróbios

Condição	Fonte de nitrogênio	Rendimento (mol/mol de hexose)						
		H ₂	CO ₂	Ácido Acético	Ácido Propiônico	Ácido Butírico	Etanol	Decomposição Celulose (%)
Batelada	NH ₄ Cl + Peptona	2,0	1,5	0,8	0,2	0,4	0,5	49,9
Quimiostato	NH ₄ Cl + Peptona	2,0	1,5	0,9	0,3	0,6	0,2	90,4
	NH ₄ Cl	1,0	0,4	0,5	-	0,3	0,5	72,5

Fonte: Ueno *et al.*, 2001

Para a condição de batelada, o pH teve variação de 6,6 a 5,2, com decomposição da celulose. Houve produção de ácidos e álcoois e o rendimento de H₂ foi de 2,0 mol H₂/mol de celulose (Ueno *et al.*, 2001).

Na condição de fluxo contínuo (quimiostatos) o pH foi mantido em 6,4. Ocorreu formação de ácidos e álcoois, porém, em proporções diferentes (Tabela 3.7). A formação de ácido propiônico aumentou, enquanto, a de ácido butírico diminuiu. A decomposição da celulose também apresentou alteração. Ocorreram 90,4% de decomposição no quimiostato alimentado com cloreto de amônio acrescido de peptona. O quimiostato que foi alimentado sem peptona teve rendimento reduzido (1,0 mol H₂/mol celulose), com redução na formação de ácido acético e propiônico, enquanto que, a formação de etanol e ácido butírico permaneceu inalterada (Ueno *et al.*, 2001).

Carepo *et al.* (2002) realizaram estudo comparativo com espécies de microrganismos em relação à produção de gás hidrogênio. As espécies de bactérias avaliadas foram as

seguintes: *Desulfovibrio desulfuricans* NCIMB 8313, *Desulfovibrio vulgaris* e *Desulfovibrio gigas*. A produção de hidrogênio foi comparada durante o crescimento das três espécies bacterianas, sob diferentes condições: (1) sem limitação de sulfato (1,0–1,7 g/L) e lactato (1,1 g/L), (2) com limitação de sulfato, (3) em meio com piruvato (8,8 g/L)/sulfato e, (4) na presença de molibdato (20 mM). Os experimentos foram montados a 35 °C e pH de 7,2.

As três espécies de *Desulfovibrio* apresentaram diferenças em termos de produção de hidrogênio. *D. vulgaris* apresentou produção de hidrogênio elevada (90 $\mu\text{mol H}_2$ após 15 horas), explicada pela atividade específica da Fe-hidrogenase, presente nessa espécie. Foi obtida produção de hidrogênio baixa com as espécies *D. gigas* (0,3 $\mu\text{mol H}_2$ após 12 horas) e *D. desulfuricans* (1,4 $\mu\text{mol H}_2$ após 9 horas), respectivamente, embora estivessem presentes as enzimas NiFe-hidrogenase e NiFeSe-hidrogenase. A habilidade de espécies de *Desulfovibrio* para produzir hidrogênio mostrou que esses microrganismos possuem rápida capacidade adaptativa em resposta a mudanças ambientais. A atividade da hidrogenase pode ser recurso importante para células quando crescem em ambientes contendo doadores ou receptores de elétrons (Carepo *et al.*, 2002).

Wu *et al.* (2002) utilizaram esgoto sanitário previamente acidificado em pH inicial de 6,8; temperatura de 35 °C, com 33280 mg/L de sólidos suspensos voláteis (SSV) e 65130 mg/L de sólidos totais voláteis (STV), em reatores em batelada, para produzir hidrogênio, em condições anaeróbias. Foi acrescido meio nutriente com 20 g DQO/L de sacarose. Os seguintes suportes foram utilizados para imobilização de células microbianas: carvão ativado, poliuretano e látex acrílico com silicone. Os autores observaram que a produção de hidrogênio foi mais eficiente em sistemas de células imobilizadas do que em células suspensas. Em ambos os casos, os metabólitos predominantes foram os ácidos butírico e acético. Células imobilizadas com carvão ativado apresentaram maior eficiência na produção de hidrogênio (380 mL H_2 após 1 h de operação), seguidas, respectivamente, por células crescidas em poliuretano (340 mL H_2 após 1 h de operação) e em látex acrílico com silicone (190 mL H_2 após 58 h de operação).

Chen *et al.* (2003) observaram produção de hidrogênio em reator de mistura completa e escoamento contínuo (CSTR), utilizando 20 g DQO/L de sacarose como substrato. O lodo utilizado como inóculo foi obtido de tanque de aeração do tratamento de esgoto municipal, com pH 6,8; 33280 mg/L SSV e 65130 mg/L de STV. O tempo de detenção hidráulica (TDH) inicial foi de 20 dias para adaptação do inóculo. Foram monitorados: pH, alcalinidade, produção de ácidos orgânicos, volume e composição do gás e concentração de sólidos para TDH de 13,3; 10; 8; 6; 5; 4; 3; e 2 horas. Durante o período contínuo de operação (TDH 13,3

a 2 h) as concentrações de SSV decresceram de 2500 mg/L a 1010 mg/L. Os produtos da digestão anaeróbia foram os ácidos: acético (820 – 2130 mg DQO/L), propiônico (40 – 630 mg DQO/L) e butírico (3890 – 7640 mg DQO/L) e etanol (370 – 1580 mg DQO/L).

Os autores (Op. cit.) verificaram que as concentrações de ácido butírico foram as mais elevadas e, portanto, supuseram que a fermentação foi, preferencialmente, por essa via metabólica. *Clostridium* sp. foi considerada a espécie dominante no reator e responsável pela produção do ácido butírico. A produção de hidrogênio aumentou de 4,9 para 26,9 L H₂/dia quando TDH passou de 13,3 h para 3 h, porém diminuiu para 20,8 L H₂/dia quando TDH era de 2 h. Sob condições estáveis os rendimentos variaram, respectivamente, de 1,42 a 4,52 mols de H₂/mol de sacarose e velocidade de produção específica de hidrogênio variou de 78 a 841 mmol H₂/g SSV.dia.

Oh *et al.* (2003) estudaram os efeitos combinados de controle de pH e procedimentos de tratamento à quente do inóculo na produção biológica de hidrogênio em reatores contínuos com fase gasosa, em duplicata. Lodo de digestor anaeróbio foi utilizado como inóculo e meio nutriente com glicose (3000 mg DQO/L) como substrato, e atmosfera de nitrogênio. A faixa de pH variou de 6,2 a 7,5, a 25±1 °C. Os choques térmicos foram programados do seguinte modo: 60 °C por 2 minutos, aumentando gradativamente, à proporção de 5 °C/minuto, até 140 °C, mantida por 6 minutos. Foram montados também reatores controle; sem pré-tratamento à quente do inóculo. Após a fase de adaptação, que foi de 18 horas, a glicose foi convertida completamente, com rendimentos de 4 mols H₂/mol glicose. Em todos os reatores a produção do biogás cessou após 30 h de operação. Ácidos orgânicos voláteis foram produzidos: acético (3,4% a 24,1%), butírico (6,4% a 29,4%), propiônico (0,3% a 12,8%); além de etanol (15,4% a 28,8%) e pequenas quantidades de acetona, propanol e butanol. Porcentagens elevadas de hidrogênio foram produzidas (57% a 72%) e pré-tratamentos à quente do inóculo em pH 6,2 e 7,5 produziram maior quantidade de hidrogênio do que nos reatores controle, mesmo em pH 6,2. O tratamento à quente eliminou a produção de metano.

Zhang *et al.* (2006) inocularam cultura pura de *Clostridium acetobutyricum* ATCC824, em reator fluidizado, com coluna não saturada, preenchido com pérolas de vidro, para medir a produção biológica do gás hidrogênio. As células cresceram em anaerobiose, em meio com glicose (1 g/L) e pH 6,2. As células utilizadas para inocular o reator foram retiradas durante a fase de crescimento exponencial em densidade óptica de 600 nm (DO₆₀₀=0,2). A coluna não saturada do reator, utilizada para os estudos de produção de H₂, foi desenvolvida por modificações no fluxo de gás de um reator de biofilme anaeróbio, para transferir a fase gasosa dentro do biofilme. O reator com volume de 0,123 L foi preenchido com pérolas de

vidro previamente autoclavadas (3 mm de diâmetro), em fluxo de N₂ (100%) durante 30 segundos, para remover o oxigênio presente e inoculado com 70 mL (DO₆₀₀ = 0,2) de células de *Clostridium acetobutyricum*. A operação do reator ocorreu à temperatura de 30 °C, com quatro concentrações diferentes de glicose: 1,0; 3,3; 4,5 e; 10,5 g/L. Nas concentrações de 10,5 g/L de glicose foram obtidos os melhores resultados: 22% de eficiência de conversão de H₂, velocidade de produção molar de H₂ de 8,9±0,8 mmol/L.h e velocidade de produção volumétrica de H₂ de 220±8 mL/L.h. Os produtos de fermentação foram ácidos acético e butírico. Os resultados revelaram que essa configuração de reator pode ser aplicada para tratamento de águas residuárias contendo concentrações elevadas de carboidratos, com produção de gás hidrogênio.

3.3 Caracterização Microbiana por Técnicas Tradicionais e de Biologia Molecular

Ueno *et al.* 2001 investigaram a comunidade microbiana presente em quimiostato, com meio basal (extrato de levedura, peptona e 10,0 g/L celulose em pó), sob agitação de 200 rpm, a 60 °C, pH de 6,4 e inóculo de lodo de aeração forçada (15 g) por meio de técnicas de PCR e DGGE, com amplificação de fragmentos do gene RNA ribossomal 16S. As bandas dominantes foram recortadas e purificadas para determinar a sequência. Foram identificadas 15 bandas no experimento, conforme Tabela 3.8.

A bactéria denominada *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* foi identificada nos reatores enriquecidos com e sem peptona. Os microrganismos produtores de H₂ foram diferentes entre as condições de batelada e quimiostato. A diversidade microbiana foi menor nos quimiostatos. Com a estabilidade do pH nos quimiostatos os microrganismos que se adaptaram às condições impostas puderam crescer nesses reatores. Os demais microrganismos que não se adaptaram tiveram velocidade de crescimento insuficiente e não foram mantidos nos reatores. Para a condição de batelada sete espécies de microrganismos produtores de gás hidrogênio foram identificadas (Tabela 3.8).

A quantidade de ácido butírico formada foi maior para a condição em batelada do que nos quimiostatos, indicando que a diversidade microbiana presente também contribuiu para formação de gás H₂ a partir de celulose (Ueno *et al.*, 2001).

Tabela 3.8 Identificação de bactérias por meio do sequenciamento parcial do gene RNAr 16S proveniente de bandas de DGGE

Condição	Microrganismo	Similaridade (%)
Batelada (NH ₄ Cl + Peptona)	<i>Clostridium thermobutyricum</i>	99,8
	<i>Thermoanaerobacterium aotearoense</i>	98,2
	<i>Sulfobacillus dissulfodooxidans</i>	92,0
	<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>	97,8
	<i>Clostridium cylindrosporum</i>	98,3
	<i>Desulfotomaculum nigrificans</i>	99,2
	<i>Caloromator viterbienses</i>	91,1
Quimiostato (NH ₄ Cl + Peptona)	<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>	100,0
Quimiostato (NH ₄ Cl)	<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>	98,5
	<i>Thermobacterioides acetoethylicus</i>	100,0
	<i>Thermoanaerobacterium aotearoense</i>	99,2

Fonte: Ueno *et al.*, 2001

De acordo com os autores (Op.cit.), a produção biológica de gás hidrogênio a partir de celulose foi devida a consórcios de diversas espécies de bactérias que estiveram presentes nas condições estudadas.

Fang *et al.* (2001) estudaram a produção de hidrogênio com lodo granulado em reator anaeróbio alimentado com sacarose. O reator (fermentador de 3 L, com 1,7 L de volume reacional, mantido em agitação de 200 rpm) foi operado a 26 °C e TDH de 6 h, por 90 dias, sob fluxo de argônio (30 mL/min) e pH de 5,5. O inóculo foi originado de tanque de sedimentação secundário de unidade de tratamento de água residuária. As concentrações de sacarose variaram de 2,0 g/L a 12,5 g/L durante 20 dias e os níveis de carga orgânica mantidos foram de 48,6 g/L.dia.

O inóculo produtor de hidrogênio foi aglutinado, gradualmente, em grânulos que se tornaram visíveis a partir de 15 dias. Posteriormente, foram analisadas variações no diâmetro dos grânulos por meio de fotografias digitais. Após 60 dias foi atingida a estabilidade do sistema, quando foram efetuadas microscopias eletrônicas de varredura dos grânulos e de endósporos (Fang *et al.*, 2001).

Um total de 52 clones, selecionados da recuperação de plasmídios, foi classificado em 12 unidades taxonômicas operacionais (OTUs) baseadas no perfil de DGGE. O DNA das 6 OTUs principais foram seqüenciados e comparados com banco de dados do *Genbank* por meio do BLAST. As seqüências obtidas do RNAr 16S foram alinhadas com software CLUSTAL W e construção da árvore filogenética usando método *Neighbor-joining*. Foi

aplicado também método de *Bootstrap* com 500 replicatas para estimar a confiabilidade na topologia da árvore filogenética.

A produção de gás hidrogênio foi detectada a partir do segundo dia de operação (Fang *et al.*, 2001).

O inóculo apresentou coloração escura no início da operação devido à presença de bactérias redutoras de sulfato (BRS) nos reatores. A partir do sexto dia de operação a coloração do inóculo tornou-se mais clara. Essa alteração foi devido à redução nas concentrações de sulfato e consequente desaparecimento das BRS na água residuária sintética. O diâmetro dos grânulos aumentou rapidamente na fase inicial e, a partir de 60 dias tornaram-se constantes (1,3-1,9 mm), quando o sistema foi estabilizado. Nesse momento havia 20g/L de lodo granular e consumo de 97% de sacarose. A composição do efluente foi ácido butírico (49%), ácido acético (46%) e quantidades reduzidas de metanol, etanol, ácido propiônico, ácido isobutírico e butanol. A composição do biogás foi de H₂ (63%), CO₂ (35%) e N₂ (2%). Não foi detectado metano no biogás; indicando a ausência de atividade metanogênica no lodo granulado. Nessas condições, obteve-se rendimento de 0,28 L H₂/g sacarose e velocidade global específica de produção de hidrogênio de 0,7 L H₂/g SSV.dia. O rendimento do inóculo foi de 0,16 g SSV/g sacarose degradada (Fang *et al.* 2001).

Por meio de análises de microscopia foi possível observar a presença de bacilos fusiformes, cocos e endósporos, que são formas característica de algumas bactérias produtoras de gás hidrogênio (Fang *et al.*, 2001).

Trinta e seis clones (69,1%) foram afiliados com 4 espécies de *Clostridium* sp. da família *Clostridiaceae* e 7 clones (13,5%) com a espécie *Sporolactobacillus racemicus*, pertencente à família *Streptococcaceae*. Uma OTU (unidade taxonômica operacional) que compreendia 3 clones (5,8%) não tiveram relação filogenética (Fang *et al.*, 2001).

Cada grama de grânulo produtor de hidrogênio continha (em SSV) 179,1 mg de polímeros extracelulares, que incluíram 110,9 mg (61,9%) de carboidratos, 25,8 mg (14,4%) de proteínas, 15,1 mg (8,4%) substâncias húmicas, 5,5 mg (12,1%) de ácido urônico, 0,15 mg (0,1%) de DNA e 21,7 mg de substâncias não identificadas (possivelmente lipídeos e/ou fenóis). Nesse estudo foi verificado também que em cada grama de inóculo continha 13,8 mg de DNA, onde somente 1,1% foram detectados nos polímeros extracelulares extraídos.

A conversão teórica de cada grama de sacarose degradada foi de 0,57 L e 0,29 L para ácido acético e ácido butírico, respectivamente. Nesse estudo foram verificados rendimentos de 0,28 L H₂/g de sacarose (Fang *et al.*, 2001).

Fang *et al.* (2002) estudaram o efeito do pH na produção de hidrogênio, utilizando meio nutriente com glicose (7000 mg/L) e cultura mista de bactérias fermentativas. O experimento foi montado à temperatura de 36 °C, com 6 horas de TDH, com pH variando entre 4,0 a 7,0; em aumentos gradativos de 0,5; em período de 21 dias e 200 rpm de agitação. O reator foi mantido no escuro para evitar o crescimento de bactérias fototróficas. Foram efetuadas variações no pH e analisados: (1) consumo de glicose, (2) produção de biogás (H₂, CO₂ e CH₄), (3) rendimento de hidrogênio (mol H₂/mol glicose) e (4) velocidade de produção específica de hidrogênio (L/g SSV.dia). Em pH próximo de 5,5 ocorreram os maiores rendimentos de H₂ ($2,1 \pm 0,1$ mol H₂ / mol glicose) e velocidade de produção específica de $4,6 \pm 0,4$ L H₂/(g SSV.dia).

De acordo com a estequiometria, duas reações poderiam ter ocorrido: a primeira seria a conversão de um mol de glicose em ácido acético, produzindo 4 mols de hidrogênio, a segunda seria a conversão de um mol de glicose em ácido butírico produzindo dois mols de hidrogênio.

Os ácidos orgânicos no efluente foram, principalmente, acético (15,3% a 34,1%), butírico (31,2% a 45,6%) e pequenas quantidades de outros ácidos voláteis e álcoois. Com a variação de pH de 4,0 a 5,5 foi observado alteração na coloração das culturas microbianas e seu escurecimento foi observado com elevação do pH. Em pH ≥ 6 ocorreu aumento na atividade sulfetogênica e formação de precipitado escuro. A diversidade morfológica de microrganismos produtores de H₂ foi, em pH 4,5: bacilos, e para pH 5,5, bacilos e alguns diplobacilos. Foram efetuadas análises de DGGE em amostras de toda faixa de pH estudada. Ficou claro que a comunidade microbiana foi alterada em função do pH. O número de bandas aumentou com pH. O aumento do número de bandas com elevação do pH pode estar relacionado com a presença de arqueias metanogênicas, como evidenciado pelo aumento da produção de metano, para essa condição.

Wang *et al.* (2003) examinaram a produção de hidrogênio por meio do isolamento de *Clostridium bifermentans* de lodo usado no tratamento de esgoto sanitário. Cinco pré-tratamentos do inóculo foram examinados na produção de hidrogênio: (1) ultra-som, para rompimento celular; (2) acidificação, com adição de HClO₄ misturado ao inóculo por 10 minutos até atingir pH 3,0 e estocado a 4 °C por 6 h; (3) esterilização, com inóculo mantido em autoclave a 121 °C por 30 minutos; (4) congelamento e descongelamento, com inóculo submetido a -17 °C por 24 h, descongelado e mantido em banho térmico, a 25 °C durante 12 h e; (5) uso de inibidor metanogênico, pela adição de 2 bromoetanosulfonato de sódio (BESA - C₂H₄BrO₃SNa) ao inóculo. A água residuária original (sem aplicação de pré-tratamento) e

pré-tratada foi o substrato utilizado nos testes de fermentação do hidrogênio nas seguintes concentrações: 16,5 g/L de sólidos totais voláteis e 24,8 g/L de DQO. A amostra seca apresentou as proporções de 34,2% de carbono, 5,3% de hidrogênio e 5,5% de nitrogênio. O inóculo foi isolado e colonizado com meio basal clostridial por 72 h, com três repiques para enriquecimento celular, para incubação de colônias produtoras de hidrogênio.

As espécies foram testadas e microrganismos com velocidade elevada de produção de hidrogênio foram utilizados como inóculo. Essas espécies foram analisadas conforme descrito a seguir: extração de DNA, amplificação por PCR do DNAr 16S, enriquecimento dos produtos do PCR e sequenciamento. O exame das sequências de fragmentos do DNAr 16S demonstrou similaridade com *Clostridium bifermentans*. Os reatores foram preparados em frascos com 125 mL de volume, em anaerobiose, em triplicata, alimentados com 45 mL de substrato original ou pré-tratado misturado com 5 mL de suspensão de inóculo, vedados com tampa de butila e lacrados com alumínio e incubados a 35 °C, por 96 h. Os resultados obtidos demonstraram que os pré-tratamentos de congelamento e descongelamento (4) e; de esterilização (3); elevaram a produção específica do gás hidrogênio de 1,5 a 2,5 vezes em relação ao inóculo inicial, sem pré-tratamento, enquanto que a adição de inibidores da atividade metanogênica (5) e de ultrassom (1), reduziram a produção de hidrogênio (Wang *et al.*, 2003).

Ahn *et al.* (2005) empregaram métodos de Biologia molecular para investigar a comunidade microbiana de filtro biológico termofílico operado para produzir hidrogênio. O inóculo foi obtido de lodo de reator termofílico usado na produção de H₂ (0,72 g SSV/L e 49 mmol H₂/L.dia), em escala de bancada. O reator, inicialmente com fluxo de N₂ (100%), foi inoculado com lodo pré-tratado a quente, proveniente de água residuária de plantas, operado à temperatura entre 55 °C e 64 °C por 234 dias. As velocidades volumétricas máxima e de rendimentos de H₂ foram de 1050 ± 63 mmol H₂/L.dia e 1,11±0,12 mol H₂/mol glicose, respectivamente. A composição do biogás (v/v) foi H₂ (53±4%), CO₂ (47±4%), não sendo detectado gás metano. Ácidos orgânicos produzidos foram os seguintes: láctico, *n*-butírico e acético.

As análises de Biologia molecular da biomassa microbiana do reator foram feitas por PCR-DGGE. Foram identificadas duas bandas nas amostras do reator que não apareceram no inóculo e oito bandas no inóculo. Esse fato poderia estar relacionado ao longo tempo de operação do reator, favorecendo a mudança na composição da comunidade microbiana.

Posteriormente, foi efetuado o sequenciamento das bandas sendo algumas similares ao gênero *Clostridium*. Todavia a maioria das sequências se mostrou relacionada a *Bacillus*. As

bandas seqüenciadas presentes nas amostras do reator apresentaram similaridades elevadas com *Clostridiales* e a *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*.

Chen *et al.* (2005) estudaram a produção fermentativa de hidrogênio utilizando *Clostridium butyricum* CGS5, isolada do efluente de 5 reatores anaeróbios produtores de hidrogênio incluindo: de mistura completa, de leito fixo, de leito fluidizado e de lodo granular de reator com capacidade de produção de gás hidrogênio de 7,3 L H₂/L.h, alimentado com sacarose e esgoto sintético e reator de manta de lodo alimentado com esgoto doméstico. O inóculo foi pré-tratado a quente, a 80 °C, por 30 min. Posteriormente, foi diluído com água destilada e incubado em placas com meio basal e agar, sob condições anaeróbias, em jaras anaeróbias HP11, mantidas a 37 °C, pH inicial 7,5. Seis culturas puras foram obtidas e designadas como: CGS1, CGS2, CGS3, CGS4, CGS5 e CGS6. Essas bactérias cresceram em condições anaeróbias estritas (kit de geração de gás BR 38 Oxoid). Os exames de microscopia demonstraram presenças de endósporos e bacilos. A identificação bioquímica pelo método ANA II demonstrou que as seis espécies eram, cerca de 97,4%, similares entre si e pertencentes a *Clostridium* sp. De acordo com a análise filogenética do RNAr 16S seqüenciado desses grupos, foi concluído tratar-se de *Clostridium butyricum*.

As culturas crescidas em meio nutriente foram retiradas na fase exponencial de crescimento e então transferidas para 3 frascos de 250 mL, acrescidos de 200 mL de meio nutriente, com pH de 7,5 e mantidos a 37 °C, em anaerobiose. Os frascos continham composições diferentes de meio basal, denominados: PM, DM e DM1. O meio PM, não apresentou elementos traço de metais na sua composição. O meio DM1 diferiu do DM pela adição de 0,001 g/L de FeSO₄·7 H₂O. Os três frascos apresentaram crescimento microbiano, mas o frasco com meio DM1 foi mais eficiente na produção de hidrogênio (95 mL), seguido dos frascos com meio DM (18 mL) e PM (5 mL). Esses resultados demonstraram a necessidade do íon Fe⁺⁺ para os microrganismos produtores de hidrogênio presentes no frasco DM1. O íon Fe⁺⁺ é importante para a hidrogenase, enzima específica da produção de hidrogênio, em bactérias acidogênicas como *C. butyricum* (Chen *et al.*, 2005).

Posteriormente, foram montados reatores em batelada (5 L) contendo 30 mL da cultura CGS5, e meio DM1, para testes com e sem controle de pH, respectivamente, a 37°C. A variação de pH adotada foi 6,5, 6,0, 5,5 e 5,0 para concentração inicial de sacarose de 17,8 g/L (20 g/L de DQO). Os reatores operados a pH 5,5 obtiveram as melhores velocidades de produção de hidrogênio (2,78 mol H₂/mol sacarose). A velocidade de produção volumétrica máxima de hidrogênio (0,21 mL H₂/L.h) ocorreu para pH 6,0. Outra série do experimento teve pH controlado a 6,5 e as concentrações iniciais da sacarose variaram de 5,

10, 20 e 30 g/L de DQO, a 37 °C. Os resultados indicaram que o reator com 20 g de sacarose/L de DQO apresentou as melhores eficiências de produção de hidrogênio (99% de consumo de sacarose, produção de hidrogênio de 2,91 mol H₂/mol de sacarose, produção celular de 0,041 g cel/g sacarose, produção total de hidrogênio 5,46 L) quando comparado com os demais.

Kawagoshi *et al.* (2005) estudaram os efeitos relevantes do condicionamento do inóculo e variações no pH de uma comunidade bacteriana na produção de hidrogênio. Foram testadas seis fontes de inóculo: (1) lodo ativado aeróbio proveniente de unidade de tratamento de esgoto; (2) lodo de digestão anaeróbia; (3) solo de plantação de melancia; (4) solo de plantação de kiwi; (5) sedimento de lago e; (6) composto de resíduo aeróbio. Cada inóculo (2 g) foi utilizado para montagem dos reatores em batelada. Dois acondicionamentos do inóculo foram feitos: (1) tratamento a quente (aquecimento do inóculo a 100 °C por 2 h e (2) condicionamento de pH (o inóculo foi diluído em água destilada e o pH mantido em 3,0 por 18 h e, posteriormente, ajustado para 6,0). Os inóculos controle (sem tratamento) e com tratamento foram incubados em frascos com 100 mL de volume líquido, alimentados com 2g/L de glicose e meio basal pH 6, sob atmosfera de argônio (100%), por 5 minutos. As culturas foram incubadas e controladas a 35°C e mantidas sob agitação com agitador magnético.

Posteriormente, as culturas foram repicadas e acondicionadas em reatores em batelada, de 600 mL de volume, contendo 6g/L de glicose e 8,0 g/L de SSV. Foram preparadas 9 séries de culturas para examinar o efeito do pH: seis culturas foram mantidas em pH 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0 e sem controle de pH e três, seladas e mantidas em tubos de vidro. As culturas foram mantidas a 35 °C, sob agitação de 3000 rpm por 20 minutos e 150 mL do sobrenadante foi removido, após 7 dias de incubação.

A produção de hidrogênio foi mais elevada com o inóculo (2), proveniente de digestão anaeróbia pré-tratado a quente (1,4 mol H₂/mol de glicose). Ácido acético e butírico foram produzidos nas culturas com produções elevadas de hidrogênio, ou seja: (2) lodo de digestão anaeróbia, (1) lodo ativado com controle de pH, e (5) sedimento de lago. No entanto, nos reatores alimentados com inóculos (3) de solo de melancia e (6) compostos de resíduo aeróbio, foram verificadas produções baixas de hidrogênio e concentrações elevadas de ácido láctico. Esses resultados sugeriram que o mecanismo de produção de hidrogênio pode ocorrer em três vias: (1) produção dos ácidos: acético e butírico; (2) produção de ácido butírico e; (3) produção de ácido láctico. A transição na fermentação pode ter sido causada pelas alterações de pH impostas no experimento. (Kawagoshi *et al.*, 2005).

As análises de Biologia Molecular por meio das técnicas de PCR-DDGE foram feitas para reatores controle de pH e apresentaram oito bandas. Cinco dessas bandas foram seqüenciadas e apresentaram 95% de similaridade com espécies de bactérias da base de dados do Genbank. As bandas seqüenciadas foram similares a *Clostridium tyrobutiricum* (L08062) (Banda 1) nos reatores com pH 7, *Lactobacillus ferintoshensis* (AF275311) (Banda 2), *Lactobacillus paracasey* (AY369076) (Banda 3) e *Coprothermobacter* sp. (AB162803) (Bandas 4 e 5). Com esses resultados, foi concluído que espécies de *Clostridium* (Banda 1) tiveram função importante na produção de hidrogênio. Espécies de *Coprothermobacter* tiveram habilidade em produzir altas concentrações de ácido acético e, portanto, puderam contribuir para a produção de hidrogênio. Por outro lado, espécies de *Lactobacillus* (Banda 3) foram identificadas em variações de pH 6,0 e 7,0 e provavelmente inibiram a produção de hidrogênio, nas condições estudadas (Kawagoshi *et al.*, 2005).

Lin *et al.* (2005) pesquisaram a produção biológica do gás hidrogênio utilizando sacarose como fonte de carbono e inóculo anaeróbio previamente enriquecido. O inóculo foi obtido de sistema lodos ativados da unidade de tratamento de esgoto, filtrado em membrana 2,35 mm de diâmetro e tratado com hipoclorito de sódio 1 N, por 24 h, para inibir a atividade metanogênica. O pH foi ajustado em $6,8 \pm 0,2$. O lodo enriquecido apresentou concentração de sólidos suspensos voláteis (SSV) de 2,6 g/L e foi inoculado em reatores de mistura completa (CSTR) com 5 L de volume, a 35 ± 1 °C. A alimentação foi realizada com sacarose (20 g DQO/L) acrescida de meio basal. O reator foi operado nos TDH de 12, 8, 4 e 2h. O reator estabilizou, com TDH de 12 h, após 250 dias de operação. Nesse período não foi detectado metano na composição do biogás e o gás hidrogênio estava na proporção de $38,7 \pm 4,2\%$. Os melhores resultados ocorreram com TDH de 4 h e foram os seguintes: porcentagem do gás hidrogênio no biogás de 38,7%-45,9%; rendimentos de 0,9-3,5 mol H₂/mol de sacarose e velocidades de geração de H₂ de 263-408 mmol de H₂/L.dia. Houve também produção de ácido acético (2082±208 mg DQO/L), propiônico (491±50 mg DQO/L), butírico (3614±361 mg DQO/L) e valérico (2±0 mg DQO/L). A identificação da comunidade microbiana revelou que as espécies dominantes foram *Clostridium ramosum*.

Fang *et al.* (2006) estudaram a produção biológica do hidrogênio em condições acidofílicas, em reatores anaeróbios, operados em batelada, inoculados com lodo de digestor anaeróbio municipal, usado no tratamento de água residuária de beneficiamento de arroz. A comunidade microbiana acidofílica produtora de hidrogênio, proveniente desse inóculo, foi analisada por meio de técnicas de PCR-DGGE, clonagem, sequenciamento e análises filogenéticas. Foram utilizados *primers* para o Domínio *Bacteria* e para o Domínio *Archaea*,

de acordo com Muyzer *et al.* (1993) e Zhang *et al.* (2000), para as condições de pH 4,5 e 130 horas de duração do experimento. Os produtos do PCR foram utilizados para clonagem e 28 clones foram selecionados. O inóculo foi pré-tratado a quente (mantido a 100 °C durante 30 minutos). O carboidrato utilizado foi o presente na água residuária de tratamento de arroz.

Três séries de reatores em batelada em duplicata, com 280 mL de volume e atmosfera de N₂ (100%) foram lacrados e mantidos sob agitação de 100 rpm. A série (1) investigou o efeito do pH na produção de hidrogênio. O experimento foi montado para variações de pH de 4,0 a 7,0, com incrementos de 0,5 unidades, a 37 °C, e alimentado com 5,5 g carboidrato/L, em 40 h. A série (2) foi montada para comparar a produção de hidrogênio a 37°C e 55°C a pH 4,5 e 5,5 g carboidrato/L. As melhores condições de operação para produção do hidrogênio foram pH 4,5 e temperatura de 37 °C e, a partir desse fato, o experimento (3) foi montado nessas condições, a concentrações variadas de carboidrato, em g/L de 2,7; 5,5; 8,3; 11,0; 13,8; e 22,11. Foram avaliados os seguintes parâmetros: P (produção potencial de hidrogênio em mL), λ (fase de adaptação em h) e R_m (velocidade máxima de produção de hidrogênio em mL/h).

Em todos os experimentos, as proporções de biogás foram as seguintes: 45%-56% de hidrogênio; 44%-55% de CO₂ e metano não foi detectado. A Tabela 3.9 sumariza o comportamento das séries (1) (2) e (3) nas variações de pH e temperatura.

Tabela 3.9 Comportamento da Produção de Hidrogênio nas séries 1, 2 e 3

Séries	pH	Temperatura	P (mL H ₂ .g carboidrato ⁻¹)	λ (h)	R _m (mL H ₂ /h)
1	7	37 °C	160	18	8,0
	4,5	37 °C	346	36	7,3
2	4,5	37 °C	286	36	7,3
	5,5	55 °C	174	44	2,9
3	4,5	37 °C	286	36	7,3

Fonte: Fang *et al.* (2006)

Na série (1) o reator monitorado com pH 7,0 produziu menos hidrogênio. A maior velocidade de produção de hidrogênio ocorreu no reator com pH 4,5 e foram produzidos os seguintes ácidos: acético (27,3%), butírico (67,1%) e metanol (5,6%). Os reatores operados com pH 7,0 apresentaram taxas de produção de acético/butírico de 1,15 e; para os de pH 4,5; relação de 0,41. Essa alteração sugeriu que o metabolismo microbiano sofreu alteração com as

mudanças de pH. A série (2) apresentou os melhores resultados para condição mesofílica (37 °C) e os piores resultados ocorreram para a condição termofílica (55° C). Na série (3), os melhores resultados ocorreram nas concentrações de 5,5 g de carboidrato/L, com velocidade de produção específica máxima 2,1 L H₂/g SSV.dia. Os ácidos produzidos foram os seguintes: acético (43 %), butírico (51,4 %), além de metanol (1,6%) (Fang *et al.*, 2006).

Segundo Fang *et al.* (2006), o aumento nas concentrações de carboidrato resultou na diminuição da produção de ácido acético e elevação na produção de ácido butírico, para as condições estudadas.

Análises de DGGE foram feitas para a série (1) com variações de pH 6,5 a 4,5 e indicou decréscimo na diversidade microbiana com a diminuição do pH. Como os melhores resultados de produção de hidrogênio foram para pH 4,5, a análise foi efetuada para essa condição. Foram amostradas bandas para pH 4,5 nos tempos: 0, 24, 48, 76, 96 e 130 h, em função da produção acumulativa de hidrogênio. Os resultados revelaram decréscimo na comunidade microbiana com o tempo e apenas uma banda predominou após 48 h. A produção de hidrogênio foi elevada após 38 h, com o término da fase de adaptação e estabilização após 90 h, quando o carboidrato foi consumido totalmente. A população predominante foi considerada como responsável pela produção de hidrogênio. Análises microscópicas revelaram morfologias semelhantes a bacilos. Nas análises de clonagem e sequenciamento do gene RNAr 16S, nove espécies foram detectadas e relacionadas com *Clostridium*.

Kim *et al.* (2006) estudaram o efeito da concentração do substrato na produção de hidrogênio, por meio de análises da comunidade microbiana baseado na análise do RNAr 16S. Foi utilizado reator de mistura completa e fluxo contínuo (CSTR) de 5 litros, por 271 dias, alimentado com sacarose (30 g DQO/L inicial e, após aclimação com decréscimos de 30 para 20, 15 e 10 g DQO/L e; posteriormente, acréscimos de 10 para 15, 20, 30, 35, 40, 50 e 60 g DQO/L; com intervalos de cada passo de, aproximadamente, 20 dias), a 35±1 °C, sob atmosfera de N₂ (100%), com TDH de 12 horas e pH 5,4±0,1. O inóculo (1,5 L) foi proveniente de unidade de tratamento de água residuária, pré-tratado a quente (90 °C por 10 minutos), para inibir a atividade dos microrganismos consumidores de hidrogênio e ativar as bactérias anaeróbias formadoras de endósporos, como *Clostridium* spp.

Para concentrações de sacarose de 30 g DQO/L ocorreram rendimentos máximos descritos a seguir: 1,09 mol H₂/mol sacarose adicionada e 1,22 mol H₂/mol sacarose consumida.

Análises de PCR/DGGE do inóculo foram efetuadas para concentrações de sacarose de 10 g DQO/L (120° dia), 30 g DQO/L (179° dia) e 60 g DQO/L (271° dia). Quatro bandas

foram obtidas para concentrações de sacarose de 10 g DQO/L (120° dia), que após serem sequenciadas, revelaram semelhança com *C. tyrobutyricum*, *C. acetobutyricum*, *C. acidisoli* e *C. scatologenes*. Em amostras com sacarose 30 g DQO/L (179° dia), foram detectadas em sete bandas, similaridade com *Clostridium tyrobutyricum*, *C. acidisoli* e *C. butyricum*. Seis bandas foram associadas a *C. tyrobutyricum*, *C. acetobutyricum*, *C. acidisoli*, *C. butyricum* e *C. saccharobutyricum*. Uma banda foi relacionada como *Bacteroides*, que utilizou ácido láctico, *Bacillus racemilacticus*, nas amostras com sacarose de 60 g DQO/L (271° dia) (Kim *et al.*, 2006).

Kotay *et al.* (2007) isolaram espécie produtora de hidrogênio de lodo de esgoto anaeróbio. O inóculo foi mantido em condições anaeróbias, a 37 °C e enriquecido em meio nutricional MYG. As culturas puras foram obtidas por meio de diluições seriadas e mantidas em jarras de anaerobiose, em meio nutriente (0,85% peso/volume), em placas com ágar. O crescimento foi monitorado a pH 6,0, 37 °C e 250 rpm durante 12 h.

O experimento foi montado em frascos de 500 mL de volume. As condições de anaerobiose foram mantidas através de fluxo de argônio, após a inoculação (Kotay *et al.*, 2007).

O reator foi operado para variações de temperatura (28-40 °C, pH 6,0, glicose 1%, volume e idade do inóculo de 10% v/v e 12 h respectivamente); pH (5,5 a 9,0, a 37 °C, glicose 1%, volume e idade do inóculo de 10% v/v e 12 h respectivamente); concentração de glicose de 0,5 – 2,5 (% peso/volume), pH 6,5 e 37 °C, volume e idade do inóculo de 10% v/v e 12 h respectivamente); volume e idade do inóculo (2-20% e 10-18 h respectivamente, pH 6,5, 37 °C, glicose 1,5 % peso/volume) e; fontes de carbono (glicose, maltose, sacarose, D-xilose, lactose, amido, galactose, manose, glicerol, pH 6,5, 37 °C, concentração inicial do substrato 1,5 % v/v, volume e idade do inóculo de 10% v/v e 14 h, respectivamente) (Kotay *et al.*, 2007).

O rendimento máximo obtido foi de 2,28 mols H₂/mol de glicose e ocorreu com 2% (peso/volume) das concentrações de glicose; pH 6,5; 37 °C, 10% (v/v) de inóculo com idade celular de 14h. Os produtos intermediários gerados foi ácido acético (32,6% peso/volume), butírico (24,5 % peso/volume) e etanol (25,6 % peso/volume). As velocidades de crescimento celular e produção de H₂ diminuíram quando as concentrações de glicose foram acima de 2% peso/volume, indicando inibição ao substrato (Kotay *et al.*, 2007).

Dos substratos testados, os melhores rendimentos foram verificados para sacarose (3,2 mol H₂/mol sacarose). Com D-xilose foram obtidos rendimentos de 2,5 mol H₂/mol

D-xilose e pH 4,2. Rendimentos reduzidos foram verificados com manose (2,0 mol H₂/mol sacarose) (Kotay *et al.*, 2007).

A cultura isolada foi semelhante a *Bacillus coagulans* IIT-BT S1, espécie fermentativa responsável pela produção de hidrogênio (Kotay *et al.*, 2007).

Shin *et al.* (2007) isolaram uma nova espécie de bactéria fermentativa produtora de hidrogênio de aterro sanitário. Os reatores em batelada (1L) foram alimentados com meio PYG contendo: glicose (10 g/L), peptona (20 g/L), extrato de levedura (3 g/L), MgSO₄·7H₂O (0,5 g/L), KH₂PO₄ (2 g/L). A concentração celular utilizada foi de 0,42 g de massa seca/L. Os autores usaram a hibridização DNA-DNA para uma identificação mais acurada. Os resultados revelaram similaridade com *Enterobacter asburiae* JCM 6051^T (76,7%). A espécie isolada nesse estudo foi considerada uma espécie nova e denominada *Enterobacter asburiae* SNU-1. Linhagens de espécies de *Enterobacter aerogenes* e *E. cloacae* são conhecidas como fermentadoras de carboidratos que produzem hidrogênio. No entanto, não há relatos de produção de hidrogênio por espécies de *Enterobacter asburiae*.

As concentrações iniciais de glicose em g/L testadas foram de 5, 10, 15, 25 e 50 e de pH 4,0; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0 e 7,5. No entanto, as produtividades máximas e globais de gás hidrogênio ocorreram para concentrações iniciais de glicose de 25 g/L, pH 7,0 e foram respectivamente de 398 e 174 mL/L.h (Shin *et al.*, 2007).

Os produtos intermediários gerados em quantidades elevadas foram ácido fórmico, etanol, butanodiol e, quantidades reduzidas de ácido acético, láctico, succínico e butírico. A produção de hidrogênio máxima ocorreu na fase estacionária (8 a 10h) provavelmente devido à degradação de ácido fórmico que foi acumulado nessa fase. O rendimento obtido baseado no consumo de ácido fórmico foi de 0,43 mol H₂/mol ácido.

As fontes de carbono (10g/L) testadas, a 37 °C, sem controle de pH foram as seguintes: glicose, frutose, sacarose, lactose, celulose, amido, glicerol e sorbitol. Os melhores resultados de produção de hidrogênio por *Enterobacter asburiae* ocorreram para sacarose, frutose, glicose e sorbitol. No entanto, essa espécie não foi capaz de produzir hidrogênio com celulose e teve produções reduzidas com glicerol, amido e lactose (Shin *et al.*, 2007).

3.4 Considerações Finais

De acordo com a revisão bibliográfica foi possível verificar que as hidrogenases são as enzimas responsáveis pela produção de hidrogênio. Dentre essas, as principais que participam desses processos são: Fe-nitrogenase e NiFe nitrogenase.

Controle de pH e choque térmico são meios efetivos de se evitar a metanogênese e são aplicados para favorecer bacilos produtores de hidrogênio, formadores de endósporos, como espécies de *Clostridium* que são tolerantes a temperaturas elevadas e condições ambientais adversas. Cerca de 30% do metano produzido no processo de metanogênese é originado a partir do consumo de H_2 por arqueias metanogênicas hidrogenotróficas.

Diversos microrganismos anaeróbios necessitam, em seu meio de cultivo, de nutrientes para crescer e fermentar substratos orgânicos para produzir H_2 . Os principais compostos complexos usados são: peptona, triptona, polipeptona, extrato de levedura, soluções de vitaminas, dentre outros.

Vários açúcares apresentam rendimentos diferentes de hidrogênio por mol de substrato orgânico, dependendo da rota fermentativa e dos produtos finais. As rotas de degradação desses açúcares podem ser principalmente: (1) consumo do açúcar e geração de ácido acético e (2) consumo do açúcar e geração de ácido butírico. Quando ácido acético for o produto final o rendimento teórico máximo obtido será de 4 mols de hidrogênio por mol de glicose, 8 mols de hidrogênio por mol de sacarose e 6 mols de hidrogênio por mol de xilose. Quando ácido butírico for o produto final, o rendimento teórico máximo obtido será de 2 mols de hidrogênio por mol de glicose, 4 mols de hidrogênio por mol de sacarose e 5 mols de hidrogênio por mol de xilose.

A conversão de matéria orgânica em hidrogênio ocorre na etapa inicial do processo anaeróbio, em que os compostos orgânicos são convertidos em ácidos. Nessa conversão, a rota metabólica poderá ser formação de ácido acético e butírico ou geração de ácido propiônico e álcoois. Gás hidrogênio será gerado se ocorrer formação de ácido acético e butírico. Se a formação de ácido propiônico e álcoois forem favorecidos, haverá consumo de hidrogênio e, portanto, o processo deve ser controlado para evitar essa rota metabólica. Preferencialmente, deve-se procurar formar a maior quantidade possível de ácido acético, porque, nesse caso, a estequiometria da reação resulta na maior produção de hidrogênio.

Os ácidos orgânicos obtidos são principalmente acético e butírico. Portanto, a maior produção teórica de hidrogênio prevê o primeiro ácido como produto final da fermentação. Na prática, porém, a produção elevada de hidrogênio está associada com uma mistura dos produtos da fermentação; tais como, ácido acético e butírico, enquanto que produção baixa de hidrogênio está associada à formação de ácido propiônico e produtos finais menos reduzidos como álcoois e ácido lático.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Esquema Operacional

A Figura 4.1 descreve o esquema operacional realizado. Foram montados reatores anaeróbios em batelada com inóculo proveniente de reator UASB utilizado no tratamento de resíduos de suinocultura, tratado previamente a quente para inibir a atividade metanogênica. O pré-tratamento a quente foi efetuado de acordo com metodologia descrita por Kim *et al.* (2006) para seleção das bactérias produtoras de hidrogênio.

O inóculo pré-tratado foi enriquecido utilizando diluições seriadas com sacarose (2000 mg/L) como fonte de carbono. O processo de enriquecimento celular foi monitorado com análises esporádicas de turbidimetria, produção de hidrogênio e microscopia óptica de luz comum e de contraste de fase. Com o inóculo purificado foram montados os ensaios para verificação da geração de H₂.

Os reatores foram montados separadamente com diferentes concentrações de sacarose (Figura 4.2) e de xilose (Figura 4.3), conforme descrito a seguir.

Foram mantidos, respectivamente, 2000 mg sacarose/L e 2000 mg xilose/L para reativação e manutenção da biomassa produtora de gás hidrogênio.

Figura 4.1 Esquema operacional

Figura 4.2 Esquema operacional realizado para os ensaios dos reatores anaeróbios alimentados com sacarose

Figura 4.3 Esquema operacional realizado para os ensaios de reatores anaeróbios alimentados com xilose

4.2 Substrato Sintético

Todos os ensaios foram realizados com meio Del Nery (1987) modificado que foi composto pelas soluções A, B, C e D (Tabela 4.1); preparadas separadamente, armazenadas em frasco escuro e mantidas em geladeira; além do acréscimo dos seguintes compostos: uréia, peptona e solução de vitaminas. As quantidades adicionadas desses compostos estão especificadas na descrição dos ensaios que foram realizados com sacarose e xilose, descritos posteriormente.

Ao substrato foi adicionado ácido clorídrico ou hidróxido de sódio para ajustar o pH em 5,5; valor apresentado na literatura como adequado para evitar a metanogênese (Fang & Liu, 2002).

O substrato sintético foi filtrado em membrana 0,22 μm , em sistema de filtração previamente esterilizado em autoclave (121 $^{\circ}\text{C}$, 1 atm, 20 minutos), com o objetivo de evitar a contaminação e manter as condições assépticas. Posteriormente foi fluxonado gás He (100%), durante 20 minutos para manter as condições anaeróbias.

Tabela 4.1 Composição do Meio nutricional Del Nery

Composto	Quantidades (mg/L)
Solução A:	
NiSO ₄ .6H ₂ O	0,50
FeSO ₄ .7H ₂ O	2,50
FeCl ₃ .6H ₂ O	0,25
CoCl ₂ .2H ₂ O	0,04
Solução B:	
CaCl ₂ .6H ₂ O	2,06
Solução C:	
SeO ₂	0,14
Solução D:	
KH ₂ PO ₄	5,36
K ₂ HPO ₄	1,30
Na ₂ HPO ₄ H ₂ O	2,76
Uréia	20,0

Fonte: Del Nery (1987)

Na Tabela 4.2 encontra-se descrita a solução de vitaminas descrita por Widdel & Pfennig (1984). A preparação ocorreu através da dissolução dos componentes e esterilização por filtração em membrana de 0,22 μm de porosidade, sob condições assépticas.

A solução foi distribuída em frascos de vidro esterilizados sob atmosfera de N₂ (100%), fechados com tampa de butila e rosca plástica, armazenados sob refrigeração a 4 $^{\circ}\text{C}$.

Tabela 4.2 Composição da solução de vitaminas

Composto	Massas (mg)
Ácido <i>p</i> -aminobenzóico	40
Biotina	10
Água destilada q.s.p.	1000 mL

Fonte: Widdel & Pfennig (1984)

4.3 Inóculo

A fonte de inóculo utilizado foi lodo granulado de reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB) usado no tratamento de resíduos de suinocultura (UNESP, Jaboticabal – SP). Para obtenção das culturas produtoras de hidrogênio foi utilizado pré-tratamento a quente do inóculo de acordo com Kim *et al.* (2006) e controle de pH, com o objetivo de promover o enriquecimento celular, conforme descrito a seguir.

Foi colocado em becker alíquota de 100 mL de amostra de inóculo. O material foi levado para aquecimento a 90 °C, durante 10 minutos. A seguir a amostra aquecida foi mantida em banho de gelo, até atingir a temperatura de 25 °C.

4.4 Enriquecimento e manutenção do inóculo pré-tratado

Foi preparado 1 L de meio de cultivo, conforme descrito a seguir. Foram adicionados 2,0 mL de cada uma das soluções A, B, C e D (Tabela 4.1); 1,0 mL de solução de vitaminas (Tabela 4.2); 40 mg de uréia; 1000 mg de peptona e 2000 mg de sacarose como fonte de carbono, além de água destilada até completar o volume de 1000 mL. Sob condições de assepsia, em frascos de antibiótico (100 mL), com auxílio de pipetas automáticas e ponteiros esterilizados, foram adicionados 56 mL do meio de cultivo além da adição de 14 mL de inóculo pré-tratado. Os reatores foram submetidos à atmosfera de Hélio (100%), durante 5 minutos, para a troca gasosa no volume reacional de *headspace*. Após a distribuição do meio de cultivo e inóculo, os reatores foram fechados com tampa de borracha e lacre de alumínio. Após quinze dias, nova série de reatores foi montada, objetivando o enriquecimento celular e aumento da biomassa, usando como inóculo o volume líquido dos reatores anaeróbios de batelada. O enriquecimento celular foi realizado por diluições seriadas (Figura 4.4).

Figura 4.4 Enriquecimento celular do inóculo pré-tratado: (1) *headspace* e (2) inóculo com meio de cultivo

A Tabela 4.3 descreve a composição dos reatores anaeróbios de enriquecimento. Sob condições de assepsia, em frascos de antibiótico de 100 mL contendo meio Del Nery (1987) modificado (Tabela 4.1 e Tabela 4.2). Os reatores anaeróbios foram mantidos com volume final de reação de 70 mL e *headspace* de 30 mL (Tabela 4.3).

Tabela 4.3 Composição dos reatores anaeróbios em batelada de enriquecimento celular

Composição	Volume
Atmosfera gasosa (He, 100%)	30 mL
Inóculo pré-tratado	14 mL
Meio de cultivo	56 mL
pH	5,5
Volume líquido total	70 mL

Os reatores foram transferidos para estufa à temperatura de $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Entretanto, como os reatores tinham volume líquido de 70 mL não foi possível fazer análises físico-químicas de consumo de substrato, geração de produtos intermediários como ácidos e álcoois e crescimento celular. Análises de geração de gás hidrogênio foram efetuadas para verificar se a enriquecimento do inóculo foi eficiente.

4.5 Reativação da biomassa enriquecida

A reativação da biomassa enriquecida foi feita para ser utilizada nos ensaios com reatores anaeróbios alimentados com sacarose e xilose, conforme descrito a seguir. A biomassa purificada (40%) que estava mantida a 4 °C foi submetida a lavagem em centrífuga refrigerada a 8500 rpm e 3 °C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* suspenso em meio de cultivo novo, descrito anteriormente (item 4.2). Os substratos sacarose (2000 mg/L) e xilose (2000 mg/L) foram adicionados separadamente. Ácido clorídrico ou hidróxido de sódio foram adicionados no meio reacional para ajustar o pH em 5,5.

O meio de cultivo foi filtrado em membrana 0,22 µm, em sistema de filtração previamente esterilizado em autoclave (121 °C, 1 atm, 20 minutos). Após distribuição das soluções (1000 mL de volume reacional), foi adicionada biomassa purificada (40%) no frasco com 2000 mL e submetido à atmosfera de Hélio (100%) e 1000 mL de *headspace*, durante 20 minutos, fechado com tampa de butila e rosca plástica. O frasco foi transferido para estufa, à temperatura de $37\pm 1^\circ\text{C}$, durante 48 h, período em que a cultura atingiu a fase exponencial de crescimento. Em seguida se procedeu a montagem dos ensaios com reatores anaeróbios alimentados com sacarose e xilose, como descrito a seguir.

4.6 Análise do Crescimento Celular

O crescimento celular foi verificado através da análise de absorbância da cultura a 600 nm, e SSV; ambos de acordo com APHA (2005). Para a obtenção de tais resultados foi necessário realizar um ensaio em que foi medida absorbância a 600 nm e sólidos suspensos voláteis (SSV), durante o período de crescimento da cultura microbiana. Foram montados reatores anaeróbios (5 L) em duplicata, alimentados com sacarose e xilose separadamente, meio Del Nery, acrescidos de uréia, peptona e solução de vitaminas, nas mesmas condições da reativação da biomassa (2000 mg sacarose/L e 2000 mg xilose/L), com volume reacional de 4 L, *headspace* de 1 L preenchido com gás hélio e inóculo da enriquecimento celular (20%). Os reatores foram mantidos a $37\pm 1^\circ\text{C}$. A concentração de SSV (g/L) da biomassa purificada foi proporcional à absorbância a 600 nm. A equação (4.1) obtida refere-se ao ensaio com sacarose e a equação (4.2) ao ensaio com xilose (Apêndices I e II):

$$\text{SSV} = 2,6691 \cdot \text{ABS}_{600} - 0,0095 \quad (4.1)$$

$$(\text{R}^2 = 0,99)$$

$$\text{SSV} = 0,7436 \cdot \text{ABS}_{600} + 0,0146 \quad (4.2)$$

$$(\text{R}^2 = 0,93)$$

4.7 Ensaios com reatores anaeróbios alimentados com sacarose e xilose

Foram montados reatores anaeróbios em triplicata para oito condições distintas em concentrações de sacarose e xilose. As seguintes concentrações foram testadas de sacarose: (1) 630,0 mg /L, (2) 1184,0 mg/L, (3) 1816,0 mg/L e (4) 4128,0 mg/L. As seguintes concentrações de xilose foram avaliadas: (5) 630,0 mg/L, (6) 1341,0 mg/L, (7) 1848,0 mg/L e (8) 3588,0 mg/L.

A Tabela 4.4 e a Tabela 4.5 descrevem a composição dos ensaios alimentados com sacarose e xilose. O inóculo perfazia 20% do volume total de reação, que era composto de células que foram reativadas do ensaio de enriquecimento. Procedeu-se à seguinte sequência na preparação dos reatores. A biomassa reativada foi submetida à lavagem em centrífuga refrigerada a 8500 rpm e 3 °C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* suspenso em meio de cultura novo, com a seguinte composição: meio Del Nery (1987) modificado composto pelas soluções A, B, C, e D, com acréscimo de peptona e solução de vitaminas; além de fonte de carbono (sacarose e xilose), respectivamente para os ensaios realizados. Ao meio reacional foi adicionado ácido clorídrico ou hidróxido de sódio para ajustar o pH em 5,5. A preparação do meio de cultivo foi realizada de acordo com a metodologia descrita no item 4.2. Após distribuição das soluções, os reatores foram submetidos à atmosfera de Hélio (100%), durante 20 minutos, fechados com tampa de butila e rosca plástica e mantidos em estufa, à temperatura de 37±1 °C, sem agitação.

Os ensaios (1), (2) e (3) foram montados com 1500 mL de volume reacional e 500 mL de *headspace*, preenchido com gás hélio. O ensaio (4) foi montado com 1000 mL de volume reacional e 1000 mL de *headspace* nas mesmas condições dos ensaios anteriores. Essa alteração foi necessária para que o gás gerado não estourasse o reator, por se tratar de concentração mais elevada de sacarose imposta para essa condição operacional. Nesses ensaios foram efetuadas as seguintes análises: determinação do gás hidrogênio, geração de ácidos voláteis, álcoois, acetona, crescimento celular, sólidos suspensos voláteis (SSV), consumo de sacarose, exames microscópicos e análises de Biologia Molecular.

Tabela 4.4 Montagem dos Ensaios em reatores anaeróbios com sacarose

Constituição	Ensaio alimentado com sacarose			
	(1)	(2)	(3)	(4)
Sacarose (mg/L)	630,0	1184,0	1816,0	4128,0
Solução A (mL/L)	0,5	1,0	2,0	4,0
Solução B (mL/L)	0,5	1,0	2,0	4,0
Solução C (mL/L)	0,5	1,0	2,0	4,0
Solução D (mL/L)	0,5	1,0	2,0	4,0
Solução de vitaminas (mL/L)	1,0	1,0	1,0	1,0
Uréia (mg/L)	10	20	40	80
Peptona (mg/L)	1000	1000	1000	1000
Inóculo (mL) (biomassa reativada)	300	300	300	200
<i>Headspace</i> Gás He (mL)	500	500	500	1000
pH inicial	5,5	5,5	5,5	5,5
Água destilada q.s.p. (mL)	1500	1500	1500	1000

Tabela 4.5 Composição do substrato sintético dos reatores anaeróbios com xilose

Constituição	Ensaio alimentado com xilose (em mg /L)			
	(5)	(6)	(7)	(8)
Xilose (mg/L)	630,0	1341,0	1848,0	3588,0
Solução A (mL/L)	0,5	1,0	2,0	4,0
Solução B (mL/L)	0,5	1,0	2,0	4,0
Solução C: (mL/L)	0,5	1,0	2,0	4,0
Solução D (mL/L)	0,5	1,0	2,0	4,0
Solução de vitaminas (mL/L)	1,0	1,0	1,0	1,0
Uréia (mg)	10	20	40	80
Peptona (mg)	1000	1000	1000	1000
Inóculo (mL) (biomassa reativada)	200	200	200	400
<i>Headspace</i> Gás He (mL)	1000	1000	1000	3000
pH inicial	5,5	5,5	5,5	5,5
Água destilada q.s.p. (mL)	1000	1000	1000	2000

Os ensaios (5), (6) e (7) foram montados com 1000 mL de volume reacional e 1000 mL de *headspace* preenchido com gás hélio. O ensaio (8) foi montado com 2000 mL de volume reacional e 3000 mL de *headspace* nas mesmas condições dos ensaios anteriores. Essa alteração foi necessária para que o gás gerado não estourasse o reator, por se tratar de concentração mais elevada de xilose imposta para essa condição operacional.

Nesses ensaios foram efetuadas as seguintes análises: consumo de xilose, determinação do gás hidrogênio, crescimento celular (SSV), gerações de ácidos orgânicos voláteis, álcoois, acetona e exames microscópicos.

A Figura 4.5 ilustra as triplicatas dos reatores anaeróbios.

Figura 4.5 Triplicatas de reatores anaeróbios utilizados nos ensaios

4.8 Análises Cromatográficas

Foram efetuadas leituras para determinação do gás hidrogênio, em reatores pressurizados, por meio da retirada de 0,1 mL de amostra da fase gasosa, utilizando seringa *gastight* com trava. Foi utilizado cromatógrafo a gás, Shimadzu GC-2010, equipado com detector de condutividade térmica (TCD). A coluna utilizada foi a Carboxen 1010 plot 30 m x 0,53 mm, sendo o gás de arraste argônio sob fluxo de 21,9 cm/s. As temperaturas do forno, da coluna e do detector foram 30 °C, 200 °C e 230 °C, respectivamente.

A curva de calibração foi efetuada para análises da geração de gás hidrogênio nos reatores anaeróbios. As quantidades testadas foram de 5,0; 10,0; 25,0; 50,0; 75,0 e 100,0 µL de H₂. Os resultados obtidos representam a relação entre o número de mols de H₂ e área por ele ocupada. A equação (4.3) obtida está descrita a seguir (Apêndice III).

$$\begin{aligned} \text{N}^{\circ} \text{ mols H}_2 &= (\text{área} + 2481,76) / 4563858108095,67 \\ (R^2 &= 1,00) \end{aligned} \quad (4.3)$$

Para os ensaios nos reatores alimentados com sacarose, a determinação dos ácidos voláteis foi efetuada através de cromatografia gasosa, no cromatógrafo HP 6890, com detector de ionização de chama (FID), com coluna HP INNOWAX, 30 m x 0,25 mm x 0,25 mm de espessura do filme, com vazão de hidrogênio como gás de arraste de 20 mL/min, com temperatura de 250 °C, com volume de injeção de 10 µL, temperatura do forno de 100 °C (3 minutos) a 180 °C (5 minutos), 5 °C/min, temperatura do detector de 300 °C, com fluxo de ar sintético de 300 mL/min, com fluxo de nitrogênio como gás auxiliar a 33 mL/min e vazão de hidrogênio a 30 mL/min (Moraes *et al.*, 2000).

As gerações de álcoois e acetona foram determinadas através de cromatografia gasosa, no cromatógrafo gasoso Shimadzu GC-2010, equipado com detector de ionização de chama e amostrador automático para *headspace* COMBI-PAL, modelo AOC 5000 e coluna HP-INNOWAX, de 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm de espessura de filme. As condições operacionais foram as seguintes: temperatura do injetor de 250 °C, razão de split igual a 1, temperatura do forno de 35 °C (0') 2 °C/min, 38 °C (0') 10 °C/min. 75 °C (0') 35 °C/min 120 °C (1') 10 °C/min 170 °C (2'), o gás de arraste foi hidrogênio, temperatura do detector a 280 °C, gás auxiliar (N₂) a 30 mL/min; ar sintético a 300 mL/min. e hidrogênio a 30 mL/min. As condições do amostrador automático de *headspace* COMBI-PAL, AOC 5000 foram as seguintes: seringa de 2,5 mL; temperatura da seringa a 90 °C; volume injetado de 400 µL; temperatura de incubação da amostra a 100 °C; tempo de incubação da amostra de 13 minutos. Nesse equipamento também foram determinados os ácidos orgânicos dos ensaios dos reatores alimentados com xilose.

As equações geradas das curvas de calibração estão descritas no Apêndice IV.

4.9 Análises dos consumos de sacarose e xilose

Os consumos de sacarose e xilose foram determinados pelo método de Dobuis *et al.* (1956), adaptado por Herbert *et al.* (1971), conforme descrito a seguir. Colocou-se 1,0 mL de amostra, previamente filtrada, em tubo de ensaio. Adicionou-se 1mL de solução de fenol (5%). Procedeu-se agitação. Adicionou-se rapidamente, contra a superfície do frasco contendo as amostras, 5,0 mL de ácido sulfúrico concentrado. Homogeneizou-se. Os frascos contendo as amostras foram deixados em repouso, durante 10 minutos, à temperatura ambiente. A seguir os tubos foram colocados em banho-maria, a 25 °C, durante 15 minutos. A absorbância foi lida a 480 nm.

Foram efetuadas curvas de calibração para análises dos consumos de sacarose e xilose. As concentrações testadas variaram de 12,5 a 200 mg/L de sacarose e xilose, entretanto para valores acima de 200 mg/L há extrapolação do limite de detecção do espectrofotômetro HACH 4000; tornando-se necessário a diluição da amostra. Os resultados obtidos representaram a relação entre absorbância para comprimento de onda de 480 nm e concentrações de sacarose (equação 4.4) e de xilose (equação 4.5), descritas a seguir (Apêndice V).

$$[\text{Sacarose}] \text{ (mg/L)} = 95,238 * \text{ABS}_{480} - 0,371 \quad (4.4)$$

$$(R^2 = 1,00)$$

$$[\text{Xilose}] \text{ (mg/L)} = 58,558 * \text{ABS}_{480} - 7,7333 \quad (4.5)$$

$$(R^2 = 0,98)$$

4.10 Análises de pH

Foram efetuadas leituras para determinação do pH nos reatores anaeróbios em batelada para as quatro condições estudadas. O pH inicial foi mantido em 5,5 conforme descrito anteriormente, com adições de HCl ou NaOH. As medidas foram efetuadas no final dos ensaios, de acordo com APHA (2005).

4.11 Análise da Pressão Parcial de H₂

A pressão parcial do gás hidrogênio exercida no *headspace* dos reatores anaeróbios alimentados com sacarose foi calculada através da equação (4.6):

$$P(\text{H}_2) = \frac{n(\text{H}_2) \times R \times T}{V} \quad (4.6)$$

Sendo:

$$T = 310,15 \text{ } ^\circ \text{K}$$

$$R = 0,08206 \text{ L atm/mol K}$$

$$n = n^\circ \text{ de mols de H}_2$$

$$V = \text{volume de headspace}$$

4.12 Análises microbiológicas

As análises microbiológicas foram feitas com amostras dos reatores operados em batelada alimentados com sacarose e xilose, para as condições estudadas.

4.12.1 Exames microscópicos

Foram feitos exames microscópicos das amostras dos reatores, através de luz comum, contraste de fase e fluorescência em microscópio Leica. As imagens foram capturadas por meio de câmera *Optronics* e software *Image Pro-Plus* versão 4.5, sendo possível observar e registrar os microrganismos presentes na amostra.

A coloração de Gram foi realizada para diferenciação dos microrganismos, conforme procedimento (DMS, 1981). Foi efetuada observação ao microscópio com objetiva de imersão (1600 X). Células Gram positivas coraram-se em azul-violeta e células Gram negativas, em vermelho.

A coloração de endósporos foi feita de acordo com metodologia utilizada por Moretti (2007). Foi efetuada observação ao microscópio com objetiva de imersão (1600 x). Os endósporos coraram-se de verde.

4.12.2 Biologia Molecular

As análises de Biologia Molecular realizadas foram as seguintes: clonagem e sequenciamento da biomassa enriquecida e PCR/DGGE com recorte de banda e sequenciamento das amostras do final dos ensaios dos reatores anaeróbios alimentados com sacarose. Foi realizado também DGGE com recorte de banda e sequenciamento de amostras do final dos ensaios dos reatores anaeróbios alimentados com xilose. Entretanto, as sequências obtidas continham poucos pares de bases não sendo possíveis análises filogenéticas.

4.12.2.1 Clonagem do gene RNAr 16S

A análise da diversidade microbiana foi realizada para a amostra da biomassa purificada. Fragmentos do gene RNA ribossomal 16S foram obtidos pela metodologia de amplificação por PCR, utilizando como molde o DNA genômico extraído diretamente de amostra da biomassa purificada. Os *primers* (oligonucleotídeos sintéticos) usados para a

reação de PCR foram 27F e 1100R (LANE, 1991), homólogos às extremidades conservadas do gene RNAr 16S de bactérias.

Para as reações de PCR foram usados 0,4 μ M de cada *primer*, 200 μ M de dNTPs (Invitrogen), uma unidade de *Taq DNA polymerase* (Invitrogen) e aproximadamente 100 ng de DNA genômico.

O programa para amplificação do gene RNAr 16S seguiu as seguintes etapas: desnaturação inicial a 94 °C por 2 min; 10 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 94 °C; 30 segundos de anelamento a 69 °C e 3 minutos a 72 °C para extensão; seguido de mais 10 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 94 °C; 30 segundos de anelamento a 63 °C e 3 minutos a 72 °C para extensão e resfriamento final a 4 °C, de acordo com Duarte (2006).

Na clonagem foi utilizado *pGEM Easy Vector System I* de acordo com as seguintes etapas.

A etapa de adenilação foi realizada da seguinte maneira: 3 μ L de PCR purificado, mais 1 μ L de tampão com $MgCl_2$, 1 μ L de dATP, 1 μ L de *Taq DNA polimerase*, 4 μ L água ultra purificada estéril. O material foi colocado a 70 °C por 30 minutos no termociclador.

A etapa da ligação do vetor *pGEM* foi realizada seguindo a adição dos seguintes componentes: 5 μ L - 2X tampão de ligação rápido, 1 μ L do vetor *pGEM Easy*, 2 μ L do produto de PCR adenilado, 1 μ L T4 DNA ligase, 1 μ L de água ultra purificada estéril. Misturou-se a reação com pipeta e incubou-se por 1 hora em temperatura ambiente.

Foi realizada a transformação em células competentes de *E. coli* que estavam armazenadas a -80 °C e foram mantidas em banho de gelo por 5 minutos. 2 μ L do produto de ligação foram misturados com as células de *E. coli*. As células foram aquecidas em banho-maria a 42 °C durante 50 segundos, sem agitação. Os tubos foram agitados manualmente e mantidos em banho de gelo por 2 minutos. 200 μ L de meio LB líquido (sem Agar) (Tabela 4.6) foram adicionados à temperatura ambiente. Incubou-se o tubo por 45 minutos, com agitação de 150 rpm e temperatura de 37 °C.

Em um tubo Falcon foram colocados 50 mL de meio LB com ampicilina/IPTG/X-Gal como descrito a seguir: 28 μ L ampicilina (0,5 g em 10 mL de água), 47 μ L de IPTG (23 mg/mL) e 64 μ L de X-gal (40 mg/mL).

Esse conteúdo foi distribuído em duas placas de Petri cada uma com 25 mL. As placas ficaram em repouso por 30 minutos antes do uso. 100 μ L do produto de transformação foram adicionados em cada placa e incubou-se a 37 °C por 24 horas.

Após esse período, as colônias transformadas que receberam o inserto (colônias brancas) foram transferidas para 5 µL de meio LB líquido acrescidas de 2,5 µL de ampicilina, e mantidas sob agitação, a 37° C por ± 16 horas.

Tabela 4.6 Composição do Meio LB

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

Para extração do plasmídeo das células transformadas que receberam o inserto foram utilizadas as seguintes soluções: acetato de potássio (Tabela 4.7), GTE – Glicose, Tris e EDTA (Tabela 4.8), SDS NaOH (0,2 N de NaOH; 1% SDS), etanol 95%, etanol 70% e água ultrapurificada.

Tabela 4.7 Composição da solução de acetato de potássio pH 4,8

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

Tabela 4.8 Composição da solução de GTE

Componentes	mL
Solução de glicose 1M	1,25
Solução TRIS 1M	0,62
Solução de EDTA 0,5M	0,5
Água ultra-purificada	23

A seguir, 1,5 mL da cultura crescida de *E. coli* com o inserto foram centrifugados por 5 minutos a 4°C em 10000 rpm. O sobrenadante foi desprezado, o *pellet* foi suspenso em

100 µL de GTE por 5 minutos e agitado em vortex. 200 µL de NaOH SDS foram adicionados e os tubos foram agitados manualmente e colocados em gelo por 5 minutos. Adicionou-se 150 µL de acetato de potássio e os tubos foram levados ao vortex e mantidos em gelo por 5 minutos. Os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 4 °C a 10000 rpm. O sobrenadante (aproximadamente 400 µL) foi transferido para um novo tubo, com auxílio de pipeta, onde foram adicionados 800 µL de etanol 95%, agitados em vortex e mantidos por 2 minutos à temperatura ambiente. Novamente, os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi retirado e o *pellet* lavado com 1 mL de etanol 70%, centrifugado e o sobrenadante descartado. Deixou-se secar por 4 horas, após esse período o *pellet* foi suspenso com 30 µL de água ultra-purificada estéril e adicionou-se 1 µL de RNAase (10 mg/L).

4.12.2.2 Sequenciamento do gene RNAr 16S

A eficiência de extração dos plasmídeos foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1%. O DNA plasmidial foi amplificado por PCR utilizando o set de *primers* M13F (5'-GTA AAA CGA CGG CCA G-3') e M13R (5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3') (manual TOPO TA Cloning®, Invitrogen). O programa de amplificação foi realizado como descrito a seguir: desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos, 25 ciclos de 60 segundos de desnaturação a 94 °C, 60 segundos para anelamento a 55 °C, e 60 segundos de extensão a 72 °C. Extensão final de 7 minutos a 72 °C, e resfriamento final a 4 °C.

Os fragmentos amplificados foram purificados com *kit* GFX PCR DNA & Gel Band (GE Healthcare).

Para a reação de sequenciamento foi utilizado *Big Dye Terminator* (Applied Biosystem) com nucleotídeos marcados por fluorescência.

Foram utilizados para volume final de 10 µL: 2 µL de Big Dye, 3 µL de produto de PCR purificado, 4 µL de *primer*, 0,5 µL de tampão e 0,5 µL de água ultra purificada estéril.

Foram colocados em termociclador, cujas temperaturas de anelamento foram específicas para cada *primer* (Tabela 4.9).

Tabela 4.9 Programação do termociclador para reações de sequenciamento

Desnaturação	Anelamento	Extensão
94 °C por 15 segundos	55 °C por 60 segundos (M13F)	60 °C por 4 minutos
35 ciclos		

Para a precipitação do DNA foram adicionados 40 µL de isopropanol a 65%, e mantidos em temperatura ambiente durante 15 minutos. Centrifugou-se a 14.000 rpm a 20 °C por 30 minutos.

O isopropanol foi removido do tubo por inversão. Ao precipitado foram adicionados 200 µL de etanol a 60%. Novamente, foi centrifugado nas mesmas condições anteriores por 5 minutos. O etanol foi removido com auxílio de pipeta automática. As amostras foram mantidas em temperatura ambiente até a evaporação total do etanol. A presença de etanol resulta em manchas e dificulta o sequenciamento de DNA.

Os *pellets* formados foram suspensos em 20 µL de formamida Hi - Di e submetidos a choque térmico (94 °C por 4 minutos e resfriados 4 °C) em termociclador, a fim de desnaturar o DNA.

4.12.2.3 Análise da Diversidade Microbiana

A avaliação da diversidade da comunidade microbiana presente no final dos ensaios com reatores anaeróbios alimentados com sacarose foi realizada através da técnica do PCR/DGGE. O DNA foi extraído segundo o protocolo de Griffiths *et al.* (2000). Na amplificação dos fragmentos do gene 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).

A Figura 4.6 mostra as etapas realizadas com técnicas de Biologia Molecular que foram aplicadas nos ensaios dos reatores anaeróbios alimentados com sacarose como descrito a seguir.

Figura 4.6 Organograma das técnicas de Biologia molecular aplicadas nas amostras dos reatores alimentados com sacarose

4.12.2.4 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 minutos, a temperatura de 4° C e 6000 rpm;
- b) O precipitado formado foi lavado com 5 mL de tampão PBS 1X (137,0 mM NaCl, 2,6 mM KCl, 1,7 mM KH₂PO₄, 10,0 mM Na₂HPO₄, pH 7,4);
- c) Centrifugou-se novamente durante 10 minutos, 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 1X;
- g) As amostras foram agitadas no vortex por 1 minuto e mantidas em gelo;
- h) Centrifugou-se durante 10 minutos, a temperatura de 4° C e 6000 rpm;

- i) A camada líquida foi removida com pipeta automática (aproximadamente 800 µL) para um tubo eppendorf de 2 mL;
- j) Foi adicionado 1 mL de fenol tamponado (até preencher o tubo completamente);
- l) As amostras foram homogeneizadas em vortex e mantidas em gelo;
- m) Centrifugou-se a 10000 rpm por 10 minutos a temperatura de 4° C;
- n) 400 µL do sobrenadante foram transferidos para outro tubo;
- o) Foi adicionado 1 mL de clorofórmio;
- p) As amostras foram homogeneizadas em vortex e centrifugadas a 10000 rpm por 10 minutos;
- q) Foi acrescentado novamente 1 mL de clorofórmio e repetido o passo (p).
- r) O sobrenadante obtido foi transferido a um novo tubo e armazenado a -20° C.

4.12.2.5 Reação de polimerização em cadeia

A partir do DNA extraído das amostras foram obtidos fragmentos do gene RNAr 16S, utilizando a técnica da amplificação através da reação de polimerização em cadeia (PCR). Para tal técnica foram utilizados *primers* homólogos às regiões conservadas do gene RNAr 16S. A amplificação foi feita com *primers* específicos para o Domínio *Bacteria* (Nielsen *et al.*, 1999). O procedimento para a amplificação dos ácidos nucleicos será apresentado a seguir.

A Tabela 4.10 descreve o procedimento para o preparo da solução para PCR de uma amostra a ser analisada. A Tabela 4.11 descreve as condições de amplificação para o Domínio *Bacteria*. A Tabela 4.12 descreve os *primers* do Domínio *Bacteria* utilizados nas análises de PCR.

Tabela 4.10 Procedimento para o preparo da solução de PCR

nº de Amostras	H ₂ O Milli Q	10 x Tampão PCR	MgCl ₂ (50 mM)	dNTP (2 mM)	Primer forward (100 pmol/L)	Primer reverse (100 pmol/L)	Ampli Taq Taq Pol. (5U/µL)	DNA
1	34 µL	5 µL	1,5 µL	5 µL	1,0 µL	1,0 µL	0,5 µL	2 µL

Tabela 4.11 Programação do termociclador para amplificação dos fragmentos de ácidos nucleicos pela reação de polimerização em cadeia (PCR)

Grupo	nº de ciclos	Desnaturação inicial	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Final da Extensão	Resfriamento
Domínio <i>Bacteria</i>	35	94° C 7 minutos	94° C 45 segundos	38° C 45 segundos	72° C 1 minuto	72° C 10 minutos	4° C

Tabela 4.12 Primers utilizados nas análises de PCR

Primers	Grupo	Sequência (5'→ 3')	Fonte
968F	Domínio <i>Bacteria</i>	AAC CGC GAA GAA CCT TAC	Nielsen <i>et al.</i> (1999)
GC clamp		CGC CCG CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGGG	
1392R		AACG GGC GGT GTG TAC	

A agarose em gel eletroforético é utilizada para avaliar o produto resultante da extração dos ácidos nucleicos e da amplificação dos genes por PCR e sua concentração pode variar, dependendo do produto a ser verificado. Para verificação da extração do DNA genômico as porcentagens da agarose pode ser de 0,6 a 0,8%. Na verificação de produtos de PCR geralmente se utiliza 1,2 a 1,4% de agarose em gel eletroforético.

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

Para verificar a extração dos ácidos nucleicos e o produto da amplificação por PCR utilizou-se a concentração de agarose de 1% e os marcadores High DNA Mass Ladder e Low DNA Mass Ladder, respectivamente.

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

- Foram preparadas soluções 1% de agarose em solução TAE 1X;
- Foi despejado o gel na bandeja e, em seguida, colocado pentes para formar as cavidades (poços);
- O gel solidificou-se em 30 minutos;
- Os pentes foram retirados;
- Foi adicionado 1 µL de corante *Blue Green* e, em seguida 5,0 µL de ácido nucleico extraído ou produto do PCR sob o corante e homogeneizado com o auxílio da micro-pipeta automática; sobre um pedaço de para-filme;
- A bandeja contendo gel com as amostras coradas foi colocada no aparelho *Pharmacia Biotech GNA 100* e coberta com tampão TAE 1X;
- As amostras foram transferidas para as “cavidades” formadas pela retirada dos pentes;
- Foi utilizado programação de 70 V constante, por 40 minutos;
- O gel foi transferido para câmara de trans-iluminador UV (Stratagene – Eagle Eye II) para observação do resultado;

As soluções PBS e TAE foram preparadas segundo Sambrook *et al.* (1989). O tampão TAE 50X: 242 g Tris Base, 57,1 mL Ácido acético glacial, 100 mL EDTA 0,5 M, completar 1L Água ultra-purificada, pH:8,0.

4.12.2.6 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 sequências de nucleotídeos diferentes.

A separação desses fragmentos ocorre em gel de poliacrilamida de acordo com grau de desnaturação da dupla hélice de DNA, sob a ação de agentes desnaturantes tais como formamida e uréia.

O procedimento dessa análise consiste na preparação da solução do gel na concentração desejada, que nesse caso foram nas porcentagens de 30% - 70%.

Os géis foram preparados de acordo com a metodologia descrita na Tabela 4.13 para volume de 100 mL, como descrito a seguir.

A constituição das soluções de gel desnaturante para o Domínio *Bacteria* está descrita na Tabela 4.14.

Tabela 4.13 Procedimentos para o preparo do gel em gradiente desnaturante

Regentes	Concentração de desnaturantes do gel DGGE		
	0%	30%	70%
40% de acrilamida/Bis (mL)	20	20	20
Solução de TAE 50X (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)			

Tabela 4.14 Constituição das soluções de gel desnaturante para o Domínio *Bacteria*

Constituição das soluções	Composição
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

- a) Foi preparado *sanduíche* com o *kit* de placas de vidro e suporte;
- b) Foram adicionados 15 mL das soluções (Tabela 4.14) em tubos de centrifuga;
- 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 gradientes 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 de gradiente 0%;
- g) Preparou-se a câmara eletroforética com adição de 140 mL do reagente TAE 50X. O volume foi completado até 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 65°C;
- i) Os pentes foram retirados e os sanduíches de vidro foram transferidos para a câmara eletroforética à 65°C;
- j) As cavidades foram lavadas com solução tampão com o auxílio de micro-pipeta;
- l) As amostras foram preparadas conforme descrito a seguir: 25 µL de amostra (*template*); 4 µL de 6X *loading dye* (corante);
- m) O corante foi colocado sobre a 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 utilizada corrente constante de 75 V;
- p) O tempo de corrida depende de cada pesquisa. Neste trabalho foram utilizadas 16 horas;

- q) Após 16 h, o sanduíche de vidro foi retirado. O gel foi transferido 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).

Após a obtenção dos resultados do DGGE foram recortadas as bandas principais que foram evidenciadas no gel de DGGE dos quatro ensaios. A intensidade na coloração de uma banda corresponde à abundância relativa das populações presentes (Zhang e Fang, 2000). O recorte de banda, para recuperação do DNA tem sido utilizado com frequência, em pesquisas de microbiologia (Seveg *et al.*, 2007), incluindo produção biológica de gás hidrogênio (Ueno *et al.*, 2001, Kawagoshi *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2006).

As bandas recortadas foram colocadas, separadamente, em tubos com água ultra purificada (30 µL) estéril, mantidas a 4° C durante o período de 24 h. Esse procedimento foi necessário para que o DNA presente no gel recortado pudesse migrar e ficar na solução aquosa que foi utilizada para o sequenciamento.

A seguir foi efetuado novo PCR, utilizando *primers* 968F e 1392R (Griffiths *et al.*, 2000), 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. Posteriormente, foi realizada a purificação desse produto de PCR de acordo com *Ultraclean PCR Clean-up* (MoBio Laboratories, Inc).

4.12.2.7 Purificação do Produto do PCR para reação de sequenciamento

A purificação do produto do PCR se torna necessária para que resíduos de reagentes e de *primers* não atrapalhem na obtenção das sequências.

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 µL de reagente *SPINBIN* em 50 µL 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 μL 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 (10 mM) foram adicionados no cesto de filtração;
- l) Foi procedida centrifugação a 13000 rpm durante 1 minuto a 20° C;
- m) A cesta de filtração foi descartada;
- n) O produto do PCR purificado ficou no filtrado. Foi estocado a -20° C.

4.12.2.8 Reação de Sequenciamento

Em seguida foi feita a reação de sequenciamento, conforme descrita na Tabela 4.15. 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.

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.

Tabela 4.15 Procedimento para preparo da amostra a ser seqüenciada

Reagentes	Quantidades (μL)
<i>Big Dye Terminator</i>	1
<i>Primer 968F</i>	4
Tampão	1
Água ultra purificada estéril	1
Amostra	3
Total	10

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 e resfriadas a 4° C. As amostras foram transferidas para os tubos de sequenciamento e colocadas no seqüenciador automático capilar ABI PRISM 310 da Applied Biosystem.

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

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

4.12.2.9 Análise Filogenética

As sequências parciais do gene RNAr 16S obtidas, tanto dos clones advindos da biomassa purificada quanto do recorte de bandas do DGGE das amostras finais do reatores anaeróbios alimentados com sacarose, foram verificadas no programa computacional DNA *Star* e no site da NCBI comparados com as sequências de RNAr 16S de organismos representados na base de dados do *Genbank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). A construção das árvores filogenéticas de consenso a partir das distâncias evolutivas foi feita pelo método de Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987) utilizando o programa MEGA versão 3.1 (Kumar *et al.*, 2008).

4.13. Ajuste dos dados experimentais

Os dados experimentais foram ajustados para valores médios obtidos de triplicatas de reatores usando-se software Microcal Origin® 5.0. As produções globais máximas de gás hidrogênio foram obtidas através do ajuste não linear sigmoidal da função de Boltzman. A velocidade máxima de consumo de sacarose e de xilose foi obtida através do maior coeficiente angular gerado das retas traçadas entre os pontos experimentais das concentrações de sacarose e de xilose em função do tempo.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção do Consórcio Microbiano

O consórcio microbiano gerador de gás hidrogênio foi obtido do inóculo de reator UASB usado no tratamento de dejetos de suinocultura, conforme descrito anteriormente, pré-tratado a quente de acordo com metodologia descrita por Kim *et al.* (2006) e pH 5,5; com o objetivo de inibir a metanogênese e, conseqüentemente, o consumo de H₂ nos reatores anaeróbios. Tal metodologia foi utilizada largamente na literatura como passo inicial para a obtenção de biomassa geradora de H₂ (Fan *et al.* 2004; Van Ginkel *et al.*, 2005; Zhang *et al.* 2005; Lin *et al.* 2006; Lin *et al.* 2008). Nesse caso, foram obtidos resultados favoráveis, tanto para a inibição de bactérias e arqueias consumidoras de gás hidrogênio, quanto na seleção de bacilos Gram positivos formadores de endósporos; que é uma característica relevante para obtenção de tais espécies.

O enriquecimento celular foi realizado, inicialmente, nas mesmas condições descritas no capítulo referente à Material e Métodos, porém sem adição de peptona e solução de vitaminas. Esse processo foi muito moroso porque o crescimento celular com consumo da sacarose e conseqüente geração de gás hidrogênio demoraram cerca de 30 dias. Apesar do meio nutricional Del Nery (1987) conter uréia, composto essencial para a síntese da nitrogenase, foi necessário acrescentar outros nutrientes para acelerar o crescimento microbiano e obter geração de gás hidrogênio.

Diversos trabalhos com produção biológica de hidrogênio utilizam meios nutricionais acrescidos de compostos como peptona, poli-peptona, vitaminas do complexo B, extrato de levedura, dentre outros (Kataoka *et al.*, 1997, Ueno *et al.*, 2001). Portanto, peptona e solução de vitaminas (Widdel & Pfennig, 1984) foram adicionadas ao meio nutricional Del Nery (1987).

Após doze dias da montagem dos reatores em batelada foram feitos exames microscópicos de contraste de fase (Figura 5.1). Nesta observação, constatou-se que o pré-tratamento foi eficiente, sendo observado predomínio de bacilos Gram positivos e endósporo terminal. Sob tais condições, o valor de pH, após 15 dias de operação, foi de 4,3. Portanto, as condições experimentais impostas permitiram a obtenção do consórcio bacteriano com diminuição do pH inicial de 5,5.

Figura 5.1 Exames microscópicos do consórcio microbiano em reatores de enriquecimento celular: (a) bacilos Gram positivos e Gram negativos; (b) endósporo terminal e bacilos; (c) endósporos e bacilos; e (d) bacilos

Espécies de *Clostridium* formadores de endósporos são selecionadas de ambientes naturais por meio de tratamento a quente (Hawkes *et al.*, 2007). Chen *et al.* (2005) trabalharam com inóculo de reatores produtores de hidrogênio (CSTR, leito fixo, leito fluidizado e lodo granulado), pré-tratado a quente, em reatores anaeróbios em batelada alimentados com sacarose (5 a 30 g DQO/L) e meio basal acrescido de extrato de levedura (1 g/L), pH 6,5, a 37° C. Foram obtidas culturas produtoras de gás hidrogênio identificadas como *Clostridium butyricum*. Exames microscópicos revelaram presenças de bacilos e bacilos com endósporos.

Fang *et al.* (2006) observaram bacilos em pH 4,5 e 37° C; filogeneticamente identificados como sendo *Clostridium* sp., em reatores anaeróbios em batelada, com inóculo de digestor anaeróbio municipal de beneficiamento de arroz pré-tratado a quente. O carboidrato utilizado (5,5 g/L) foi o presente na água residuária de tratamento de arroz, acrescido de meio basal contendo extrato de levedura (50 mg/L). Portanto, no presente trabalho, em reatores com células em suspensão alimentados com sacarose, peptona, solução

de vitaminas, meio nutricional Del Nery (1987) e pH inicial de 5,5 foi possível obter bacilos Gram positivos formadores de endósporos e produtores de gás hidrogênio.

Ensaio de enriquecimento foi realizado em reatores em batelada operados com 2000 mg/L de sacarose, com adições de peptona e vitaminas. Foram efetuados testes com reatores anaeróbios mantidos sob agitação de 150 rpm e em repouso. Os resultados revelaram que houve produção de hidrogênio em reatores mantidos sem agitação. Nos demais reatores não houve produção de hidrogênio.

Os reatores com 2000 mg/L de sacarose e mantidos sem agitação iniciaram a produção de 1,8 $\mu\text{mol H}_2/\text{L.L}$ de cultura, após 72 h de operação. A maior concentração de gás hidrogênio, 627,6 $\mu\text{mol H}_2/\text{L.L}$ de cultura ocorreu com 264 h de operação. A partir de 264 h de operação o processo estabilizou-se. A velocidade global máxima de produção de hidrogênio obtida foi de 652,9 $\mu\text{mol H}_2/\text{L.L cultura.h}$ (Figura 5.2).

Figura 5.2 Variação temporal da produção de gás hidrogênio nos reatores em batelada de enriquecimento

Porcentagens de gás hidrogênio foram detectadas no *headspace* (v/v); ou seja, 9,2% com 48 h de operação, 74,4% após 274 h e estabilização em 65,7% com 384 h de operação. Oh *et al.* (2003) utilizaram tratamento a quente do inóculo e obtiveram porcentagens elevadas de hidrogênio com variações de 57% a 72%, em 30 h de operação, utilizando glicose (3000 mg DQO/L) como fonte de carbono em reatores em batelada.

A morfologia predominante observada foi de bacilos. Esse fato pode estar relacionado com as condições impostas; ou seja, pH e pré-tratamento do inóculo. Essa evidência pode sugerir a seleção de espécies tolerantes e formadoras de endósporos. É importante salientar que, quando condições ambientais tornam-se favoráveis, cada endósporo gera uma célula vegetativa (Madigan *et al.*, 2004). O pré-tratamento realizado foi necessário porque as arqueias metanogênicas são consumidoras de gás hidrogênio e, portanto, indesejáveis no processo de produção de hidrogênio. Todavia, estão presentes na maioria dos inóculos provenientes de reatores anaeróbios. Além disso, as arqueias metanogênicas são sensíveis a pH ácido, ou seja, crescem favoravelmente em pH na faixa de 6,0 a 8,0 (Speece, 1996).

5.2 Caracterização do Consórcio Microbiano

Por meio das análises de clonagem e sequenciamento de fragmentos do gene RNAr 16S do consórcio microbiano foram obtidos 56 clones. Entretanto, alguns clones (4, 9, 13, 17, 29, 30, 32, 36, 38, 45, 46, 48, 50, 52 e 54) não foram incorporados na análise filogenética por não terem quantidades suficientes de nucleotídeos (valores inferiores a 180 nucleotídeos) para serem comparados com a base de dados (NCBI).

Os clones identificados estão descritos na Tabela 5.1. A Figura 5.3 ilustra as porcentagens dos gêneros de bactérias identificados.

Entre os clones analisados 57% foram relacionados como pertencentes aos gêneros *Clostridium*, 30% a *Burkholderia*, 8% a *Klebsiella*, além de 5% correspondendo a bactérias não cultivadas.

De acordo com Kawagoshi *et al.* (2005), as principais bactérias fermentativas produtoras de gás hidrogênio estão incluídas entre as espécies de *Enterobacter*, *Bacillus* e *Clostridium*.

Tabela 5.1 Identificação dos clones do Domínio *Bacteria*

Clones	Microrganismo	# acesso	Similaridade %	#pares de bases	Referência
1	Bactéria não cultivada	DQ497771	95	518	Benardini <i>et al.</i> (2006) Não publicado
2, 6, 15, 23, 25, 26, 35, 39, 42, 49, 56	Família <i>Clostridiaceae</i>	AB081585	97	428-579	Satoh <i>et al.</i> (2002)
3, 27, 34, 37, 43, 44, 53	<i>Burkholderia cepacia</i>	AM992063	99	456-575	Bhowal <i>et al.</i> (2008) Não publicado
5, 11, 33, 47, 55	<i>Clostridium</i> sp.	EU305673	96	478-569	Xu <i>et al.</i> (2007) Não publicado
7	<i>Burkholderia cepacia</i>	AY297787	99	515	Halda-Alija (2003)
8, 18, 28	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CP000647	99	482-526	Mc Clelland <i>et al.</i> (2006) Não publicado
10, 12, 14, 16, 19, 31, 40	Bactéria não cultivada da Família <i>Clostridiaceae</i>	AY607121	96	442-582	Lueders, <i>et al.</i> (2004)
20, 21, 22	<i>Burkholderia cepacia</i>	EU47182.1	99	480-514	Newcombe <i>et al.</i> (2008) Não publicado
24	<i>Clostridium aciditolerans</i>	DQ114945	99	527	Lee <i>et al.</i> (2007)
41	<i>Burkholderia</i> sp.	EF025926	99	339	Quyen <i>et al.</i> (2006) Não publicado
51	Bactéria não cultivada de solo	EF688391	99	395	Jia <i>et al.</i> (2007) Não publicado

Figura 5.3 Porcentagem de distribuição filogenética dos clones do consórcio microbiano da identificação de fragmentos do RNAr 16 S para o Domínio Bacteria

Cerca de 30% dos clones apresentaram similaridade com *Burkholderia* sp. (99%) e *Burkholderia cepacia* (99%).

A maioria das bactérias pertencentes ao gênero *Burkholderia* não é patogênica para animais ou saúde humana. São bacilos Gram negativos e utilizados largamente em processos de biorremediação. Compostos tóxicos como pesticidas organofosforados foram degradados por *Burkholderia* sp. (Hong *et al.*, 2007), além de benzeno, tolueno, xileno, fenol e clorofenóis (Vasconcelos *et al.*, 2006). Não há relatos dessa bactéria associados à produção de gás hidrogênio. Entretanto, é fixadora de nitrogênio, associada às raízes de plantas e pode utilizar substratos como sacarose, glicose, frutose e maltose (Muthukumarasamy *et al.*, 2006).

Os clones 3, 7, 20, 21, 22, 27, 34, 37, 43, 44 e 53 foram identificados como linhagens de *Burkholderia cepacia*. Essa espécie é encontrada comumente no solo, água, raízes de plantas e associada ao micélio de fungos (Puma, 2007). Inicialmente, foi classificada taxonomicamente como pertencente ao Gênero *Pseudomonas*. Recentemente, foi reclassificada como pertencente ao Gênero *Burkholderia*, com mais de 45 espécies catalogadas (<http://www.dzmoz.org/bactnom/general.htm>). Portanto, *Burkholderia* sp. e *Burkholderia cepacia* estiveram presentes no consórcio microbiano favorecidas pela presença de sacarose e peptona.

O clone 7 apresentou 99% de similaridade com a espécie *Burkholderia cepacia*. Essa sequência foi similar à depositada no Banco de Dados do NCBI por Halda-Alija (2003) que observou geração do ácido indol 3-acético por bactérias anaeróbicas facultativas, associadas à rizosfera de macrófitas *Juncus effusus* L, presente em sedimento de *wetland* localizado na Estação da Universidade do Mississippi (EUA). Análises filogenéticas do RNAr 16S

identificaram *Burkholderia cepacia*, bem como, representantes das famílias *Enterobacteriaceae*, *Pseudomoniaceae*, *Aeromonaceae* e *Bacillaceae* na amostra analisada.

Os clones 2, 6, 15, 23, 25, 26, 35, 39, 42, 49, 56 foram identificados com 97% de similaridade com a Família *Clostridiaceae*. Essa sequência foi similar à depositada no Banco de Dados do NCBI por Satoh *et al.* (2002), que isolaram bactérias anaeróbias acidogênicas em raízes de plantação de arroz. Os autores obtiveram afiliação filogenética dos clones com 93% de similaridade à família *Clostridiaceae*.

Os clones 8, 18 e 28 apresentaram 99% de similaridade com *Klebsiella pneumoniae*. São bacilos Gram-negativos, fixadores de nitrogênio, anaeróbios facultativos (Chen, *et al.*, 2006) e reconhecidos na literatura como geradores de gás hidrogênio (Lin *et al.*, 2008). É o mais importante membro do gênero *Klebsiella* e pode causar pneumonia, embora seja mais comum a sua implicação em infecções hospitalares (aparelho urinário e feridas), em particular em doentes imunologicamente deprimidos. Solomon *et al.* (1995) verificaram crescimento celular de *Klebsiella pneumoniae* em reatores anaeróbios em batelada alimentados com glicerol (40 g/L), meio basal acrescido de extrato de levedura (1 g/L), pH 7,0 a 33° C. Chen *et al.* (2006) estudaram o metabolismo da glicose em células de *Klebsiella pneumoniae*, sob condições anaeróbias, e observaram que a geração de H₂ está associada principalmente com a atividade da enzima nitrogenase.

Os clones 5, 11, 33, 47, 55 foram identificados como *Clostridium* sp. com 96% de similaridade. A maioria dos trabalhos descreve, como responsáveis pela produção anaeróbia do hidrogênio, espécies de *Clostridium*, bacilos Gram positivos, formadores de endósporos, os quais sobrevivem em pH próximo de 4,0 (Fang *et al.*, 2006). Produzem gás hidrogênio, ácidos orgânicos, principalmente butírico (Lin *et al.*, 2008) e álcoois a partir de carboidratos ou peptonas (Ueno *et al.*, 2001). Podem metabolizar carboidratos, álcoois, aminoácidos, purinas, esteróides e outros compostos orgânicos. São bactérias com metabolismo versátil e podem ser encontradas em sedimentos marinhos nas profundidades dos oceanos, ambientes termofílicos e no trato intestinal de animais (Lee *et al.*, 2007). Algumas espécies fixam nitrogênio atmosférico, enquanto outras realizam metabolismo fermentativo.

O clone 24 apresentou 99% de similaridade com *Clostridium aciditolerans* que são bacilos gram positivos, anaeróbios estritos e podem formar endósporos em condições adversas. Essa sequência foi similar à depositada no NCBI por Lee *et al.* (2007), que isolaram a espécie de amostra de sedimento de *wetland* que recebia efluente com sulfato. Crescimento ótimo foi observado na faixa de entre pH 4,5 a 8,9 e 35° C. Foram capazes de utilizar diversas fontes de carbono, tais como, extrato de carne, peptona, triptona, sacarose, xilose, frutose,

galactose, glicose. Não foi observado crescimento em condições aeróbias ou autotróficas. Em análises microscópicas foi observado predomínio de bacilos com endósporos.

A maioria dos clones sequenciados apresentou similaridade com espécies de *Clostridium*. Essa evidência era esperada, uma vez que as condições impostas do experimento propiciaram a permanência de bacilos Gram positivos, formadores de endósporos; que é característica de algumas bactérias produtoras de gás hidrogênio (Fang *et al.*, 2002). Ou seja; o choque térmico no inóculo, imposição do pH 5,5 contribuíram para a inibição da metanogênese. Além disso, o acréscimo de peptona, vitaminas e uréia propiciaram condições favoráveis para o crescimento do consórcio microbiano gerador de H₂.

Os clones 10, 12, 14, 16, 19, 31 e 40 apresentaram 96% de similaridade com bactéria não cultivada pertencente à Família *Clostridiaceae*. Essas sequências foram similares à obtida por Lueders *et al.* (2004). Os autores, por meio de análises filogenéticas de amostra de solo de plantação de arroz na Itália, obtiveram clones pertencentes aos Grupos *Beta-Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* e *Bacteroides*. Os autores verificaram que os membros predominantes da comunidade anaeróbia da amostra pertenciam à Família *Clostridiaceae* e estiveram envolvidos na degradação dos resíduos poliméricos da plantação de arroz.

Foi verificado também clone semelhante à bactéria não cultivada (clone 1), e bactéria não cultivada de solo (clone 51). O conhecimento dos microrganismos que estão nos ambientes depende de cultivos em laboratório com culturas puras (Pace, 1997). No entanto, menos de 1% das bactérias de diferentes ecossistemas são conhecidas (Amann, 1995); ou seja, aproximadamente 99% não foram estudadas e identificadas. Portanto, era esperado obter sequências similares a tais bactérias.

A Figura 5.4 mostra a árvore filogenética de consenso obtida com *primers* para o Domínio *Bacteria* proveniente da informação de sequências obtidas da clonagem e sequenciamento do consórcio microbiano utilizado nos reatores anaeróbios alimentados com sacarose e xilose para a produção de gás hidrogênio. Os valores dos coeficientes de similaridade verificados entre os clones e o Banco de Dados NCBI, variaram de 95 a 99% e indicaram presença de espécies relacionadas filogeneticamente, a partir da avaliação parcial de sequências do gene RNAr 16S. Foi acrescentada sequência conhecida de *Clostridium butyricum* (FJ424480), e como *out group* sequência de *Salmonella typhimurium* (NC006815).

Figura 5.4 Árvore filogenética de consenso baseada nas sequências dos clones do consórcio microbiano com *primers* para o Domínio *Bacteria*. Os valores presentes nos nós da árvore indicam a porcentagem que o ramo se repetiu (500 reamostragens de *bootstraps*).

As condições operacionais impostas no presente trabalho favoreceram a permanência dos gêneros *Klebsiella* e *Clostridium*, reconhecidos na literatura como geradores de H₂, advindos do inóculo de suinocultura. Fernandes (2008) também identificou espécies de *Clostridium* e *Klebsiella*; por meio de recorte de bandas obtidas do DGGE de amostras de reatores de leito fixo e fluxo ascendente visando a produção de gás hidrogênio, com meios suporte diferentes (argila expandida, carvão vegetal e polietileno de baixa densidade reciclável), alimentados com sacarose (890,62 mg/L), meio Del Nery, pH 5,5, a 25°C e TDHs de 0,5 h e 2,0 h. Nesse caso, o inóculo foi obtido pelo processo de fermentação natural do meio de alimentação, preparado com água de abastecimento, mantido em repouso durante 3 dias, em recipiente aberto.

Após a caracterização do consórcio microbiano obtido a partir do enriquecimento celular foram realizados ensaios de produção de hidrogênio em reatores anaeróbios em batelada alimentados com sacarose e xilose, conforme descrito a seguir.

5.3 Ensaios com reatores anaeróbios alimentados com sacarose

5.3.1 Condição (1) - 630,0 mg sacarose/L

Esse ensaio teve a duração de 28 horas com pH inicial de 5,5 e final de 4,1. A Tabela VI.1 (Apêndice VI) e Figura 5.5 resumizam os valores de crescimento celular (ABS_{600} e SSV) dos reatores anaeróbios.

Figura 5.5 Crescimento microbiano nos reatores anaeróbios da condição (1) com 630,0 mg sacarose/L

O crescimento microbiano, com consequente consumo de sacarose e geração de produtos intermediários, tais como ácidos graxos voláteis, ocorreram nas primeiras horas experimentais. Não ocorreu, nesse caso, fase *lag* de crescimento microbiano. Ou seja, a biomassa não sofreu inibição com a concentração do substrato que foi imposta e não foi necessário adaptar-se a essa condição.

O comportamento do crescimento microbiano está ilustrado na Figura 5.5. Após 6,5 h de operação, o crescimento microbiano foi três vezes maior ($ABS_{600} = 0,09$ e $0,23$ g SSV/L)

em relação ao início do experimento ($ABS_{600} = 0,03$ e $0,07$ g SSV /L). O crescimento microbiano máximo ocorreu após o período de 8 h ($ABS_{600} = 0,10$ e $0,26$ g SSV/L); a partir desse período, ocorreu a estabilização do crescimento da biomassa.

A sacarose foi consumida rapidamente. Após 2 h de operação havia 530,4 mg/L; o que significou 16% de consumo de sacarose e, com 6,5 h de operação foi observado 56% de consumo (275,3 mg sacarose/L). Durante 28 h de operação dos reatores anaeróbios houve consumo de 80,4 % de sacarose, para concentração inicial de 630,0 mg/L, conforme ilustrado na Figura 5.6 e Tabela VI.1(Apêndice VI). Após 2 h havia geração de 63,6 $\mu\text{mol/L}$ de gás hidrogênio nos reatores. A partir de 13 h de operação a produção de gás hidrogênio começou estabilizar (2551 $\mu\text{mol/L}$) e, ao mesmo tempo, ocorreu redução na geração de ácido acético (93,3 mg/L). A geração de ácido acético foi diretamente proporcional à produção de gás hidrogênio nos reatores anaeróbios.

Figura 5.6 Variação temporal do consumo de sacarose dos reatores anaeróbios da condição (1) com 630,0 mg sacarose/L

A velocidade global de consumo de sacarose foi de 0,255 mmol sacarose/L.h e ocorreu no período de 3,5 a 5,0 h (Figura 5.6). A velocidade global específica de produção de gás hidrogênio foi de 2147,29 $\mu\text{mol H}_2/\text{g SSV.h}$ e ocorreu em 5 h de operação (Figura 5.7).

Figura 5.7 Velocidade global específica da produção de gás H₂ dos reatores anaeróbios da condição (1) com 630,0 mg sacarose/L

O rendimento de sacarose a hidrogênio foi de 1,2 mols H₂/mol sacarose. A eficiência de conversão estequiométrica de sacarose, através da via de ácido acético gera 8 mols de H₂, como descrito anteriormente. De acordo com os valores experimentais obtidos, a eficiência de conversão de sacarose a H₂ foi de 15%, quando comparada aos valores teóricos.

A Tabela 5.2 sumariza os valores dos produtos intermediários gerados, como ácidos graxos voláteis, acetona, metanol, etanol e gás hidrogênio no *headspace* dos reatores anaeróbios.

A geração de gás hidrogênio foi detectada com 2 h de operação (63,3 μmol/L), conforme descrito na Tabela 5.2. A geração máxima de H₂ ocorreu com 28 h de operação (2683,2 μmol/L), com 28,6% de H₂ e 0,068 atm de pressão parcial de H₂ (Tabela VI.2) no *headspace* dos reatores anaeróbios.

Tabela 5.2 Variação temporal dos produtos intermediários gerados nos reatores anaeróbios da condição (1) com 630,0 mg sacarose/L

Tempo (h)	Ac. Acético (mg/L)	Ac. Butírico (mg/L)	Acetona (mg/L)	Metanol (mg/L)	Etanol (mg/L)	H₂ (μmol/L)
0	4,7	1,1	15,4	20,7	16,9	≤ l.d.
2	-	-	-	-	-	63,6
3,5	30,7	0,5	15,4	20,7	22,0	335,5
5	41,5	0,6	15,4	20,7	26,4	915,7
6,5	-	1,2	-	-	-	1441,5
8	74,3	0,9	15,4	20,7	31,5	1725,2
9,5	95,5	≤ l.d.	15,4	20,7	32,3	2231,3
11	114,1	≤ l.d.	15,4	20,7	36,7	2282,8
13	93,3	≤ l.d.	15,4	20,7	36,1	2551,0
15	131,5	1,1	15,4	20,7	35,0	2550,6
28	121,8	≤ l.d.	15,4	20,7	42,5	2683,2

(-) análise não realizada. l.d. = limite de detecção (acético = 3,7 mg/L; butírico = 0,45 mg/L; acetona = 2 mg/L; etanol = 2 mg/L; metanol = 2 mg/L; H₂ = 0,0183 μmol/L).

Nesse ensaio, parte da matéria orgânica foi transformada em ácidos voláteis, com as concentrações máximas de 131,5 mg/L e 1,1 mg/L, no período de 15 h, para ácido acético e ácido butírico, respectivamente (Tabela 5.2). Embora outros compostos orgânicos tenham contribuído para manutenção das fontes de carbono nos reatores, tais como peptona, vitaminas e álcoois; a sacarose foi o principal substrato para a degradação metabólica a ácidos graxos voláteis, tais como acético, butírico, álcoois, acetona e gás hidrogênio. Não foi detectado metano nos reatores desse experimento. A pressão parcial máxima causada pela geração de gás hidrogênio, exercida no *headspace*, foi de 0,068 atm (Tabela VI.2).

A Figura 5.8 ilustra as porcentagens dos ácidos graxos voláteis gerados em função do tempo. Com 15 h de operação, as porcentagens de ácidos graxos voláteis gerados foram de 99,2% (ácido acético) e 0,8% (ácido butírico).

As concentrações de ácido butírico apresentaram-se muito reduzidas com valores de 0,5 a 1,5 mg/L. Quase que a totalidade de ácidos gerados foi relacionada com ácido acético, atingindo concentrações de 131,5 mg/L em 15 h de operação.

Figura 5.8 Variação temporal das proporções de ácidos voláteis nos reatores anaeróbios para a condição (1) com 630,0 mg sacarose/L

A Figura 5.9 ilustra as porcentagens geradas de álcoois e acetona em cada amostragem realizada, nos reatores anaeróbios para a condição (1). Com 14,5 h de operação foram observados 21,7% de acetona, 49,2% de etanol e 29,1% de metanol.

Figura 5.9 Variação temporal das proporções de acetona, metanol e etanol nos reatores anaeróbios da condição (1) com 630,0 mg sacarose/L

Nesse caso, as concentrações de acetona e metanol mantiveram-se constantes durante 28 horas de operação, conforme descrito na Tabela 5.2 e foram respectivamente de 15,4 mg/L e 20,8 mg/L. Contrariamente, a geração de etanol foi aumentando, gradativamente em todo período de operação dos reatores anaeróbios. A geração máxima de etanol, 42,5 mg/L, foi obtida com 28 h de operação.

5.3.2 Condição (2) - 1184,0 mg sacarose/L

Nesse experimento, os reatores anaeróbios foram operados no período de 96 h com valores iniciais e finais de pH de, respectivamente, 5,5 e 4,0. A Tabela VI.3 (Apêndice VI) sumariza o comportamento do crescimento celular (ABS_{600} e SSV) e consumo da sacarose.

O crescimento microbiano ocorreu nas primeiras horas de operação e se prolongou até o período de 18 h (Figura 5.10). A fase *lag* teve duração de 5 h. Valores iniciais de ABS_{600} de 0,035 e 0,084 g SSV/L passaram para 0,077 e 0,197 g SSV/L, respectivamente, com 10 h de operação.

Figura 5.10 Crescimento microbiano nos reatores anaeróbios da condição (2) com 1184,0 mg sacarose/L

O crescimento microbiano máximo foi observado com 18 h de operação ($ABS_{600} = 0,115$ e $0,304$ g SSV/L). A partir de 20 h de operação a cultura entrou na fase estacionária ($ABS_{600} = 0,115$ e $0,304$ g SSV/L).

Foi observado fase *lag* no consumo de sacarose até 4 h de operação (Figura 5.11).

Figura 5.11 Variação temporal do consumo de sacarose nos reatores anaeróbios da condição (2) com 1184,0 mg sacarose/L

Após 8 h de operação, foram obtidos 1065,2 mg/L de sacarose o que significou 9% de consumo. As concentrações finais de sacarose (197,4 mg/L) foram verificadas com 40 h de operação demonstrando a ocorrência de 87,2% do consumo das concentrações iniciais (1184,0 mg/L). A velocidade global de consumo de sacarose foi de 0,16 mmol sacarose/L.h e ocorreu no período de 8 a 12 h.

A geração de gás hidrogênio teve início com 8 h de operação ($47,7 \mu\text{mol/L}$). A partir de 48 h de operação, ocorreram concentrações máximas de H_2 no *headspace* iguais a $4576,2 \mu\text{mol/L}$, conforme Tabela 5.3 que sumariza os produtos intermediários, tais como; ácidos graxos voláteis, acetona, metanol, etanol e gás hidrogênio.

Tabela 5.3 Variação temporal dos produtos intermediários gerados nos reatores anaeróbios da condição (2) com 1184,0 mg sacarose/L

Tempo (h)	Ac. Acético (mg/L)	Ac. Butírico (mg/L)	Acetona (mg/L)	Metanol (mg/L)	Etanol (mg/L)	H₂ (μmol/L)
0	≤ l.d.	≤ l.d.	15,4	20,8	16,4	≤ l.d.
2	-	-	-	-	-	≤ l.d.
4	5,2	≤ l.d.	15,4	20,8	16,4	≤ l.d.
6	-	≤ l.d.	-	-	-	≤ l.d.
8	14,9	≤ l.d.	15,4	20,9	18,3	47,7
10	-	≤ l.d.	-	-	-	192,1
12	44,3	≤ l.d.	15,4	20,9	21,3	449,6
14	-	-	-	-	-	608,6
16	95,5	≤ l.d.	15,4	20,9	28,4	833,0
18	-	-	-	-	-	1067,3
20	112,4	≤ l.d.	15,4	21,8	22,9	1245,7
23	-	-	-	-	-	1424,1
25	146,6	≤ l.d.	15,4	28,3	35,5	2175,4
28	-	-	-	-	-	3144,2
30	117,3	3,1	15,4	29,1	39,6	3236,1
32	-	-	-	-	-	3328,1
34	117,2	≤ l.d.	15,4	23,7	36,3	3232,6
40	112,8	≤ l.d.	15,4	18,6	46,2	3110,4
48	-	-	-	-	-	4576,2
74	-	-	-	-	-	3523,0
96	-	-	-	-	-	4032,1

(-) análise não realizada l.d. = limite de detecção (acético = 3,7 mg/L; butírico = 0,45 mg/L; H₂ = 0,0183 μmol/L; acetona = 2 mg/L; etanol = 2 mg/L; metanol = 2 mg/L).

A velocidade global específica de produção de H₂ foi de 3201,59 μmol H₂/g SSV.h e ocorreu com 28 h de operação (Figura 5.12).

As porcentagens de H₂ geradas no *headspace* variaram de 0,6% a 43,8% para 8 h e 48 h, respectivamente (Tabela VI.4 – Apêndice VI).

A pressão parcial máxima de H₂ nos reatores anaeróbios oscilou entre 0,001 atm (8 h de operação) e 0,116 atm, durante o período de 48 h (Tabela VI.4 – Apêndice VI).

Figura 5.12 Velocidade global específica de produção de gás H_2 nos reatores anaeróbios da condição (2) com 1184,0 mg sacarose/L

O rendimento de sacarose a hidrogênio foi de 1,6 mols H_2 /mol de sacarose. Esses resultados indicaram a eficiência de conversão de sacarose a hidrogênio de 20%, quando comparada à eficiência estequiométrica teórica.

Os ácidos gerados foram acético e butírico. O ácido butírico foi detectado somente após 30 horas de operação (3,1 mg/L); nas demais amostragens seus valores foram abaixo do limite de detecção (0,45 mg/L).

Portanto, parte da matéria orgânica foi transformada em ácidos voláteis; principalmente ácido acético com concentrações máximas no período de 25 h que foram de 146,6 mg/L. Também foi detectado ácido butírico (3,1 mg/L com 30 h de operação), além de álcoois, acetona e H_2 .

A Figura 5.13 ilustra as porcentagens dos ácidos graxos voláteis gerados em função do tempo. Praticamente a totalidade de ácido formada nos reatores anaeróbios foi de ácido acético. Com 15 h de operação as porcentagens de ácidos graxos voláteis gerados foram de 97,4% (ácido acético) e 2,6% (ácido butírico).

Figura 5.13 Variação temporal das proporções de ácidos voláteis nos reatores anaeróbios da condição (2) com 1184,0 mg sacarose/L

A Figura 5.14 ilustra a geração de acetona, metanol e etanol nos reatores anaeróbios para a condição (2).

Figura 5.14 Variação temporal das proporções de acetona, metanol e etanol nos reatores anaeróbios da condição (2) com 1184,0 mg sacarose/L

Com 15 h de operação foram observados 21,7% de acetona, 49,2% de etanol e 29,1% de metanol. As concentrações de acetona mantiveram-se constantes durante toda operação (15,4 mg/L). As concentrações iniciais de metanol foram de 20,8 mg/L e, com 40 h foram obtidos 18,6 mg/L o que significou 10,6% de consumo. Contrariamente, a geração de etanol foi aumentando, gradativamente em todo período de operação dos reatores anaeróbios. A geração máxima de etanol, 46,2 mg/L, foi obtida com 40 h de operação.

Esses resultados confirmaram a rota de degradação metabólica da sacarose a ácidos graxos voláteis, tais como, acético, butírico, álcoois e gás hidrogênio.

5.3.3 Condição (3) - 1816,0 mg sacarose/L

Os reatores da condição (3) foram operados durante o período de 168 h com pH inicial e final de 5,5 e 4,6 respectivamente. A Tabela VI.5 (Apêndice VI) sumariza o crescimento celular (ABS_{600} e SSV), ilustrado na Figura 5.15 e consumo da sacarose (Figura 5.16).

Figura 5.15 Crescimento microbiano nos reatores anaeróbios da condição (3) com 1816,0 mg sacarose/L

Figura 5.16 Variação temporal do consumo da sacarose nos reatores anaeróbios da condição (3) com 1816,0 mg sacarose/L

No início do ensaio as concentrações de SSV foram de 0,07 g/L ($ABS_{600} = 0,03$). As concentrações máximas ocorreram em 83 h e foram de 0,49 g SSV/L. O aumento de SSV em função do tempo foi relacionado com o crescimento da biomassa presente nos reatores anaeróbios. O crescimento bacteriano foi diretamente proporcional ao consumo de sacarose com geração dos produtos intermediários que foram ácidos graxos voláteis, acetona, álcoois e hidrogênio. A partir de 96 h de operação iniciou-se a fase de declínio. Nesse caso, ocorreu estabilização do consumo de sacarose e, conseqüentemente, diminuição da geração dos ácidos e gás hidrogênio.

O consumo de sacarose variou de 1816,0 mg/L no início da operação a 200,9 mg/L em 168 h, o que representou 89% de consumo.

Após 24 h de operação foram detectados 1737,5 mg/L de sacarose, o que significou 25% de consumo e, com 96 h de operação foi verificado 75,5% de consumo de sacarose (444,7 mg/L).

Esse fato foi relacionado com o crescimento exponencial microbiano, que atingiu seu ápice com 83 h de operação (0,49 g SSV/L), ilustrado na Figura 5.15.

A geração de gás hidrogênio foi detectada com 48 h de operação (409 $\mu\text{mol/L}$), conforme Tabela 5.4 que sumariza as concentrações dos produtos intermediários, tais como;

ácidos graxos voláteis, acetona, metanol e etanol, além do gás hidrogênio. A partir de 114 h de operação ocorreram concentrações máximas de H_2 no *headspace* iguais a 19159,6 $\mu\text{mol/L}$.

Tabela 5.4 Variação temporal dos produtos intermediários gerados nos reatores anaeróbios para a condição (3) com 1816,0 mg sacarose/L.

Tempo (h)	Ac. Acético (mg/L)	Ac. Butírico (mg/L)	Ac. Iso-butírico (mg/L)	Ac. Iso-valérico (mg/L)	Ac. Propiônico (mg/L)	Acetona (mg/L)	Etanol (mg/L)	Metanol (mg/L)	H_2 ($\mu\text{mol/L}$)
0	≤ l.d.	≤ l.d.	≤ l.d.	0	≤ l.d.	15,4	16,4	20,7	≤ l.d.
24	131,2	3,7	5,2	13,4	≤ l.d.	15,4	17,4	20,8	≤ l.d.
30	-	-	-	-	-	-	-	-	≤ l.d.
48	297,5	13,4	10,1	23,2	2,5	15,5	17,0	20,8	409,0
72	442,7	66,0	10,7	22,5	3,3	15,5	26,3	21,9	1605,5
77	-	-	-	-	-	-	-	-	4362,6
92	488,5	203,2	11,2	22,3	3,1	15,6	31,7	22,0	5767,2
106	420,4	199,4	9,4	18,4	2,6	15,5	27,0	21,5	9470,8
110	-	-	-	-	-	-	-	-	9278,7
114	-	-	-	-	-	-	-	-	19159,6
120	537,0	237,7	10,3	19,8	2,9	15,5	26,8	21,3	17635,5
133	-	-	-	-	-	-	-	-	15424,2
140	-	-	-	-	-	-	-	-	14335,0
168	526,9	252,5	11,2	22,8	3,0	15,8	24,9	21,2	13058,5

(-) análise não realizada l.d. = limite de detecção (acético = 3,7 mg/L; butírico = 0,45 mg/L; isobutírico = 1,5 mg/L; isovalérico = 0,46 mg/L; propiônico = 1,5 mg/L; H_2 = 0,0183 $\mu\text{mol/L}$; acetona = 2 mg/L; etanol = 2 mg/L; metanol = 2 mg/L).

As porcentagens de H_2 geradas no *headspace* (v/v) variaram de 2,7% a 56,3% para 24 h e 140 h, respectivamente (Tabela VI.6 – Apêndice VI). A pressão parcial de H_2 nos reatores anaeróbios oscilaram entre 0,003 atm (24 h de operação) e 0,488 atm, durante o período de 114h (Tabela VI.6).

No período de 72 h a 92 h foi verificado que a velocidade global de consumo de sacarose foi de 0,11 mmol de sacarose /L.h.

Após 106 h de operação a velocidade global específica de produção de hidrogênio foi de 10059,5 $\mu\text{mol } H_2/\text{g de SSV.h}$ (Figura 5.17).

Figura 5.17 Velocidade global específica de produção de gás H₂ nos reatores anaeróbios da condição (3) com 1816,0 mg sacarose/L

O rendimento de sacarose a hidrogênio foi de 1,2 mols H₂/mol de sacarose.

Esses resultados demonstraram que a eficiência de conversão de sacarose a hidrogênio foi de 15%, quando comparada à eficiência estequiométrica teórica.

A Figura 5.18 ilustra a variação temporal das proporções de ácidos voláteis gerados em função do tempo. Com 120 h de operação as porcentagens de ácidos graxos voláteis gerados foram de 66,5% (ácido acético), 29,4% (ácido butírico), 1,3% (ácido isobutírico), 2,5% (ácido isovalérico) e 0,4% (ácido propiônico).

Nesse ensaio, parte da matéria orgânica foi transformada nos seguintes ácidos voláteis, com as seguintes concentrações máximas no período de 120 h: acético (537,0 mg/L), butírico (237,7 mg/L), isobutírico (10,3 mg/L), isovalérico (19,8 mg/L) e propiônico (2,9 mg/L).

Figura 5.18 Variação temporal das proporções de ácidos voláteis gerados nos reatores anaeróbios da condição (3) com 1816,0 mg sacarose/L

Os ácidos orgânicos gerados foram, principalmente, acético (64,8% a 86,4%) e butírico (2,4% a 31,4%). Até 72 horas de operação as proporções de ácido acético foram 84,5% e de ácido butírico 6,2%; a partir de 96 h foram verificados 65,9% de ácido acético e 29,8% de ácido butírico.

O aumento nas proporções de ácido butírico foi diretamente proporcional ao consumo de sacarose e, conseqüente produção de gás hidrogênio.

Esse comportamento confirma que a sacarose foi primeiramente convertida a ácido acético (até 48 h) e, posteriormente a ácido butírico, onde ocorreram as maiores proporções de consumo de sacarose com produções de gás hidrogênio.

Com a imposição das concentrações iniciais de sacarose de 1816,0 mg/L, portanto superiores às condições (1) e (2) foram detectadas gerações de ácido propiônico, em concentrações reduzidas. Para a formação de ácido propiônico há consumo de H_2 e, portanto, indesejável para o processo estudado. Entretanto, tal ocorrência não foi percebida porque a manutenção do pH inferior a 5,5 favoreceu a rota metabólica da sacarose para formações de ácido acético e butírico. A formação de ácido propiônico é favorecida em pH próximo de 7 (Horiuchi *et al.*, 2002).

A Figura 5.19 mostra a geração de acetona, metanol e etanol nos reatores anaeróbios para a condição (3). Com 92 h de operação foram observados 22,5% de acetona, 45,7% de etanol e 31,8% de metanol.

Figura 5.19 Variação temporal das proporções de acetona, metanol e etanol gerados nos reatores anaeróbios da condição (3) com 1816,0 mg sacarose/L

Nesse caso, as concentrações de acetona e metanol mantiveram-se constantes durante 168 horas de operação. Contrariamente, a geração de etanol foi aumentando, gradativamente em todo período de operação dos reatores anaeróbios, como ocorrido para as condições (1) e (2). A geração máxima de etanol, 31,7 mg/L, foi obtida com 92 h de operação.

5.3.4 Condição (4) - 4128,0 mg sacarose/L

Nessa condição, os reatores anaeróbios foram operados durante 222 h com pH inicial e final de 5,5 e 3,8 respectivamente. A Tabela VI.7 (Apêndice VI) sumariza o comportamento do crescimento celular (ABS_{600} e SSV) e consumo da sacarose.

O crescimento microbiano foi muito lento. Após 17,5 h de operação foi observado aumento no crescimento microbiano ($ABS_{600} = 0,08$ e SSV = 0,21 g/L). Esse fato pode ser devido às concentrações de sacarose que foram mais elevadas do que as condições estudadas anteriormente, conforme ilustrado na Figura 5.20.

Figura 5.20 Crescimento microbiano nos reatores anaeróbios da condição (4) com 4128,0 mg sacarose/L

Provavelmente, sob tais condições com elevada concentração de sacarose, o crescimento bacteriano inicial foi devido à adição de peptona. Por conseguinte, favorecendo o crescimento de espécies que não estiveram envolvidas na geração de H_2 , tais como, espécies de *Burkholderia*.

Após o período de adaptação, com 185,5 h de operação ($ABS_{600} = 0,12$ e $SSV = 0,32$ g/L) o consórcio microbiano gerador de H_2 consumiu sacarose, cresceu e gerou H_2 . Nesse período, provavelmente, foram favorecidas espécies de *Clostridium* e *Klebsiella*, que são reconhecidas na literatura como produtoras desse gás. Crescimento microbiano máximo foi observado após 201,5 h de operação ($ABS_{600} = 0,13$ e $SSV = 0,34$ g/L).

O crescimento bacteriano foi diretamente proporcional ao consumo de sacarose com geração dos produtos intermediários que foram os ácidos graxos voláteis e hidrogênio. A partir de 219,5 h de operação iniciou-se o período de morte celular; nesse caso ocorreu a estabilização do consumo de sacarose e, consequentemente, diminuição da geração dos ácidos e gás hidrogênio.

O consumo de sacarose foi de 71%; ou seja, de 4128,0 mg/L no início da operação a 1219,3 mg/L em 222 h. Após 17,5 h de operação foram detectados 3682,5 mg sacarose/L.

Após 29,5 h de operação, apenas 10% das concentrações iniciais de sacarose foram consumidas, sendo observado 3712,5 mg sacarose/L. Com 185,5 h (3566,9 mg sacarose/L) de operação foram observados consumos de sacarose de 66,4% das concentrações iniciais, conforme ilustrado na Figura 5.21 e Tabela VI.7 (Apêndice VI). No período de 162 h a 186 h foi verificado que a velocidade máxima de consumo de sacarose que foi de 0,11 mmol de sacarose/L.h.

Figura 5.21 Variação temporal do consumo de sacarose nos reatores anaeróbios da condição (4) com 4128,0 mg sacarose/L

A maior produção de gás hidrogênio, 8226,3 $\mu\text{mol H}_2/\text{L}$, ocorreu com 219,5 horas de operação. Após 25 h de operação havia 855,7 $\mu\text{mol H}_2/\text{L}$. As porcentagens mais elevadas de gás hidrogênio no *headspace* (v/v) foram de 19,9% e a pressão parcial máxima de H_2 exercida nos reatores anaeróbios foram de 0,062 atm, com 222 h de operação (Tabela VI.8 – Apêndice VI). A velocidade global específica máxima de produção de hidrogênio foi de 2663,1 $\mu\text{mol H}_2/\text{g de SSV.h}$ e ocorreu com 209 h de operação (Figura 5.22).

Figura 5.22 Velocidade global específica da produção de gás hidrogênio nos reatores anaeróbios da condição (4) com 4128,0 mg sacarose/L.

O rendimento de sacarose a hidrogênio foi de 0,3 mols H₂/mol de sacarose. Esses resultados demonstraram que a eficiência de conversão de sacarose a hidrogênio foi de 4%, quando comparada à eficiência estequiométrica teórica.

A Tabela 5.5 sumariza as concentrações dos produtos intermediários, tais como, ácidos graxos voláteis, acetona, metanol e etanol, além do gás hidrogênio.

Semelhante aos ensaios anteriores, parte da matéria orgânica foi transformada nos seguintes ácidos voláteis, com concentrações máximas no período de 185,5 h: acético (204,7 mg/L), butírico (281,3 mg/L), isobutírico (0,4 mg/L) e isovalérico (4,9 mg/L).

A Figura 5.23 mostra a geração de ácidos graxos voláteis gerados. Com 162 h de operação as porcentagens de ácidos graxos voláteis gerados foram de 43,3% (ácido acético), 55,3% (ácido butírico), 0,1% (ácido isobutírico) e 1,3% (ácido isovalérico).

A Figura 5.24 mostra a geração de acetona, metanol e etanol nos reatores anaeróbios para a condição (4). Com 162 h de operação, foram observados 27,1% de acetona, 36,6% de etanol e 36,3% de metanol.

Tabela 5.5 Variação temporal dos produtos intermediários gerados nos reatores anaeróbios da condição (4) com 4128,0 mg sacarose/L

Tempo (h)	Ac. Acético (mg/L)	Ac. Butírico (mg/L)	Ac. Iso-butírico (mg/L)	Ac. Iso-valérico (mg/L)	Ac. Propiônico (mg/L)	Acetona (mg/L)	Etanol (mg/L)	Metanol (mg/L)	H ₂ (μmol/L)
0	2,3	≤ l.d.	≤ l.d.	1,1	≤ l.d.	15,4	16,4	20,7	≤ l.d.
17,5	52,1	≤ l.d.	0,3	4,3	≤ l.d.	15,4	19,6	20,8	284,1
21,5	-	-	-	-	-	-	-	-	548,9
25,0	-	-	-	-	-	-	-	-	855,7
29,5	67,5	0,3	0,4	5,0	≤ l.d.	15,4	19,9	21,0	702,8
41,5	80,6	4,4	0,5	5,6	≤ l.d.	15,4	18,7	20,8	593,1
46,0	-	-	-	-	-	-	-	-	903,9
65,5	90,1	7,2	0,5	4,8	≤ l.d.	15,4	19,1	20,7	335,3
74,0	-	-	-	-	-	-	-	-	202,2
89,5	71,9	9,1	0,6	4,7	≤ l.d.	15,4	19,8	20,6	66,3
98,0	83,3	12,2	0,5	5,5	≤ l.d.	15,4	18,4	20,7	-
114,0	64,1	11,9	0,3	4,2	≤ l.d.	15,5	22,2	20,8	-
153,5	-	-	-	-	-	-	-	-	350,8
162,0	172,4	219,9	0,5	5,0	≤ l.d.	15,5	21,0	20,8	477,3
185,5	204,7	281,3	0,4	4,9	≤ l.d.	15,6	23,0	20,9	1286,2
201,5	-	-	-	-	-	-	-	-	2900,2
209,0	-	-	-	-	-	-	-	-	6005,0
219,5	-	-	-	-	-	-	-	-	8226,3
222	-	-	-	-	-	-	-	-	8038,0

(-) análise não realizada. l.d. = limite de detecção (acético = 3,7 mg/L; butírico = 0,45 mg/L; isobutírico = 1,5 mg/L; isovalérico = 0,46 mg/L; propiônico = 1,5 mg/L; H₂ = 0,0183 μmol/L; acetona = 2 mg/L; etanol = 2 mg/L; metanol = 2 mg/L).

Nesse caso, as concentrações de acetona e metanol mantiveram-se constantes durante 185,5 horas de operação. Contrariamente, a geração de etanol foi aumentando, gradativamente em todo período de operação dos reatores anaeróbios, como ocorrido nas condições anteriores (1, 2 e 3). A geração máxima de etanol, 23,0 mg/L, foi obtida com 185,5 h de operação.

Figura 5.23 Variação temporal das proporções de ácidos voláteis gerados nos reatores anaeróbios da condição (4) com 4128,0 mg sacarose/L

Figura 5.24 Variação temporal das proporções acetona, metanol e etanol nos reatores anaeróbios da condição (4) com 4128,0 mg sacarose/L

5.3.5 Análise da diversidade microbiana

A Figura 5.25 ilustra a diversidade morfológica microbiana detectada nos reatores anaeróbios alimentados com sacarose.

Figura 5.25 Microscopia de contraste de fase e luz comum da biomassa dos reatores anaeróbios alimentados com sacarose: (a) bacilos e bacilo com endósporo terminal; (b) bacilos com endósporos; (c) bacilos Gram positivos e Gram negativos; (d) bacilos

As análises microscópicas revelaram a predominância de bacilos, endósporos e bacilos com endósporos. A coloração de Gram revelou predomínio de bacilos Gram positivos e presença de Gram negativos para todos os reatores anaeróbios alimentados com sacarose.

A Figura 5.26 apresenta o perfil das bandas de DGGE no final dos ensaios realizados com amostras dos reatores anaeróbios alimentados com sacarose.

Figura 5.26 Perfil das bandas de DGGE de amostras dos reatores anaeróbios alimentados com sacarose com *primer* específico para o Domínio *Bacteria*; (A) 630,0 mg sacarose/L; (B) 1184,0 mg sacarose/L; (C) 1816,0 mg sacarose/L e; (D) 4128,0 mg sacarose/L. % do gradiente em gel desnaturante: 30% - 70%

Embora o inóculo tenha sido purificado, se observa o predomínio de diversas bandas. Esse fato comprovou que o pré-tratamento do inóculo e a imposição do pH selecionaram algumas espécies de bactérias, as quais permaneceram nas condições impostas do experimento. As bandas enumeradas foram recortadas e identificadas conforme descrito na Tabela 5.6.

Enterobacter cloacae foi identificada para as condições (1) 630,0 mg sacarose/L (banda 1) e (2) 1184,0 mg sacarose/L (banda 3) com 98% e 97% de similaridade, respectivamente. As bandas 1 e 3 foram consideradas semelhantes e, para as condições impostas, essa bactéria foi um dos microrganismos presentes no inóculo e responsável pela geração de H_2 . Feng *et al.* (2006, não publicado) constatarem a sequência referente a banda 1 e 3 na identificação de bactérias em amostras contendo fosfato mineral. Kumar *et al.* (2000) inocularam reatores anaeróbios em batelada com *Enterobacter cloacae*, bactéria Gram negativa, anaeróbia facultativa e obtiveram rendimentos de 6 mols H_2 /mol de sacarose a pH 6,0 e 36°C. Essa bactéria também produziu H_2 com glicose (2,2 mols H_2 /mol glicose) e celobiose (5,4 mol H_2 /mol celobiose).

Tabela 5.6 Identificação das bandas recortadas do DGGE dos reatores anaeróbios alimentados com sacarose, por meio do sequenciamento de fragmentos do RNAr 16S

Banda	Microrganismo	# acesso	Similaridade %	# pares de bases	Referência
1	<i>Enterobacter cloacae</i>	EF120473.1	98	252	Feng (2006). Não publicado
2	<i>Burkholderia cepacia</i>	DQ387437.1	98	238	Muthukumarasamy <i>et al.</i> (2007)
3	<i>Enterobacter cloacae</i>	EF059865.1	97	203	Iversen <i>et al.</i> (2007)
4	<i>Clostridium</i> sp.	DQ196619.1	90	263	Bowman <i>et al.</i> (2006)
5	<i>Clostridium</i> sp.	AY862512.1	98	236	Fang <i>et al.</i> (2006)
6	<i>Clostridium acetobutyricum</i>	U17030.1	96	248	Keis <i>et al.</i> (1995)

A banda 2 foi identificada como *Burkholderia cepacia* com 98% de similaridade. Essa banda presente na condição (1) 630,0 mg sacarose/L, se repetiu para as condições (2) 1184,0 mg sacarose/L e (4) 4128,0 mg sacarose/L. Muthukumarasamy *et al.* (2007) identificaram essa bactéria em amostra de solo alagado de plantação de arroz e puderam comprovar sua habilidade na fixação de nitrogênio, associada à raízes de plantas. Portanto, a espécie *Burkholderia cepacia* esteve presente nos reatores anaeróbios, para as três condições estudadas, provavelmente, favorecida pela presença de sacarose e peptona; além de ser uma espécie resistente, utilizada largamente em processos de biorremediação (Hong *et al.*, 2007); em ambientes contaminados por organofosforados e pentaclorofenóis (Vasconcelos *et al.*, 2006), conforme descrito anteriormente.

A banda 3 foi identificada como *Enterobacter cloacae* com 97% de similaridade. Essa sequência foi similar à depositada no Banco de Dados do NCBI por Iversen *et al.* (2007). Os autores descreveram a espécie *Enterobacter sakazakii*, com proximidade genética e fenotípica à *Enterobacter cloacae*. Nesse estudo, foi observada mobilidade a 37° C em meio nutritivo contendo triptona (10g/L); geração de ácidos a partir de D-sacarose, D-celobiose, D-rafinol, geração de gás a partir de glicose e crescimento em 24 h a partir de solução aquosa contendo peptona.

As bandas 4 e 5 foram identificadas como populações semelhantes à *Clostridium* sp. Fang *et al.* (2006) identificaram espécies de *Clostridium* sp. em reatores em batelada, operados em pH 4,5 e 37°C, com inóculo de digestor anaeróbio municipal de beneficiamento de arroz pré-tratado a quente, fonte de carbono presente na água residuária de tratamento de

arroz (5,5 g/L) e meio basal acrescido de extrato de levedura (50 mg/L). Bowman *et al.* (2006), identificaram espécies de *Clostridium* sp. em aquífero contaminado por petróleo em Baton Rouge, Luisiana e pH 5,1. Análises filogenéticas realizadas revelaram que os clones seqüenciados tiveram relação com microrganismos capazes de efetuar descloração, fermentadores e produtores de gás hidrogênio.

A sequência referente à banda 6 foi similar em 96% a *Clostridium acetobutyricum*. Essa banda se repetiu em menor intensidade na condição (C) 1816,0 mg sacarose/L. Essa evidência era esperada uma vez que as condições impostas do experimento propiciaram a permanência de bacilos Gram positivos, formadores de endósporos; que é característica de algumas bactérias produtoras de gás hidrogênio (Fang, 2002). Espécies de *Clostridium acetobutyricum* são capazes de produzir butanol e outros solventes como acetona, isopropanol e etanol durante seu crescimento (Keis *et al.*, 1995). Portanto, essa bactéria esteve presente no consórcio microbiano e contribuiu pelas gerações de etanol, iso-butanol nos reatores anaeróbios para as condições estudadas.

As bandas (1) e (3) apresentaram similaridade com *Enterobacter cloacae* e foram evidenciadas nos ensaios com concentrações mais reduzidas de sacarose (630 mg sacarose/L e 1184,0 mg sacarose/L). A banda (2) foi similar a *Burkholderia cepacia* e apresentou intensidade forte no ensaio (1) com 630 mg sacarose/L, ou seja, em concentrações mais reduzidas de substrato. Essa banda se repetiu nos ensaios com concentrações mais elevadas de sacarose ((2) 1184,0 mg sacarose/L e (4) 4128,0 mg sacarose/L), conforme descrito anteriormente, porém em intensidade fraca. As bandas (5) e (6) que foram similares a espécies de *Clostridium* tiveram intensidade enfraquecida nos ensaios com concentrações reduzidas de substrato ((1) 630 mg sacarose/L e (2) 1184,0 mg sacarose/L) e, foram mais fortemente evidenciadas nos ensaios onde as concentrações de substrato foram mais elevadas ((3) 1816,0 mg sacarose/L e (4) 4128,0 mg sacarose/L). Através dessas observações foi possível concluir que espécies de *Enterobacter cloacae* foram favorecidas nos ensaios de concentrações reduzidas de substrato e, portanto responsáveis pela geração de H₂ nessa condição operacional. Contrariamente, espécies de *Clostridium* foram favorecidas nos ensaios com concentrações mais elevadas de sacarose e, portanto, geradores de H₂ nessas condições, confirmando a evidência da literatura, onde bactérias identificadas com *Clostridium* são as responsáveis pela geração de H₂ a partir de concentrações elevadas de substrato.

Zhang *et al.* (2006) utilizaram cultura pura de *Clostridium acetobutyricum* na produção de H₂, em reatores alimentados com glicose (10,5 g/L). Foram obtidos 22% de rendimento de conversão de glicose a H₂ (1270 mL H₂/L glicose), velocidade global de

produção molar de H_2 de $8,9 \pm 0,8$ mmol/L.h de reator, velocidade global de produção volumétrica de H_2 de 220 ± 8 mL/L.h de reator. A composição do produto de fermentação indicou a presença de ácido acético e ácido butírico.

Vários fatores puderam contribuir para a manutenção de espécies de *Clostridium* nos reatores anaeróbios, conforme descritos a seguir. O acréscimo de peptona ao meio nutricional (Ueno *et al.*, 2001), tratamento a quente do inóculo associado ao meio nutricional específico e imposição de pH 5,5 enriqueceram tais populações (Fan *et al.*, 2004).

A Figura 5.27 mostra a árvore filogenética de consenso obtida com *primers* para o Domínio *Bacteria* proveniente da informação de sequências obtidas do ensaio de reatores anaeróbios alimentados com sacarose. Os valores dos coeficientes de similaridade verificados entre os diferentes grupos de microrganismos observados nas quatro condições estudadas variaram de 96 a 98% e indicaram a presença de espécies relacionadas filogeneticamente, a partir da avaliação parcial de suas sequências do gene RNAr 16S. Foi acrescentado sequência conhecida de *Clostridium scatologenes* (DQ911270), e como *out group* sequência de *Rhodobacter sphaeroides* (NC 007493.1).

Figura 5.27 Árvore filogenética de consenso baseado nas sequências das bandas recortadas do DGGE com *primers* para o Domínio *Bacteria*, obtidas dos reatores anaeróbios alimentados com sacarose. Os valores presentes nos nós das árvores indicam porcentagens que o ramo se repetiu (500 re-amostragens de *bootstraps*).

As bandas 4, 5 e 6 ficaram próximas das sequências de espécies de *Clostridium*. As bandas 1 e 3 foram próximas à sequência da espécie *Enterobacter cloacae*, enquanto a banda 2 com a espécie *Burkholderia cepacia*.

Com a caracterização microbiana do inóculo purificado foi possível identificar espécies reconhecidas na literatura como geradoras de gás hidrogênio: *Clostridium* sp.; *Clostridium aciditolerans*; e *Klebsiella pneumoniae*, conforme descrito anteriormente. As espécies geradoras de H₂ identificadas nas bandas seqüenciadas do perfil de DGGE dos ensaios com reatores anaeróbios alimentados com sacarose foram as seguintes: *Clostridium* sp.; *Clostridium acetobutyricum* e *Enterobacter cloacae*. Provavelmente, *Enterobacter cloacae* estava presente no consórcio microbiano gerador de gás hidrogênio. Entretanto, alguns clones não puderam ser incorporados na análise filogenética por não terem quantidades suficientes de nucleotídeos (valores inferiores a 180 nucleotídeos) para serem comparados com a base de dados (NCBI). Nesse caso, pode ter havido essa ocorrência porque no recorte de banda foram evidenciadas linhagens de *Enterobacter cloacae* no final de operação dos reatores anaeróbios alimentados com sacarose; além de reconhecidas na literatura como responsáveis pela geração de gás hidrogênio.

Burkholderia foi identificada no consórcio microbiano e no final dos ensaios nos reatores alimentados com sacarose. Portanto, tal bactéria foi resistente às condições impostas (pH 5,5 e tratamento a quente do inóculo); e o crescimento favorecido pela adição das fontes de carbono (sacarose e peptona), uréia e solução de vitaminas.

5.3.6 Análise Comparativa dos reatores anaeróbios alimentados com sacarose

Os reatores anaeróbios alimentados com sacarose, para as quatro condições estudadas, tiveram comportamentos diferentes, em relação à produção de gás hidrogênio (Figura 5.28).

Para a condição (1) e (2) não foi observada fase *lag* de produção de gás hidrogênio. As condições impostas, nesse caso, favoreceram a produção de H₂ nas primeiras horas de operação. Contrariamente, as condições (3) e (4) apresentaram fase *lag* de produção de H₂. Esse fato foi relacionado às concentrações mais elevadas de substrato orgânico que inibiram o crescimento do consórcio microbiano gerador de H₂ e, conseqüentemente a metabolização da sacarose para que houvesse geração do gás hidrogênio.

As velocidades máximas do consumo de sacarose, expressas em mmol sacarose/L.h, para as condições (1), (2), (3) e (4) foram respectivamente, de 0,26 (3,5 a 5 h); 0,16 (8 a 12 h); 0,11 (72 a 92 h); 0,11 (162 a 186 h). As velocidades mais elevadas do consumo de sacarose

foram verificadas para as condições (1) e (2); ou seja, a eficiência de consumo da sacarose foi maior nos reatores com concentrações mais reduzidas; o que favoreceu o crescimento do consórcio microbiano e geração de H_2 nas primeiras horas de operação.

Figura 5.28 Velocidade global específica de produção de gás H_2 nos reatores anaeróbios alimentados com sacarose: (■) 630,0 mg/L; (●) 1183,0 mg/L; (□) 1816,0 mg/L; (▲) 4128,0 mg/L

Nos reatores anaeróbios da condição (3) com 1816,0 mg sacarose/L ocorreram gerações mais elevadas de H_2 (19159,6 $\mu\text{mol/L}$), com 114 h de operação.

A Tabela 5.7 sumariza os resultados dos reatores anaeróbios alimentados com sacarose para as quatro condições estudadas. As condições (1), (2), (3) e (4) apresentaram valores de pH no final dos ensaios de respectivamente, 4,1 (28 h); 4,0 (96 h); 4,6 (168 h) e 3,8 (222 h). Apesar dos ensaios apresentarem tempos de operação diferentes; os valores finais de pH observados tiveram pouca variação. Esse fato foi relacionado ao meio nutricional adicionado, o qual continha solução-tampão, que permitiu a manutenção do consórcio microbiano gerador de H_2 , principalmente por espécies de *Clostridium* que sobrevivem a pH próximo de 4,0 (Fang *et al.*, 2006).

As porcentagens do consumo de sacarose foram respectivamente de 80,4%; 87,2%; 83,0% e 70,3% para as condições (1), (2), (3) e (4). O aumento nas concentrações de sacarose impostas no experimento foi diretamente proporcional ao tempo de operação. Ou seja, o consórcio microbiano consumiu mais rapidamente as concentrações mais reduzidas de sacarose [condições (1) e (2)] e, necessitou adaptar-se para que pudesse consumir concentrações mais elevadas de sacarose [condições (3) e (4)].

Paras as condições (1) e (2), os produtos intermediários gerados foram os seguintes: ácido acético, ácido butírico e gás hidrogênio. Para as condições (3) e (4) foi observado também, geração de ácido isobutírico, ácido isovalérico e ácido propiônico, porém em concentrações reduzidas. A geração de ácido acético aumentou gradativamente no início dos ensaios e, quando ácido butírico foi detectado nos reatores se obteve, concomitantemente, produções elevadas de gás hidrogênio. O aumento nas proporções de ácido butírico foi diretamente proporcional ao consumo de sacarose e, conseqüente produção de gás hidrogênio. Embora a geração de 8 mols H_2 a partir de sacarose prevê ácido acético como produto final; pode-se dizer que, no presente trabalho ocorreu geração também de outros produtos intermediários, principalmente ácido butírico e etanol. Ou seja, a geração de H_2 nos reatores anaeróbios foi devido à mistura dos produtos intermediários da fermentação da sacarose, principalmente ácido acético e butírico (Levin *et al.*, 2004).

Nas quatro condições estudadas foram detectados ácidos orgânicos, principalmente ácido acético, além de acetona, metanol e etanol nas primeiras horas experimentais. Essa evidência pode ser devida ao inóculo que adveio de reativação e enriquecimento.

As gerações de acetona e metanol mantiveram-se constantes em todo período de operação dos reatores anaeróbios para as condições estudadas. Nesse caso, o consórcio microbiano presente não consumiu esses produtos intermediários que estavam presentes nos reatores, possivelmente advindos do inóculo purificado.

A geração de etanol foi gradativa e aumentou em função do tempo de operação. As gerações máximas de etanol foram verificadas nas amostragens finais de todas as condições estudadas. A geração máxima de etanol foi observada para a condição (2); onde ocorreram as melhores eficiências de conversão de sacarose a H_2 .

Não houve produção de metano nos reatores anaeróbios, confirmando a eficiência do pré-tratamento do inóculo e imposição do pH inicial 5,5. A associação desses dois fatores causou a inibição de arqueias consumidoras de H_2 .

Tabela 5.7 Resumo geral dos parâmetros obtidos dos reatores anaeróbios para as diferentes condições de alimentação com sacarose

Parâmetro	Condição (1) 630,0 mg /L	Condição (2) 1184,0 mg /L	Condição (3) 1816,0 mg /L	Condição (4) 4128,0 mg /L
Consumo de sacarose (%)	80,4	87,2	83,0	70,3
SSV (g/L)	0,26	0,30	0,45	0,34
Período de ocorrência (h)	9,5	20	96	201,5
pH (amostragem final)	4,1	4,0	4,6	3,8
Duração (h)	28	96	168	222
Pressão parcial H ₂ (1 atm)	0,068	0,116	0,488	0,062
Produtos intermediários gerados (concentrações máximas em mg/L)				
Acético	131,5	146,6	537,0	204,7
Butírico	1,2	3,3	252,5	281,4
Propiônico	≤ l.d.	≤ l.d.	3,3	≤ l.d.
Isobutírico	≤ l.d.	≤ l.d.	11,2	≤ l.d.
Isovalérico	≤ l.d.	≤ l.d.	23,2	5,6
Acetona	15,4	15,4	15,8	15,6
Metanol	20,9	29,1	22,0	21,0
Etanol	42,5	46,2	31,7	23,0
Geração H ₂ máxima (μmol/L)	2683,2	4576,2	19159,6	8226,3
Tempo (h)	28	48	114	219,5
Velocidade global específica de consumo sacarose (mmol sacarose/L.h)	0,26	0,16	0,11	0,11
Período de ocorrência (h)	3,5 a 5,0	8 a 12	72 a 92	162 a 186
Velocidade global específica de produção H ₂ (μmol H ₂ /g SSV.h)	2147,3	3201,6	10059,5	2663,1
Período de ocorrência (h)	5	28	106	209
Rendimento (%)	15 %	20 %	15 %	4 %
(mol H ₂ /mol sacarose)	1,2	1,6	1,2	0,3

l.d. = limite de detecção (acético = 3,7 mg/L; butírico = 0,45 mg/L; isobutírico = 1,5 mg/L; isovalérico = 0,46 mg/L; propiônico = 1,5 mg/L; H₂ = 0,0183 μmol/L; acetona = 2 mg/L; etanol = 2 mg/L; metanol = 2 mg/L)

Fan *et al.* (2004) obtiveram produção biológica de H_2 (90 mg H_2 /g de sacarose) em reatores alimentados com sacarose ($4,0 \pm 0,5$ g/L) a pH $5,4 \pm 0,2$. O processo de produção biológica de H_2 a partir da sacarose com inóculo pré-tratado a quente comportou-se em quatro etapas: fase *lag*, fase preliminar de produção de H_2 ; fase de produção de H_2 ininterrupta e fase de decaimento. No presente trabalho foram observadas todas essas fases para as condições (3) 1816 mg sacarose/L e (4) 4128 mg sacarose/L.

Khanal *et al.* (2004) observaram geração de ácido acético, butírico e propiônico a pH 5,0 em reatores alimentados com sacarose (1500 mg/l), com produção de 240 mg H_2 /g DQO. No presente trabalho, para as quatro condições estudadas, foi observado predomínio de geração dos ácidos acético e butírico e, nos reatores operados em concentrações mais elevadas de sacarose [condições (3) e (4)], gerações reduzidas dos ácidos propiônico; isobutírico e isovalérico.

Duas rotas de degradação da sacarose podem ocorrer em processos fermentativos de produção de gás hidrogênio; (1) consumo de sacarose gerando ácido acético (equação 1) e consumo de sacarose gerando ácido butírico, conforme descrito anteriormente. Nos experimentos realizados nesse trabalho ocorreram as duas rotas de degradação; porém a conversão da sacarose a ácido acético foi favorecida no início dos ensaios e a ácido butírico nas amostragens finais. Kawagoshi *et al.* (2005) obtiveram produção de hidrogênio de 1,4 mol H_2 /mol de glicose, com inóculo proveniente de digestão anaeróbia pré-tratado a quente, em reatores em batelada alimentados com glicose (6000 mg/L), a 35°C e as rotas de degradação foram as dos ácidos acético e butírico. No presente trabalho foram observados resultados superiores (1,6 mol H_2 /mol sacarose) com concentrações mais reduzidas (1184,0 mg sacarose/L).

A Figura 5.29 ilustra as velocidades globais específicas de produção de H_2 nos reatores alimentados com sacarose. Observa-se nesse caso, que os reatores da condição (3), alimentados com 1816,0 mg sacarose/L obtiveram as maiores atividades específicas máximas com valor de 10059,5 $\mu\text{mol } H_2/\text{g de SSV.h}$.

Figura 5.29 Velocidades globais específicas de produção de H_2 nos reatores anaeróbios alimentados com sacarose para quatro condições estudadas

De acordo com os dados obtidos das velocidades globais específicas de produção de H_2 (Figura 5.29) esperava-se o mesmo comportamento para os rendimentos de consumo de sacarose a H_2 (Figura 5.30).

Figura 5.30 Rendimentos de sacarose a H_2 nos reatores anaeróbios alimentados com sacarose para as quatro condições estudadas

Entretanto, os rendimentos máximos de consumo de sacarose a H_2 ocorreram para os reatores da condição (2), operados com 1184,0 mg sacarose/L (1,6 mols H_2 /mol de sacarose) o que representou eficiência de conversão de sacarose a hidrogênio de 20 %, quando comparada à eficiência teórica.

As diferenças obtidas entre as velocidades globais específicas de produção de H_2 (Figura 5.29) e os rendimentos de sacarose a H_2 (Figura 5.30) podem ser explicadas através da pressão parcial de H_2 no *headspace* dos reatores anaeróbios, conforme mostrado na Figura 5.31. Ou seja, os reatores anaeróbios da condição (3) 1816,0 sacarose/L tiveram pressão parcial de H_2 mais elevada (0,488 atm). Consequentemente, o gás hidrogênio gerado na fase líquida aí permanecia ou, o próprio efeito da pressão parcial exercida no *headspace* permitia a solubilização de H_2 para o meio líquido. Essa ocorrência também justificou a alteração no volume de *headspace* (de 500 mL nas condições (1), (2) e (3) para 1000 mL na condição (4). Entretanto, para a condição (4) com 4128,0 mg sacarose/L, não ocorreu pressões parciais de H_2 elevadas, uma vez que a elevada concentração de sacarose causou inibição no crescimento da cultura microbiana com produções reduzidas de H_2 no *headspace*.

Figura 5.31 Pressão parcial máxima de H_2 exercida nos reatores anaeróbios alimentados com sacarose para quatro condições estudadas

A produção biológica de hidrogênio pode ser afetada pela pressão parcial de H_2 (Ni *et al.*, 2006). Van Ginkel *et al.* (2005) obtiveram produções elevadas de H_2 com mecanismos que reduziram as pressões parciais exercidas no *headspace*. Segundo Kim D-H *et al.* (2006) a

pressão parcial de H_2 na fase líquida é um dos fatores chave que afetam a produção fermentativa de H_2 . De acordo com os autores, as pressões parciais de H_2 têm efeito negativo na produção de H_2 , responsável pelo decréscimo da atividade da hidrogenase, que torna a reação de produção de H_2 termodinamicamente desfavorável. Para diminuir a pressão parcial de H_2 diversos métodos podem causar efeito benéfico, tais como; aspergir gás que melhora a mistura, principalmente em reatores de batelada. O decréscimo da pressão parcial de H_2 favorece a atividade da hidrogenase tornando a reação de produção de H_2 termodinamicamente favorável.

Ueno *et al.* (2001) verificaram rendimentos maiores (2,0 mol H_2 /mol de celulose) em reator de batelada e quimiostato; ambos com adição de peptona (5g/L) e 1,0 mol H_2 /mol de celulose (sem adição de peptona). Fang *et al.* (2002) obtiveram rendimentos de glicose a H_2 ($2,1 \pm 0,1$ mol H_2 /mol glicose) e velocidade global específica de produção de $4,6 \pm 0,4$ L H_2 /(g SSV.dia), com glicose (7000 mg/l), a 36 C, pH 5,5 e cultura mista de bactérias fermentativas. Os ácidos orgânicos gerados foram, principalmente, acético (15,3% a 34,1%) e butírico (31,2% a 45,6%). Nesse trabalho, o maior rendimento de sacarose a H_2 foi obtido para concentrações de sacarose de 1184,0 mg/L [condição (2)] e foi de 1,6 mol H_2 /mol sacarose; com gerações máximas de ácido acético (146,6 mg/L) e butírico (3,3 mg/L).

No presente trabalho foi obtido 15% de eficiência de conversão de sacarose a H_2 (1,2 mol H_2 /mol sacarose) para a condição (3) com 1816 mg sacarose/L. Portanto, superiores a Kim *et al.* (2006) que operaram reator de fluxo contínuo, com variações de 3000 a 6000 mg sacarose/L de DQO, pH 5,4 e 35°C. Os autores obtiveram conversão máxima de 1,09 mols de H_2 /mol de sacarose. As bactérias identificadas foram *Clostridium* spp. e *Bacillus racemilacticus*.

A análise da diversidade microbiana realizada, por meio da técnica do DGGE nos reatores anaeróbios alimentados com sacarose revelaram linhagens de *Clostridium acetobutyricum*, *Clostridium* sp. e *Enterobacter cloacae* como responsáveis pela geração de H_2 nos ensaios realizados. Fernandes (2008) identificou bactérias semelhantes a *Clostridium* sp. e *Klebsiella*, aplicando a técnica de DGGE. Os reatores usados eram de leito fixo e fluxo ascendente, TDH de 0,5 h, alimentados com sacarose (890,62 mg/L), meio nutritivo Del Nery, pH 5,5, a 25°C e inóculo obtido pelo processo de fermentação natural do meio de alimentação, preparado com água de abastecimento, mantido em repouso durante 3 dias, em recipiente aberto. Os rendimentos de sacarose a H_2 foram respectivamente, de 4,44; 4,52 e 4,38 mols H_2 /mol de sacarose para os suportes argila expandida, carvão vegetal e polietileno

de baixa densidade reciclável; no período inicial de operação (40 dias). Os produtos intermediários principais fôramos ácidos acético e butírico.

5.4 Ensaios com reatores anaeróbios alimentados com xilose

A biomassa purificada com sacarose foi reativada, nas mesmas condições, porém utilizando-se xilose como substrato orgânico, conforme descrito anteriormente. Após 48 h, foram feitos exames microscópicos de contraste de fase e de luz comum. Constatou-se que a manutenção celular com xilose foi eficiente, sendo observado o predomínio de bacilos Gram positivos e bacilos com endósporos (Figura 5.32), semelhantes aos observados na manutenção celular com sacarose.

Figura 5.32 Exames microscópicos da biomassa em reatores de enriquecimento celular: (a) bacilos Gram positivos com endósporos e Gram negativos e (b) bacilo com endósporo

Portanto, no presente trabalho foi possível obter bacilos Gram positivos formadores de endósporos e produtores de hidrogênio em meio nutricional com xilose.

A partir da manutenção celular do inóculo purificado com xilose, ensaios de produção de hidrogênio em reatores anaeróbios em batelada foram iniciados para quatro condições distintas, conforme descrito a seguir.

5.4.1 Condição (5) - 630,0 mg xilose/L

Esse ensaio teve a duração de 127 horas com pH inicial de 5,5 e final de 4,1. A Tabela VI.9 (Apêndice VI) e a Figura 5.33 descrevem o comportamento do crescimento microbiano.

O crescimento da biomassa presente nos reatores anaeróbios ocorreu nos primeiros pontos da amostragem. Após 14 h de operação o crescimento dobrou em relação ao valor

inicial, ou seja, ABS_{600} de 0,04 e SSV de 0,05 g/L. Não ocorreu, nesse caso, fase *lag* do crescimento microbiano. A biomassa não sofreu inibição com a concentração do substrato que foi imposta e não foi necessário adaptar-se a essa condição. O crescimento máximo ocorreu com 55 h de operação ($ABS_{600} = 0,12$ e SSV = 0,10 g/L); a partir desse período, ocorreu a estabilização do crescimento da biomassa. Nos ensaios realizados com sacarose (630,0 mg/L) foram obtidos crescimentos máximos com 8 h de operação ($ABS_{600} = 0,10$ e SSV = 0,26 g/L).

Figura 5.33 Crescimento microbiano nos reatores anaeróbios da condição (5) com 630,0 mg xilose/L

O consumo de xilose ocorreu nas primeiras amostragens (Tabela VI.9 – Apêndice VI), demonstrando que não houve inibição da biomassa ao substrato. Após 14 horas de operação foram observados 15% de seu consumo (535,0 mg xilose/L) e com 40 h de operação 66% da xilose foram consumidas (215,0 mg xilose/L). Portanto, o consumo de xilose foi crescente. Após 127 h de operação havia 12 mg xilose/L; o que significou 98% de seu consumo (Figura 5.34). A velocidade global de consumo de xilose foi de 0,12 mmol de xilose/L.h e ocorreu no período de 33 h.

Foi observada fase *lag* para a geração de H_2 nos reatores e ocorreu até 18 h de operação. Como não foi verificada ocorrência de fase *lag* para o crescimento do consórcio microbiano e para o consumo da xilose, provavelmente as bactérias que cresceram até 18 h de operação não foram envolvidas com a geração de gás hidrogênio nos reatores anaeróbios. Geração de H_2 foi observada a partir de 18 horas de operação (187,7 $\mu\text{mol/L}$), conforme Tabela 5.8 que sumariza a geração dos produtos intermediários, como ácidos graxos voláteis, acetona, metanol etanol, *n*-butanol e gás hidrogênio.

A geração máxima de gás hidrogênio ocorreu em 61 horas (1463,0 $\mu\text{mol/L}$). Após 76 horas de operação ocorreu redução acentuada da geração de H_2 nos reatores anaeróbios (783,9 $\mu\text{mol/L}$). As porcentagens máximas de H_2 (v/v) foram de 11,4%, com 61 horas de operação (Tabela VI.9 – Apêndice VI). O período de diminuição da concentração de gás hidrogênio coincidiu com a remoção total da xilose; ou seja, o consórcio microbiano gerador de gás hidrogênio teve seu crescimento reduzido em função da falta de xilose e, consequentemente, redução na geração de H_2 .

Figura 5.34 Variação temporal do consumo de xilose dos reatores anaeróbios da condição (5) com 630,0 mg xilose/L

A velocidade global específica de produção de gás hidrogênio foi de 1312,2 μmol de $\text{H}_2/\text{g SSV.h}$ (Figura 5.35) e foi obtida com 18 h de operação.

O rendimento de xilose a hidrogênio foi de 0,2 mols H_2/mol de xilose, com 33 horas de operação. A eficiência de conversão estequiométrica de xilose, através da via de ácido acético gera 6 mols de H_2 , como descrito anteriormente. De acordo com os valores experimentais obtidos, a eficiência de conversão de xilose a H_2 foi de 3,0%, quando comparada aos valores estequiométricos teóricos.

Parte do substrato orgânico foi transformada nos seguintes ácidos voláteis, acetona e álcoois, com concentrações máximas de: acético (322,6mg/L), butírico (63,0 mg/L),

isobutírico (11,8 mg/L), isovalérico (10,2 mg/L), acetona (2,2 mg/L), etanol (92,3 mg/L), metanol (4,7 mg/L) e *n*-butanol (3,9 mg/L).

Tabela 5.8 Variação temporal dos produtos intermediários nos reatores com 630,0 mg xilose/L

Tempo (h)	Ac. Acético (mg/L)	Ac. Butírico. (mg/L)	Ac.Isobutírico (mg/L)	Ac..Isovalérico (mg/L)	Acetona (mg/L)	Etanol (mg/L)	Metanol (mg/L)	<i>n</i> -butanol (mg/L)	H ₂ (μmol/L)
0	23,3	≤ l.d.	≤ l.d.	≤ l.d.	2,0	4,6	4,5	≤ l.d.	≤ l.d.
4									≤ l.d.
9	-	-	-	-	-	-	-	-	≤ l.d.
14	4,0	≤ l.d.	≤ l.d.	≤ l.d.	≤ l.d.	18,7	4,5	≤ l.d.	≤ l.d.
18	-	-	-	-	-	-	-	-	187,7
24	86,1	≤ l.d.	≤ l.d.	5,6	2,0	33,8	≤ l.d.	≤ l.d.	485,6
28	-	-	-	-	-	-	-	-	600,8
33	154,9	≤ l.d.	≤ l.d.	5,3	≤ l.d.	45,4	≤ l.d.	≤ l.d.	711,7
40	182,2	14,5	4,9	9,6	2,0	53,2	4,5	≤ l.d.	1026,6
49	-	-	-	-	-	-	-	-	1342,1
55	322,6	44,9	4,3	7,7	≤ l.d.	72,7	≤ l.d.	2,9	1265,5
61	-	-	-	-	-	-	-	-	1463,0
76	293,9	63,0	5,7	9,9	2,1	64,3	4,7	3,9	783,9
97	322,0	50,8	11,8	10,2	2,2	92,3	≤ l.d.	≤ l.d.	163,2
127	309,7	52,2	5,9	9,8	2,1	51,4	≤ l.d.	2,4	149,3

(-) análise não realizada. l.d. = limite de detecção (acético = 2,0 mg/L; butírico = 2,0 mg/L; isobutírico = 2,0 mg/L; isovalérico = 2,0 mg/L; propiônico = 2,0 mg/L; acetona = 2 mg/L; etanol = 2 mg/L; metanol = 2 mg/L; *n*-butanol = 2 mg/L; H₂ = 0,0183 μmol/L).

Figura 5.35 Velocidade global específica de produção de H₂ para reatores anaeróbios da condição (5) com 630,0 mg xilose/L

Outros compostos orgânicos contribuíram para manutenção das fontes de carbono nos reatores, como peptona, além da solução de vitaminas, que favoreceu a manutenção do consórcio microbiano gerador de gás hidrogênio. Foi confirmado, portanto, a rota de degradação metabólica da xilose a ácidos graxos voláteis, álcoois, acetona e gás hidrogênio. Não foi detectado metano nas amostragens.

A Figura 5.36 ilustra as porcentagens dos ácidos voláteis gerados em cada ponto de amostragem. As porcentagens de ácido acético foram elevadas em todas as amostragens. Com 40 h de operação as porcentagens de ácidos graxos voláteis gerados foram de 86,3% (ácido acético), 6,9% (ácido butírico), 2,3% (ácido isobutírico) e 4,5% (ácido isovalérico). Entretanto, observaram-se também porcentagens reduzidas dos demais ácidos como isobutírico e isovalérico; o que não ocorreu nos reatores anaeróbios alimentados com sacarose [condição (1) 630 mg sacarose/L]. As concentrações de ácido butírico, embora reduzidas; foram crescentes do início ao final do experimento e tal ocorrência se deu com a geração de gás hidrogênio nos reatores anaeróbios.

Figura 5.36 Variação temporal das proporções de ácidos graxos voláteis gerados nos reatores anaeróbios da condição (5) com 630,0 mg xilose/L

A Figura 5.37 mostra a geração de acetona, etanol, metanol e *n*-butanol nos reatores anaeróbios para a condição (1). Nesse caso as concentrações de acetona, metanol e *n*-butanol foram reduzidas em todas as amostragens realizadas. Contrariamente, a geração de etanol foi aumentando, gradativamente em todo período de operação. Com 76 h de operação foram observados 2,5% de acetona, 85,7% de etanol, 6,3% de metanol e 5,2% de *n*-butanol. A geração máxima de etanol foi observada com 97 h de operação (92,3 mg/L). Nos ensaios realizados com sacarose [condição (1) 630 mg/L] foram obtidos 42,5 mg etanol/L com 28 h de operação.

Figura 5.37 Variação temporal das proporções de acetona e álcoois gerados nos reatores anaeróbios da condição (5) com 630,0 mg xilose/L

5.4.2 Condição (6) - 1341,0 mg xilose/L

Os reatores anaeróbios foram operados no período de 175 h e os valores iniciais e finais de pH foram, respectivamente, 5,5 e 4,0. A Tabela VI.10 (Apêndice VI) e Figura 5.38 resumizam o comportamento do crescimento celular (ABS_{600} e SSV).

O crescimento microbiano ocorreu nas primeiras horas de operação e se prolongou até o período de 61 h (Figura 5.38). Não foi observada fase *lag* de crescimento microbiano. Após 18 h de operação foram observados valores três vezes maiores ($ABS_{600} = 0,06$ e SSV = 0,06 g/L), quando comparado ao início da operação. O crescimento microbiano máximo ocorreu com 61 h de operação ($ABS_{600} = 0,12$ e SSV = 0,10 g/L). A partir de 61 h de operação a cultura entrou na fase estacionária ($ABS_{600} = 0,11$ e 0,10 g SSV/L).

Figura 5.38 Crescimento microbiano nos reatores anaeróbios da condição (6) com 1341,0 mg xilose/L

O consumo de xilose ocorreu nas primeiras amostragens; entretanto até 14 h de operação observou-se apenas 3% de remoção (1297,0 mg xilose/L), demonstrando que houve inibição da biomassa ao substrato até tal período. Todavia, após esse período o consumo de xilose foi crescente. Após 127 horas de operação foram observados (206,6 mg xilose/L) nos reatores. Com 127 h de operação havia 36 mg xilose/L; o que significou 97% de remoção (Figura 5.39). A velocidade global de consumo de xilose foi de 0,16 mmol de xilose/L.h e ocorreu no período de 14 h.

A geração de gás hidrogênio teve início com 18 h (352,0 $\mu\text{mol/L}$). Após 151 h de operação ocorreram concentrações máximas de H_2 no *headspace* (4039,5 $\mu\text{mol/L}$), conforme Tabela 5.9 que sumariza a geração dos produtos intermediários, tais como, ácidos graxos voláteis, acetona, metanol etanol, *n*-butanol e gás hidrogênio do ensaio (6). As porcentagens de H_2 no *headspace* variaram de 2,8% a 25,9% para 18h e 175h, respectivamente (Tabela VI.10 – Apêndice VI). Nos ensaios realizados com sacarose [condição (2) 1184,0 mg sacarose/L] foram verificadas gerações máximas de 4576,2 $\mu\text{mol/L}$, correspondendo a 43,8% de H_2 no *headspace* dos reatores com 48 h de operação.

Figura 5.39 Variação temporal do consumo de xilose nos reatores anaeróbios da condição (6) com 1341,0 mg xilose/L

A velocidade global específica de produção de gás hidrogênio foi de 1772,3 μmol de $\text{H}_2/\text{g SSV.h}$ e foi obtida com 18 h de operação (Figura 5.40).

O rendimento de xilose a hidrogênio foi de 0,5 mols H_2/mol xilose, em 151 horas de operação. De acordo com os valores experimentais obtidos, a eficiência de conversão de xilose a H_2 foi de 8,0 %, quando comparada aos valores estequiométricos teóricos.

Parte do substrato orgânico foi transformada nos seguintes ácidos voláteis, acetona e álcoois, com as seguintes concentrações máximas: acético (235,9 mg/L), butírico (363,1 mg/L), isobutírico (4,8 mg/L), isovalérico (10,3 mg/L), acetona (2,6 mg/L), etanol (60,7 mg/L), metanol (13,8 mg/L) e *n*-butanol (25,0 mg/L).

Outros compostos orgânicos contribuíram para a manutenção das fontes de carbono nos reatores, tais como peptona, além do acréscimo da solução de vitaminas que possibilitou o crescimento do consórcio microbiano e favorecimento do consumo de xilose e geração de gás hidrogênio. Esse fato confirmou a rota de degradação metabólica da xilose a ácidos graxos voláteis, álcoois, acetona e gás hidrogênio. Não foi detectado metano nas amostragens.

Tabela 5.9 Variação temporal dos produtos intermediários gerados nos reatores alimentados com 1341,0 mg xilose/L

Tempo (h)	Ac. Acético (mg/L)	Ac. Butírico. (mg/L)	Ac. Isobutírico (mg/L)	Ac. Isovalérico (mg/L)	Acetona (mg/L)	Etanol (mg/L)	Metanol (mg/L)	<i>n</i> -butanol (mg/L)	H ₂ (μmol/L)
0	3,8	≤l.d.	≤l.d.	≤l.d.	≤l.d.	5,0	≤l.d.	≤l.d.	44,0
4	-	-	-	-	-	-	-	-	44,0
9	-	-	-	-	-	-	-	-	44,0
14	27,3	≤l.d.	≤l.d.	≤l.d.	2,1	24,5	4,5	≤l.d.	134,2
18	-	-	-	-	-	-	-	-	352,0
24	115,3	4,8	2,9	9,2	2,1	54,0	≤l.d.	≤l.d.	677,3
28	-	-	-	-	-	-	-	-	914,3
33	142,9	20,9	3,9	8,6	2,1	44,6	≤l.d.	≤l.d.	1088,0
40	137,3	27,2	2,3	7,0	2,1	30,2	≤l.d.	2,4	1394,7
49	-	-	-	-	-	-	-	-	2093,8
55	164,9	83,6	3,5	9,5	≤l.d.	38,2	4,6	2,2	1967,5
61	-	-	-	-	-	-	-	-	2611,2
76	150,4	68,1	2,5	10,2	2,2	43,6	9,1	6,7	1935,6
97	178,3	185,4	3,8	8,9	2,4	50,0	13,8	10,9	2065,2
127	210,8	311,9	4,8	10,3	2,4	41,9	9,0	14,7	2848,1
151	174,5	251,9	3,6	6,6	2,0	40,5	4,5	13,6	4039,5
175	235,9	363,1	4,1	9,8	2,6	60,7	9,4	25,0	3668,6

(-) análise não realizada; l.d. = limite de detecção (acético = 2,0 mg/L; butírico = 2,0 mg/L; isobutírico = 2,0 mg/L; isovalérico = 2,0 mg/L; propiônico = 2,0 mg/L; acetona = 2 mg/L; etanol = 2 mg/L; metanol = 2 mg/L; *n*-butanol = 2 mg/L; H₂ = 0,0183 μmol/L)

A Figura 5.41 ilustra as porcentagens dos ácidos voláteis gerados em função do tempo. As gerações de ácido acético e butírico foram crescentes em todo período de operação. Após 24 h de operação foi observado 115,3 mg ácido acético/L e gerações de 4,8 mg ácido butírico/L. Com 151 h de operação as porcentagens de ácidos graxos voláteis gerados foram de 40% (ácido acético), 57,7% (ácido butírico); 0,8% (ácido isobutírico) e 1,5% (ácido isovalérico). As gerações máximas ocorreram no final de operação; ou seja, com 175 h (235,9 mg ácido acético/L e 363,1 mg ácido butírico/L). Os ácidos isobutírico e isovalérico apresentaram concentrações reduzidas. No final da operação (175 h) foi detectado 4,1 mg ácido isobutírico/L e 9,8 mg ácido isovalérico/L.

Figura 5.40 Velocidade global específica de produção de H_2 nos reatores anaeróbios da condição (6) com 1341,0 mg xilose/L

Figura 5.41 Variação temporal das proporções de ácidos graxos voláteis gerados nos reatores anaeróbios da condição (6) com 1341,0 mg xilose/L

A Figura 5.42 mostra a geração de acetona, etanol, metanol e *n*-butanol nos reatores anaeróbios. Com 127 h de operação foram observados 3,5% de acetona, 61,6% de etanol, 13,2% de metanol e 21,6% de *n*-butanol. Nesse caso, as concentrações de acetona foram reduzidas em todas as amostragens realizadas. Contrariamente, as gerações de metanol *n*-butanol e etanol aumentaram gradativamente em todo período de operação.

Figura 5.42 Variação temporal das proporções de acetona e álcoois gerados nos reatores anaeróbios da condição (6) com 1341,0 mg xilose/L

As gerações máximas observadas de metanol ocorreram após 97h de operação (13,8 mg/L); enquanto que, etanol (60,7 mg/L) e *n*-butanol (25,0 mg/L) foram detectados no final da operação (175 h). Nos ensaios realizados em concentrações semelhantes de sacarose [condição (2) 1184 mg/L] não foi observado alteração nas concentrações de acetona (15,4 mg/L), em 72 horas de operação; além da geração de etanol em todo período de operação com valor máximo de 46,2 mg/L em 72 h.

5.4.3 Condição (7) - 1848,0 mg xilose/L

Os reatores anaeróbios foram operados durante o período de 213 h com pH inicial e final de, respectivamente de 5,5 e 4,3. A Tabela VI.11 (Apêndice VI) e Figura 5.43 resumizam o comportamento do ensaio através do crescimento celular (ABS_{600} e SSV).

Figura 5.43 Crescimento microbiano nos reatores anaeróbios da condição (7) com 1848,0 mg xilose/L

No início do ensaio as concentrações de SSV foram de 0,05 g/L ($ABS_{600} = 0,04$). Não foi observado fase *lag* no crescimento microbiano; ou seja, o consórcio microbiano cresceu nas primeiras horas de operação (Figura 5.43).

No período de 66 horas a 120 horas ($ABS_{600} = 0,14$ e $SSV = 0,12$ g/L) foi observada fase estacionária no crescimento da biomassa. O crescimento máximo do consórcio microbiano ocorreu em 148 h de operação ($ABS_{600} = 0,23$ e $SSV = 0,19$ g/L). Após 162 h de operação foi observado redução no crescimento, provavelmente representando a fase de morte celular ($ABS_{600} = 0,14$ e $SSV = 0,12$ g/L).

O consumo de xilose foi lento às primeiras amostragens. Após 18 h de operação foram verificados 1804,9 mg xilose/L; o que representou 2,3% de seu consumo. Observou-se fase *lag* de até 66 h em relação ao consumo de xilose (Figura 5.44).

Figura 5.44 Variação temporal do consumo de xilose nos reatores anaeróbios da condição (7) com 1848,0 mg xilose/L

Apenas 12% de xilose foram consumidos em 66 h de operação, sendo observado concentrações de 1619,7 mg xilose/L, demonstrando que houve inibição da biomassa ao substrato até tal período. Após 66 horas de operação o consumo de xilose foi crescente; ou seja, com 138 h de operação foram observados 944,2 mg/L nos reatores anaeróbios, o que representou 49% de consumo. Após 186 h de operação havia 49 mg xilose/L; o que significou 97% de remoção.

A velocidade global de consumo de xilose foi de 0,23 mmol xilose/L.h e ocorreu no período de 138 h. As adições de peptona e vitaminas no início do ensaio favoreceram o crescimento do consórcio microbiano nas primeiras horas de operação; uma vez que o consumo de xilose foi favorecido após 90 h de operação.

Ocorreu fase *lag* de geração de H_2 até 120 h de operação. Todavia, após esse período a geração H_2 foi crescente até 197 horas de operação, conforme Tabela 5.10 que sumariza os valores dos produtos intermediários, tais como, ácidos graxos voláteis, acetona, metanol, etanol, *n*-butanol e gás hidrogênio.

Tabela 5.10 Variação temporal dos produtos intermediários gerados nos reatores alimentados com 1848,0 mg xilose/L

Tempo (h)	Ac. Acético (mg/L)	Ac. Butírico. (mg/L)	Ac. Isobutírico (mg/L)	Ac. Isovalérico (mg/L)	Ac. Propiônico (mg/L)	Acetona (mg/L)	Etanol (mg/L)	Metanol (mg/L)	<i>n</i> -butanol (mg/L)	H ₂ (μmol/L)
0	≤l.d.	≤l.d.	≤l.d.	2,6	6,1	≤l.d.	14,2	13,7	≤l.d.	≤l.d.
18	103,9	0,0	6,4	13,7	5,2	≤l.d.	19,3	8,9	≤l.d.	≤l.d.
23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	≤l.d.
42	399,9	2,8	12,7	24,9	2,3	2,3	33,4	4,6	≤l.d.	≤l.d.
47	-	-	-	-	-	-	-	-	-	118,7
66	466,1	55,0	12,7	20,7	≤l.d.	≤l.d.	33,5	9,2	≤l.d.	137,5
72	-	-	-	-	-	-	-	-	-	151,8
90	483,8	20,2	10,5	17,8	≤l.d.	≤l.d.	23,5	≤l.d.	≤l.d.	251,4
97	-	-	-	-	-	-	-	-	-	283,0
114	-	-	-	-	-	-	-	-	-	399,5
120	-	-	-	-	-	-	-	-	-	507,7
138	548,0	154,9	8,7	13,4	≤l.d.	2,5	41,5	≤l.d.	≤l.d.	3518,1
144	703,8	190,5	6,9	10,8	2,1	2,7	34,6	≤l.d.	≤l.d.	6061,4
148	573,0	214,1	9,3	13,4	≤l.d.	2,5	40,7	14,2	≤l.d.	8599,6
162	601,5	164,1	5,4	6,5	≤l.d.	2,5	37,4	4,8	≤l.d.	10186,3
169	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8947,5
171	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8983,1
186	544,1	191,6	5,2	6,5	≤l.d.	2,5	32,7	≤l.d.	≤l.d.	12123,4
191	856,8	310,7	7,0	10,3	≤l.d.	2,8	39,3	4,7	≤l.d.	10914,6
194	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13385,4
197	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13443,4
213	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12564,0

(-) análise não realizada. l.d. = limite de detecção (acético = 2,0 mg/L; butírico = 2,0 mg/L; isobutírico = 2,0 mg/L; isovalérico = 2,0 mg/L; propiônico = 2,0 mg/L; acetona = 2 mg/L; etanol = 2 mg/L; metanol = 2 mg/L; *n*-butanol = 2 mg/L; H₂ = 0,0183 μmol/L)

As porcentagens mais elevadas de gás hidrogênio no *headspace* (v/v) foram de 40,3%, com 197 horas de operação. Assim, a geração de gás hidrogênio teve início com 47 h de operação (118,7 μmol/L). Após 197 h de operação ocorreram concentrações máximas de H₂ no *headspace* (13443,4 μmol/L). As porcentagens de H₂ no *headspace* variaram de 0,1% a 40,3% para 47 h e 197 h, respectivamente (Tabela VI.11 – Apêndice VI).

Nos ensaios realizados com sacarose [condição (3) 1816,0 mg sacarose/L] foram verificadas gerações máximas de 19159,6 μmol/L, correspondendo a 51,9 % de H₂ no *headspace* dos reatores com 114 h de operação.

A velocidade global específica de produção de gás hidrogênio foi de 1404,52 μmol de H₂/g de SSV.h (Figura 5.45) e foi obtida com 186 h de operação.

Figura 5.45 Velocidade global específica da produção de H₂ nos reatores anaeróbios da condição (7) com 1848,0 mg xilose/L

O rendimento de xilose a hidrogênio foi de 0,6 mols H₂/mol de xilose, com 151 horas de operação. De acordo com os valores experimentais obtidos, a eficiência de conversão de xilose a H₂ foi de 10,0 %, quando comparada aos valores estequiométricos teóricos.

Parte da matéria orgânica foi transformada em ácidos voláteis, acetona e álcoois, com as seguintes concentrações máximas: acético (856,8 mg/L), butírico (310,7 mg/L), isobutírico (12,7 mg/L), isovalérico (24,9 mg/L), propiônico (6,1 mg/L), acetona (2,8 mg/L), etanol (41,5 mg/L), metanol (14,2 mg/L) e *n*-butanol (1,9 mg/L).

Foi confirmada a rota de degradação metabólica da xilose a ácidos graxos voláteis, álcoois, acetona e gás hidrogênio.

A Figura 5.46 ilustra as porcentagens dos ácidos voláteis gerados em função do tempo. Nessa condição foi observada geração de ácido propiônico, principalmente na primeira amostragem, porém em concentrações reduzidas (6,1 mg/L). Com 144 h de operação as porcentagens de ácidos graxos voláteis gerados foram de 42,5% (ácido acético), 11,5% (ácido butírico); 0,4% (ácido isobutírico), 0,7% (ácido isovalérico) e 0,1% (ácido propiônico).

Figura 5.46 Variação temporal das proporções de ácidos graxos voláteis gerados nos reatores anaeróbios da condição (7) com 1848,0 mg xilose/L

A partir de 18 h de operação ocorreu predomínio na geração de ácido acético. Quando foi detectado aumento das concentrações de ácido butírico nas amostragens (55 mg/L com 66 h de operação) foi observado, concomitantemente, geração de H_2 (137,5 $\mu\text{mol/L}$) nos reatores anaeróbios.

O aumento nas proporções de ácido butírico nas amostragens foi diretamente proporcional à geração de gás hidrogênio para essa condição nos reatores anaeróbios.

A Figura 5.47 mostra a geração de acetona, etanol, metanol e *n*-butanol nos reatores anaeróbios. Com 148 h de operação foram observados 4,4% de acetona, 70,9% de etanol e 24,7% de metanol.

Figura 5.47 Variação temporal das proporções de acetona e álcoois gerados nos reatores anaeróbios da condição (7) com 1848,0 mg xilose/L

Nesse caso as concentrações de acetona foram reduzidas em todas as amostragens realizadas. As gerações máximas observadas de metanol ocorreram com 148 h de operação (14,2 mg/L); enquanto que o etanol (41,5 mg/L) foi detectado em 138 h. Os valores das concentrações de *n*-butanol foram abaixo do limite de detecção ($\leq 2,0$ mg/L). Nos ensaios realizados em concentrações semelhantes de sacarose [condição (3) 1816,0 mg/L] não foi observado alteração nas concentrações de acetona (15,4 mg/L em 202 horas de operação); além da geração de etanol em todo período de operação, com valores máximos de 23,0 mg/L, no final da operação (168 h).

5.4.4 Condição (8) - 3588,0 mg xilose/L

Os reatores anaeróbios foram operados durante o período de 331 h com pH inicial e final de, respectivamente 5,5 e 4,1. A Tabela VI.12 (Apêndice VI) e Figura 5.48 resumizam o comportamento do ensaio através do crescimento celular (ABS_{600} e SSV).

O crescimento microbiano foi crescente nas primeiras horas de operação, não sendo observada fase *lag*. No início do ensaio as concentrações de SSV foram de 0,04 g/l ($ABS_{600} = 0,03$). Após 27 horas de operação foi observado ABS_{600} de 0,15 e SSV de 0,12 g/L, o que evidenciou aumento da biomassa. O crescimento máximo do consórcio microbiano ocorreu

em 245 h de operação com 0,26 de ABS_{600} e 0,20 g SSV/L. Após 293 h de operação foi observado diminuição no crescimento celular (ABS_{600} de 0,18 e 0,15 g SSV/L).

Figura 5.48 Crescimento microbiano nos reatores anaeróbios da condição (8) com 3588,0 mg xilose/L

O consumo de xilose foi lento às primeiras amostragens (Figura 5.49).

Figura 5.49 Variação temporal do consumo de xilose nos reatores anaeróbios da condição (8) com 3588,0 mg xilose/L

Após 53 h de operação foi observado 3218 mg xilose/L nos reatores anaeróbios, o que representou consumo de xilose de 10,3% das concentrações iniciais impostas. Até 148 h de operação apenas 24% da xilose foram consumidas, sendo detectado 2719,0 mg xilose/L nos reatores anaeróbios.

Após o período de 148 horas a xilose foi mais rapidamente consumida e, com 191 h de operação, foram observados 1327,0 mg xilose/L, o que representou 63% de seu consumo. Após 287 h de operação havia 91 mg xilose/L, o que significou 98% de remoção. Podem-se atribuir que o crescimento do consórcio microbiano observado até 173 h de operação (Figura 5.48) foi devido à presença de peptona e, no período de 173 h a 253 h, ao consumo de xilose com gerações elevadas dos produtos intermediários, principalmente os ácidos acético (688,7 mg/L), butírico (497,8 mg/L) e gás hidrogênio (1200,2 $\mu\text{mol/L}$).

A velocidade global de consumo de xilose foi de 0,27mmol de xilose/L.h e ocorreu no período de 148 h.

Ocorreu fase *lag* de geração de H_2 nos reatores anaeróbios até 191 horas de operação (Figura 5.50).

Figura 5.50 Variação temporal da geração de H_2 nos reatores anaeróbios da condição (4) com 3588,0 mg xilose/L

A geração de gás hidrogênio teve início com 31 h de operação (862,3 $\mu\text{mol/L}$), conforme Tabela 5.11 que sumariza a geração dos produtos intermediários, como ácidos graxos voláteis, acetona, metanol, etanol, n-butanol e gás hidrogênio.

Tabela 5.11 Variação temporal dos produtos intermediários gerados nos reatores com 3588,0 mg xilose/L

Tempo (h)	Ac. Acético (mg/L)	Ac. Butírico. (mg/L)	Ac. Isobutírico (mg/L)	Ac. Isovalérico (mg/L)	Ac. Propiônico (mg/L)	Acetona (mg/L)	Etanol (mg/L)	Metanol (mg/L)	n-butanol (mg/L)	H ₂ ($\mu\text{mol/L}$)
0	193,9	≤ l.d.	≤ l.d.	≤ l.d.	≤ l.d.	2,1	14,8	4,6	≤ l.d.	≤ l.d.
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	≤ l.d.
23	118,1	≤ l.d.	≤ l.d.	2,6	≤ l.d.	2,1	50,3	≤ l.d.	≤ l.d.	≤ l.d.
27	124,0	≤ l.d.	≤ l.d.	≤ l.d.	≤ l.d.	≤ l.d.	51,5	≤ l.d.	≤ l.d.	≤ l.d.
31	112,5	≤ l.d.	≤ l.d.	2,2	2,7	2,1	49,5	≤ l.d.	≤ l.d.	862,3
36	106,2	≤ l.d.	2,1	3,8	2,7	2,1	59,7	≤ l.d.	≤ l.d.	871,7
47	113,1	≤ l.d.	≤ l.d.	2,1	≤ l.d.	2,2	49,1	≤ l.d.	≤ l.d.	798,9
55	153,5	13,1	≤ l.d.	2,4	≤ l.d.	2,2	53,2	≤ l.d.	≤ l.d.	860,4
71	134,7	18,4	≤ l.d.	2,9	≤ l.d.	2,2	59,7	≤ l.d.	≤ l.d.	784,9
77	-	-	-	-	-	-	-	-	-	874,0
95	131,7	20,0	≤ l.d.	2,4	2,4	2,3	66,1	≤ l.d.	5,7	894,4
103	132,6	32,8	≤ l.d.	3,3	≤ l.d.	2,3	71,2	≤ l.d.	6,3	980,3
119	148,4	27,7	2,1	3,4	≤ l.d.	2,2	60,3	≤ l.d.	8,2	945,8
143	204,9	91,3	2,5	5,6	3,9	2,3	97,5	≤ l.d.	14,9	-
148	311,3	90,7	≤ l.d.	3,2	≤ l.d.	2,5	99,9	≤ l.d.	23,8	-
173	688,7	497,8	3,6	7,2	≤ l.d.	2,7	106,2	≤ l.d.	26,1	1200,2
191	422,7	779,6	4,2	8,9	≤ l.d.	≤ l.d.	131,3	5,1	30,1	1708,6
215	1138,3	738,2	3,0	5,4	≤ l.d.	3,1	103,7	≤ l.d.	29,4	3174,7
239	791,3	904,0	3,4	6,4	≤ l.d.	2,8	132,4	5,3	30,2	6142,9
263	1187,9	1470,7	5,5	11,7	≤ l.d.	3,4	143,9	≤ l.d.	33,5	7175,1
269	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10305,4
287	1207,6	1019,5	4,2	7,7	≤ l.d.	3,3	120,3	≤ l.d.	29,9	12822,9
317	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11998,3
331	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11934,1

(-) análise não realizada. l.d. = limite de detecção (acético = 2,0 mg/L; butírico = 2,0 mg/L; isobutírico = 2,0 mg/L; isovalérico = 2,0 mg/L; propiônico = 2,0 mg/L; acetona = 2 mg/L; etanol = 2 mg/L; metanol = 2 mg/L; n-butanol = 2 mg/L; H₂ = 0,0183 $\mu\text{mol/L}$)

A geração máxima de H₂ ocorreu com 287 horas de operação e foi de 12822,9 $\mu\text{mol/L}$. As porcentagens de H₂ no *headspace* (v/v) variaram de 5,5% a 44,3% para 31 h e 331 h, respectivamente e; com 317 h de operação foram observadas porcentagens máximas que foram de 44,4% (v/v) (Tabela VI.12 – Apêndice VI).

A velocidade global específica de produção de gás hidrogênio no *headspace* dos reatores anaeróbios foi de 1928,5 μmol de H_2/g de SSV.h (Figura 5.50) e foi obtida com 269 h de operação.

O rendimento de xilose a hidrogênio foi de 0,8 mols H_2/mol de xilose, com 293 horas de operação. De acordo com os valores experimentais obtidos, a eficiência de conversão de xilose a H_2 foi de 14,0 %, quando comparada aos valores estequiométricos teóricos.

Parte da matéria orgânica foi transformada nos seguintes ácidos voláteis, acetona e álcoois, com concentrações máximas de: acético (1207,6mg/L), butírico (1470,7 mg/L), isobutírico (5,5 mg/L), isovalérico (11,7mg/L), propiônico (3,9 mg/L), acetona (3,4 mg/L), etanol (143,9 mg/L), metanol (5,3 mg/L) e *n*-butanol (33,5 mg/L). Foi confirmada a rota de degradação metabólica da xilose a ácidos graxos voláteis, álcoois, acetona e gás hidrogênio.

A Figura 5.51 ilustra as porcentagens dos ácidos voláteis gerados em cada ponto de amostragem. Com 143 h de operação as porcentagens de ácidos graxos voláteis gerados foram de 66,5% (ácido acético), 29,6% (ácido butírico); 0,8% (ácido isobutírico), 1,8% (ácido isovalérico) e 1,3% (ácido propiônico).

Figura 5.51 Variação temporal das proporções de ácidos graxos voláteis gerados nos reatores anaeróbios da condição (8) 3588,0 mg xilose/L

Foi observada geração de ácido propiônico em concentrações reduzidas, como nos reatores anaeróbios operados com 1848 mg xilose/L (condição 7). As concentrações máximas de ácido propiônico detectadas ocorreram com 143 h de operação e foram de 3,9 mg/L.

Houve predomínio de ácido acético nas amostragens realizadas. Após 27 h de operação foi detectado 124,0 mg/L de ácido acético. Ocorreu aumento nas concentrações de ácido butírico gerado no período de 55 h (13,1 mg/L) até 287 h (1019,5 mg/L). Ou seja, essa ocorrência foi observada, concomitantemente, com geração de H_2 no *headspace* dos reatores anaeróbios com variações de 860,4 $\mu\text{mol/L}$ (55 h) até 12822,9 $\mu\text{mol/L}$ (287 h).

A Figura 5.52 ilustra as porcentagens de acetona, etanol, metanol e *n*-butanol nos reatores anaeróbios. Com 239 h de operação foram observados 1,6% de acetona, 77,6% de etanol, 3,1% de metanol e 17,7% de *n*-butanol. As concentrações de acetona, metanol e *n*-butanol tiveram pouca variação; entretanto, a geração de etanol foi crescente em função do tempo de operação, conforme descrito a seguir.

Figura 5.52 Variação temporal das proporções de acetona e álcoois gerados nos reatores anaeróbios da condição (8) com 3588,0 mg xilose/L

As concentrações de acetona variaram de 2,1 mg/L no início do ensaio a 3,4 mg/L com 263 h de operação. As gerações máximas observadas de metanol ocorreram em 239 h (5,3 mg/L); enquanto que *n*-butanol (33,5 mg/L) e etanol (143,9 mg/L) foram observados com

263 h de operação. Nos ensaios realizados em concentrações semelhantes de sacarose [condição (4) 4128 mg/L] não foi observado alteração nas concentrações de acetona (15,4 mg/L) e metanol (20,9 mg/L); além da geração de etanol em todo período de operação com valores máximos de 23,0 mg/L, em 185,5 h.

5.4.5 Análise da diversidade microbiana

A Figura 5.53 ilustra a predominância de bacilos nos reatores anaeróbios alimentados com xilose. A coloração de Gram revelou predomínio de bacilos Gram positivos e presença de Gram negativos para as condições estudadas com xilose.

Figura 5.53 Microscopia de contraste de fase e óptica comum da biomassa em reatores anaeróbios alimentados com xilose: (a) bacilo; (b) bacilo; (c) bacilos Gram positivos e Gram negativos e (d) bacilos

Vários fatores puderam contribuir para a manutenção de bacilos nos reatores anaeróbios, conforme descritos a seguir. O acréscimo de peptona ao meio nutricional (Ueno *et al.*, 2001); tratamento a quente do inóculo associado ao meio nutricional específico e

imposição de pH 5,5, que enriqueceram tais populações (Fan, 2004). Portanto, as condições impostas favoreceram a permanência do consórcio microbiano e, consequentemente, a manutenção de espécies tolerantes e formadoras de endósporos, mesmo após mudança do substrato orgânico para xilose.

5.4.6 Análise comparativa dos reatores anaeróbios alimentados com xilose

Os reatores anaeróbios alimentados com xilose tiveram comportamentos diferentes, em relação à produção de gás hidrogênio (Figura 5.54). Para as condições estudadas foi observado fase *lag* de produção de H_2 . Nas condições (5) 630,0 mg xilose/L e (6) 1341 mg xilose/L a fase *lag* de produção de H_2 teve duração de 18 h. As condições impostas, nesse caso, favoreceram a produção de H_2 após 18 h de operação. Contrariamente; as condições (7) 1848,0 mg xilose/L e (8) 3588,0 mg xilose/L apresentaram fase *lag* na produção de H_2 nos períodos de, respectivamente, 147 h e 191 h de operação.

Figura 5.54 Velocidade global específica da produção de H_2 nos reatores anaeróbios alimentados com xilose: (■) 630,0 mg/L; (●) 1341,0 mg/L; (□) 1848,0 mg/L; (▲) 3588,0 mg/L

As condições (5) 630,0 mg/L e (6) 1341,0 mg/L tiveram o mesmo comportamento para o crescimento microbiano com valor máximo de 0,10 g SSV/L, porém para a condição

(5) a ocorrência se deu com 55 horas de operação e com 40 horas de operação para a condição (6), conforme ilustrado na Figura 5.55.

Figura 5.55 Variação temporal do crescimento microbiano nos reatores anaeróbios com xilose: (■) 630,0 mg/L; (●) 1341,0 mg/L; (□) 1848,0 mg/L; (▲) 3588,0 mg/L

Para as condições (7) 1848,0 mg/L e (8) 3588,0 mg/L foram observados crescimentos microbianos mais elevados. Esse fato pode comprovar que as concentrações de xilose impostas não foram inibitórias para a biomassa. Nas condições estudadas não foi observado fase *lag* no crescimento da biomassa (Figura 5.55). Embora as concentrações iniciais dos ensaios tenham sido diferentes; tal fato não causou toxicidade ao consórcio microbiano gerador de H_2 nos reatores anaeróbios. Nos ensaios efetuados com sacarose (630,0 mg/L; 1184,0 mg/L; 1816,0 mg/L e 4126,0 mg/L), as concentrações foram semelhantes às aplicadas nos reatores anaeróbios alimentados com xilose; observou-se fase *lag* no crescimento microbiano para os ensaios das condições (2) 1184,0 mg sacarose/L; (3) 1816,0 mg sacarose/L e (4) 4126,0 mg sacarose/L, conforme descrito anteriormente.

O consumo de xilose apresentou comportamento diferente para as condições estudadas, conforme ilustrado na Figura 5.56. Para a condição (5) 630 mg xilose/L não foi observado fase *lag* para o consumo de xilose nos reatores anaeróbios, conforme descrito anteriormente. Contrariamente, as condições (6) 1341,0 mg xilose/L; (7) 1848,0 mg xilose/L e (8) 3588,0 mg xilose/L apresentaram períodos de fase *lag* no consumo de xilose de, respectivamente, 14h; 66 h e 148 h. Apesar de ter havido crescimento microbiano nas

primeiras horas de operação, o consumo de xilose e a geração de H_2 foram reduzidos nos reatores anaeróbios. Ou seja; o crescimento do consórcio microbiano no início dos ensaios foi atribuído à adição de peptona nos reatores anaeróbios e as gerações máximas de H_2 foram observadas concomitantemente com os consumos de xilose.

Figura 5.56 Variação temporal no consumo de xilose dos reatores anaeróbios para condições: (■) 630,0 mg/L; (●) 1341,0 mg/L; (□) 1848,0 mg/L; (▲) 3588,0 mg/L

A Tabela 5.12 sumariza os resultados dos reatores anaeróbios alimentados com xilose para as condições estudadas. A geração de ácidos graxos voláteis e álcoois também sofreram alteração nas condições estudadas. Em concentrações mais elevadas [condições (7) e (8)] foi observado gerações de ácido propiônico, além dos ácidos acético, butírico, isobutírico e isovalérico. As concentrações máximas de ácido acético aumentaram drasticamente para as condições (7) e (8). Nas condições estudadas, foi observado predomínio na geração de ácido acético, quando comparado com os demais ácidos graxos voláteis. Entretanto; quando ácido butírico foi detectado nas amostragens, foi observado, também, geração de H_2 no *headspace* dos reatores anaeróbios. Essa evidência confirmou que a produção de H_2 foi diretamente proporcional à mistura dos produtos intermediários gerados, principalmente ácidos acético e butírico (Levin *et al.*, 2004).

Tabela 5.12 Resumo geral dos parâmetros obtidos dos reatores anaeróbios para as diferentes condições de alimentação com xilose

Parâmetro	Condição (5) 630,0 mg /L	Condição (6) 1341,0 mg /L	Condição (7) 1848,0 mg /L	Condição (8) 3588,0 mg /L
Consumo de xilose (%)	98	97	97	97
SSV (g/L)	0,09	0,10	0,19	0,21
Período de ocorrência (h)	55	40	148	245
pH (amostragem final)	4,1	4,0	4,3	4,1
Duração do experimento(h)	127	175	191	331
Produtos intermediários gerados (concentrações máximas mg/L)				
Acético	332,6	235,9	856,8	1207,6
Butírico	63,0	363,2	310,7	1470,7
Isobutírico	11,8	4,8	12,7	5,5
Isovalérico	10,2	10,3	24,9	11,7
Propiônico	≤l.d.	≤l.d.	6,1	3,9
Acetona	2,2	2,6	2,8	3,4
Metanol	4,7	13,8	14,2	5,3
Etanol	92,3	60,7	41,5	143,9
<i>n</i> -Butanol	3,9	25,0	1,9	33,5
Geração H ₂ máxima (μmol/L)	1463,0	4039,5	13443,4	12822,9
Período de ocorrência (h)	61	151	197	293
Velocidade global específica de consumo xilose (mmol xilose/L.h)	0,12	0,16	0,23	0,27
Período de ocorrência (h)	33	14	138	148
Velocidade global específica de produção H ₂ (μmol H ₂ /g SSV.h)	1312,2	1772,3	2106,8	1928,5
Período de ocorrência (h)	18	18	186	269
Rendimento (%)	3,0	8,0	10,0	14,0
(mol H ₂ /mol xilose)	0,2	0,5	0,6	0,8
Período de ocorrência (h)	33	151	186	293

l.d. = limite de detecção (acético = 2,0 mg/L; butírico = 2,0 mg/L; isobutírico = 2,0 mg/L, isovalérico = 2,0 mg/L; propiônico = 2,0 mg/L; acetona = 2 mg/L; etanol = 2 mg/L; metanol = 2 mg/L; *n*-butanol = 2 mg/L; H₂ = 0,0183 μmol/L).

As gerações de etanol foram crescentes em todas as condições estudadas e aumentaram em função do tempo de operação. A geração de acetona teve pouca variação nas condições estudadas.

Não houve produção de metano nos reatores anaeróbios, confirmando a eficiência do pré-tratamento do inóculo e imposição do pH inicial 5,5. A associação desses dois fatores causou a inibição de bactérias consumidoras de H_2 .

Lin *et al.* (2006) obtiveram rendimentos de 1,17 mol H_2 /mol xilose, com inóculo proveniente de esgoto doméstico, a pH inicial 7,0 e 35° C em reatores anaeróbios em batelada alimentados com xilose (20 g DQO/L), 46% de H_2 na composição do *headspace* e remoção de 68% de xilose ao final das 120 h de operação. Espécies de *Clostridium* foram identificadas no sequenciamento como responsáveis pela geração de H_2 nos reatores anaeróbios.

No presente trabalho, as concentrações de xilose aplicadas não foram inibitórias para a geração de H_2 nos reatores. As gerações máximas de H_2 , velocidades globais e específicas do consumo de xilose e os rendimentos de H_2 a partir de xilose foram crescentes em função do aumento das concentrações de xilose nos reatores anaeróbios, conforme Tabela 5.12. Para a condição (8) com concentrações de 3588,0 mg xilose/L foram obtidos os melhores resultados [44,4% (v/v) de H_2 na composição do *headspace*, 12882,9 μ mol H_2 /L; 270,0 μ mol xilose consumida/L.h; 1928,5 μ mol H_2 /g SSV.h e rendimentos 0,8 mol H_2 /mol xilose].

O rendimento de xilose a H_2 para a condição (8) (0,8 mol H_2 /mol xilose) foi ligeiramente superior ao valor observado por Lin *et al.* (2008) (0,7 mol H_2 /mol xilose) em quimiostatos, a 35°C, com inóculo (tanque de sedimentação de tratamento municipal de plantas) pré-tratado a quente (100°C durante 45 minutos), alimentados com 20 g DQO xilose/L. Quando os autores alteraram a temperatura de operação para 50 °C os rendimentos obtidos foram de 1,4 mol H_2 /mol xilose. Análises da diversidade microbiana para as duas condições operacionais avaliadas, 35 °C e 50 °C, permitiu identificar espécies de *Clostridium* sp. para ambas as condições de temperatura; entretanto espécies de *Klebsiella pnemoniae* e *Bacillus* sp. foram verificadas apenas para a temperatura de 35° C.

5.5 Considerações Finais

O inóculo advindo de reator UASB usado no tratamento de dejetos de suinocultura, pré-tratado a quente e posteriormente enriquecido, que foi utilizado no presente trabalho, apresentou capacidade de gerar hidrogênio a partir de açúcares como sacarose e xilose, nas condições estudadas. Portanto, as bactérias anaeróbias presentes nesse inóculo de país tropical foram capazes de produzir hidrogênio, semelhantes àsquelas provenientes de lodo de estações de tratamento de esgoto sanitário (Lin, 2006), lodo de águas residuárias de plantas (Lin, 2008 e Kim, 2006), lodos ativados (Ueno, 2001), estrume (Fan, 2004), dentre outros inóculos de países de clima temperado.

A maior produção teórica de hidrogênio prevê ácido acético como produto final da fermentação, conforme descrito anteriormente. Entretanto, os ácidos orgânicos obtidos foram, principalmente, acético e butírico nos ensaios realizados com sacarose e xilose. Portanto, essa ocorrência confirmou no presente trabalho que a produção elevada de hidrogênio esteve associada com uma mistura dos produtos da fermentação; tais como, ácido acético e ácido butírico; assim como observado por Levin *et al.*, (2004).

Os resultados experimentais, tais como, gerações dos ácidos acético e butírico para as condições estudadas, demonstraram que os microrganismos advindos do inóculo tiveram função metabólica similar a espécies de *Clostridium*. Esse fato revelou que o inóculo pré-tratado a quente, possuiu capacidade elevada para degradar sacarose e xilose, além de gerar gás hidrogênio (Fan *et al.*, 2004); ácidos e álcoois (Keis *et al.*, 1995).

A produção biológica de gás hidrogênio foi devida a consórcio de espécies de bactérias que estiveram presentes nas condições estudadas, identificadas principalmente como *Clostridium* sp.; *Clostridium acetobutyricum*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter cloacae*.

A Tabela 5.13 compara os resultados obtidos no presente trabalho com pesquisas descritas na literatura.

Tabela 5.13 Comparação dos melhores resultados obtidos no presente trabalho com a literatura

	Reator	Inóculo	pH e Temp.	Fonte C	Rendimento H₂/substrato	Bactérias identificadas
Presente trabalho	Batelada	Pré-tratado (90°C 10') Dejetos suinocult.	5,5 37 °C	Sacarose (1,2 g /L) Xilose (3,5 g /L)	1,6 mol/mol H ₂ (20%) 0,8 mol/mol H ₂ (14%)	<i>Clostridium</i> sp. <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Burkholderia</i> sp. <i>Enterobacter cloacae</i>
Kim <i>et al.</i> (2006)	Fluxo Continuo	Pré-tratado (90°C 10') Ag.res.pl.	5,4 35 °C	Sacarose (30g DQO/L)	1,2 mol/mol H ₂ (15%)	<i>C tyrobutyricum</i> <i>C.acetobutyricum</i> <i>C. acidisoli</i> <i>C. scalogenes</i>
Fan <i>et al.</i> (2004)	Batelada	Pré-tratado 105°C 2h Estrume	5,5 36 °C	Sacarose (6 g/L)	4,9 mol/mol H ₂ (61%)	<i>Clostridium</i> sp.
Ueno <i>et al.</i> (2001)	Batelada Fluxo Continuo	Lodos ativados	6,6 -5,2 6,4 60 °C	Celulose 5g/L Peptona 2g/L	2,0 mol/mol H ₂ (peptona) 1,0 mol/mol H ₂ (sem peptona)	<i>Clostridium thermobutyricum</i>
Fernandes (2008)	Fluxo continuo ascendente TDH 0,5 h	Meio de cultivo fermentado	5,5 25 °C	Sacarose (0,89 g/L)	4,5 mol/mol H ₂ (50%) etapa inicial	<i>Clostridium</i> sp. <i>Klebsiella</i> sp.
Lin <i>et al.</i> (2006)	Batelada	90° C 45' Esgoto	7,0 35 °C	Xilose 20 g DQO/L	1,2 mol/mol H ₂	<i>Clostridium</i> sp.
Lin <i>et al.</i> (2008)	Batelada	90° C 45' ág.res.pl.	7,1 35 °C 50 °C	Xilose 20 g DQO/L	0,7 mol/mol H ₂ 1,4 mol/mol H ₂	<i>Clostridium</i> sp. <i>Klebsiella pneumoniae</i>

Nos reatores anaeróbios alimentados com sacarose foram obtidos os melhores rendimentos para 1184 mg sacarose/L. Esses resultados foram superiores aos descritos por Kim *et al.* (2006).

Nos reatores alimentados com xilose foram obtidos rendimentos de 0,8 mols H₂/mol xilose; resultados superiores aos conseguidos por Lin *et al.* (2008) com temperatura de 35 C.

A adição de peptona no início dos ensaios dos reatores alimentados com sacarose e xilose foi essencial para o desenvolvimento do consórcio microbiano gerador de H₂. Ueno *et al.* (2001) também verificaram que o acréscimo de peptona favoreceu rendimentos superiores de H₂ em reatores alimentados com celulose.

O controle de pH 5,5 associado à alimentação com meio de cultivo Del Nery, propiciou geração de H₂ nos reatores anaeróbios alimentados com sacarose e xilose. Fernandes (2008) confirmou essa hipótese em sua pesquisa em reatores de leito fixo com fluxo ascendente alimentados com 0,89 g sacarose/L.

A diversidade microbiana identificada no presente trabalho e representada por espécies de *Clostridium* também foi observada nos trabalhos desenvolvidos por Fan *et al.* (2004); Ueno *et al.* (2001); Lin *et al.* (2006); Kim *et al.* (2006); além de espécies de *Klebsiella* (Fernandes, 2008; Lin *et al.*, 2008), como geradoras de gás hidrogênio, para as condições estudadas. Tal fato comprovou que foram essas as espécies de bactérias geradoras de gás hidrogênio nas condições estudadas.

6. CONCLUSÕES

6.1 Obtenção do Consórcio microbiano

O pré-tratamento do inóculo foi eficiente para a seleção microbiana de espécies produtoras de hidrogênio.

O pH 5,5, no início do experimento, auxiliou na inibição de espécies consumidoras de gás hidrogênio.

As adições de peptona e solução de vitaminas auxiliaram a geração de H_2 em menor intervalo de tempo e beneficiaram o desenvolvimento de consórcios microbianos produtores de hidrogênio nos reatores de enriquecimento.

Exames de microscopia revelaram o predomínio de bacilos Gram positivos, formadores de endósporos. Essa evidência corroborou a obtenção de espécies geradoras de gás hidrogênio no consórcio microbiano.

6.2 Caracterização do Consórcio Microbiano

As análises de Biologia molecular por meio da clonagem e sequenciamento do inóculo enriquecido permitiram identificar bactérias semelhantes a *Clostridium*, *Klebsiella* e *Burkholderia*.

A presença de espécies de *Burkholderia* foi atribuída à sua resistência às condições ambientais impostas; uma vez que não há relatos de geração de H_2 por essa espécie.

A produção biológica de H_2 foi devida ao consórcio de bactérias que estiveram presentes nas condições estudadas, identificados principalmente como espécies de *Clostridium* e *Klebsiella*, reconhecidos na literatura como espécies geradoras de gás hidrogênio.

6.3 Ensaios com reatores anaeróbios alimentados com sacarose

Ocorreu geração de H_2 nas quatro condições estudadas.

Não houve geração de metano nas condições estudadas. Esse fato comprovou a eficiência do pré-tratamento do inóculo e imposição do pH 5,5 que inibiram microrganismos produtores de metano e consumidores de H_2 .

As adições de peptona e solução de vitaminas auxiliaram a geração de H_2 em menor intervalo de tempo e beneficiaram o desenvolvimento de consórcios microbianos produtores de hidrogênio.

As condições (1) 630,0 mg sacarose/L e (2) 1184,0 mg sacarose/L apresentaram geração de H_2 nas primeiras horas de operação demonstrando que as concentrações de substrato não foram inibitórias.

As condições (3) 1816,0 mg sacarose/L e (4) 4128,0 mg sacarose/L apresentaram fase *lag* de geração de H_2 . Nesse caso o consórcio microbiano necessitou adaptar-se para que pudesse consumir sacarose e produzir H_2 .

A condição (4) 4128,0 mg sacarose/L apresentou a menor velocidade de produção de H_2 , com longo período de tempo na fase *lag*. As condições impostas de concentrações elevadas de substrato tornaram-se tóxicas para o consórcio microbiano ocasionando lentidão no processo de geração de H_2 .

Os produtos intermediários gerados foram ácidos acético e butírico, acetona, metanol e etanol em todos os reatores anaeróbios alimentados com sacarose. Os ácidos propiônico, isobutírico e isovalérico foram observados somente para as condições (3) e (4).

Na condição (2) 1184,0 mg sacarose/L foi verificado o melhor rendimento de sacarose a H_2 (1,6 mol H_2 /mol sacarose). Enquanto, na condição (3) 1816,0 mg sacarose/L foi verificada a melhor velocidade global específica de produção de H_2 (10059,5 μ mol H_2 /g SSV).

Avaliação da diversidade microbiana presente no final dos ensaios, para as quatro condições estudadas com sacarose, por meio da técnica do PCR/DGGE, recorte de bandas e sequenciamento permitiu identificar bactérias semelhantes a *Enterobacter*, *Clostridium*, e *Burkholderia*. Essa evidência confirmou que as condições impostas favoreceram o consórcio microbiano advindo do inóculo enriquecido. A permanência de *Burkholderia* foi atribuída à tolerância dessa espécie às condições ambientais impostas. A constatação de *Enterobacter* e *Clostridium* no final dos ensaios dos reatores operados com sacarose confirmou que essas estiveram envolvidas na geração de H_2 nas condições estudadas.

6.4 Ensaios com reatores anaeróbios alimentados com xilose

Ocorreu geração de H_2 nas quatro condições estudadas.

Não houve geração de metano nas quatro condições estudadas. Esse fato comprovou a eficiência do pré-tratamento do inóculo e imposição do pH 5,5 que inibiram microrganismos produtores de metano e consumidores de H_2 .

As adições de peptona e solução de vitaminas auxiliaram a geração de H_2 em menor intervalo de tempo e beneficiaram o desenvolvimento de consórcios microbianos produtores de hidrogênio.

As condições (5) 630 mg xilose/L, (6) 1341 mg xilose/L, (7) 1848 mg xilose/L e (8) 3588 mg xilose/L apresentaram crescimento da biomassa nas primeiras horas de operação; porém a xilose não foi consumida imediatamente. O crescimento do consórcio microbiano no início dos ensaios foi atribuído às adições de peptona.

Ocorreu fase *lag* de geração de H_2 nas quatro condições estudadas. Nesse caso, ficou evidenciado que primeiro ocorreu o consumo de peptona e, posteriormente, consumo de xilose, concomitantemente com a geração de H_2 .

As condições (7) 1848,0 mg xilose/L e (8) 3588,0 mg xilose/L apresentaram gerações de H_2 elevadas, com longo período de tempo na fase *lag*. As condições impostas de concentrações elevadas de substrato não foram inibitórias. Essa evidência confirmou que a biomassa consumiu peptona primeiramente, para que pudesse gerar H_2 a partir de xilose.

A condição (8) 3588,0 mg xilose/L apresentou os melhores rendimentos de xilose a H_2 (0,8 mols H_2 /mol xilose). As condições impostas de concentrações elevadas de substrato não foram tóxicas para a biomassa o que resultou em geração de H_2 .

Os produtos intermediários gerados foram ácidos graxos voláteis, álcoois e acetona nos reatores anaeróbios. Em concentrações mais elevadas [condições (7) e (8)] foi observado geração de ácido propiônico, além de ácido acético, ácido butírico, ácido iso-butírico e ácido iso-valérico.

As análises de microscopia revelaram presenças de bacilos, endósporos e bacilos com endósporos, confirmando que sejam essas morfologias as responsáveis pela geração de gás hidrogênio nos reatores anaeróbios alimentados com sacarose e xilose.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Com os resultados experimentais dessa pesquisa foi possível propor novos trabalhos, conforme descritos a seguir:

- 7.1 Incubar cultura pura da espécie *Burkholderia* em reatores anaeróbios em batelada, alimentados com sacarose e xilose, separadamente e verificar se ocorre geração de H_2 ;
- 7.2 Testar concentrações de xilose mais elevadas a partir do inóculo enriquecido com o objetivo de verificar rendimentos de xilose a H_2 ;
- 7.3 Testar outros substratos com inóculo enriquecido para gerações de H_2 ;
- 7.4 Utilizar o inóculo enriquecido na operação de reatores, em escala de bancada, em outras configurações.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AHN, Y.; PARK, E.-J., OH, Y.-K., PARK, S.; WEBSTER, G.; WEIGHTMAN, A.J. (2005). Microbial community of biofilm from a thermophilic trickling biofilter used for continuous biohydrogen production. *FEMS Microbiology Letters*, 249:31-38.

ALIJA, H.A. (2003). Identification of indole-3-acetic acid producing freshwater wetland rhizosphere bacteria associated with *Juncus effusus* L. *Canadian Journal Microbiology*, 49:781-787.

AMANN, R.L.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.-H. (1995). Phylogenetic Identification and In Situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation. *Microbiological Reviews*, 59:143-169.

BENARDINI et al. (2006). Não publicado. Site: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

BLACK, J.G. (1999). *Microbiologia – Fundamentos e Perspectivas*. 4a edição. Editora Guanabara. Rio de Janeiro – RJ.

BHOWAL et al. (2008). Não publicado. . Site: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

BOWMAN K. S., MOE W.M. , RASH B. A., BAE H-S, RAINEY F A. (2006). Bacterial diversity of an acidic Louisiana groundwater contaminated by dense non aqueous-phase liquid containing chloroethanes and other solvents. *FEMS Microbiol Ecol*, 58:120-133.

CAREPO, M.; BAPTISTA, A.; PAMPLONA A.; FAUQUE, G.; MOURA, J.J.G., REIS, M.A.M. (2002). Hydrogen metabolism in *Desulfovibrio desulfuricans* strain New Jersey (NCIMB 8313) – comparative study with *D. Vulgaris* and *d.gigas* species. *Anaerobe*, 8:325-332.

CETESB (1985). Levantamento dos Despejos de uma Indústria de Refrigerantes no Estado de São Paulo, 1985.

- CHEN, C.C.; LIN C.Y. (2003). Using sucrose as a substrate in an anaerobic hydrogen-producing reactor. *Advances in Environmental Research*, 7:695-699.
- CHEN, W-M; TSENG, Z-J; LEE, K-S; CHANG, J-S (2005). Fermentative hydrogen production with *Clostridium butyricum* CGS5 isolated from anaerobic sewage sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*, 30:1063-1070.
- CHEN, X.; SUN, Y.; XIU, Z.; LI, X.; ZHANG, D. (2006). Stoichiometric analysis of biological hydrogen production by fermentative bacteria. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31:539-549.
- DAS, D.; VEZIROGLU, T.N. (2001). Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. *International Journal of Hydrogen Energy*, 26:13-28.
- DEL NERY, V. (1987). Utilização de lodo anaeróbio imobilizado em gel no estudo da partida de reatores de fluxo ascendente com manta de lodo. São Carlos. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- DSM - Scientific Services of Culture Collections (1991). Curso Ministrado na Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”, Campinas.
- DUARTE, I.C.S. Caracterização Microbiológica da Remoção e Degradação de Alquilbenzeno Linear Sulfonado (LAS) em Reatores Anaeróbios com Biofilme e Células Planctônicas. Tese de doutorado, EESC, USP, São Carlos, 2006.
- DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28: 350-356.
- FAN Y.; LI C.; LAY J-J.; HOU H.; ZHANG G. (2004). Optimization of initial substrate and pH levels for germination of sporing hydrogen-producing anaerobes in cow dung compost. *Bioresource Technology*, 91:189-193.
- FANG, H.P.H., LIU H., ZHANG T. (2001). Characterization of a hydrogen-producing granular sludge. *Biotechnology Bioengineering*, 78:44-52.

FANG, H P.H.; LIU H. (2002). Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture. *Bioresource Technology*, 82:87-93.

FANG, H.H.P.; LI, C.; ZHANG T. (2006). Acidophilic biohydrogen production from rice slurry. *International journal of Hydrogen Energy*, 31:683-692.

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

GRIFFITHS, R.I.; WHITELEY, A.S.; O'DONNELL, A.G. (2000). Rapid Method for coextration of DNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA and rRNA-based microbial community composition. *Applied and Environmental microbiology*, 66(12):5488-5491.

HALDA-ALIJA L (2003). Identification of indole-3-acetic acid producing freshwater wetland rhizosphere bacteria associated with *Juncus effusus* L., *Canadian Journal of Microbiology*, 12:781-787.

HALLENBECK, P. C. (2004). Fundamentals of the fermentative production of hydrogen. Anaerobic Bioconversion for sustainability. 10th World Congress. Montreal, Canada. 1:241-248.

HAWKES, F.R.; HUSSY, I.; KYAZZE, G.; DINSDALE, R.; HAWKES, D.L. (2007). Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: Principles and progress. *International Journal of Hydrogen Energy*, 32:172-184.

HERBERT D., PHILIPPS, OS, STRANG, R.E (1971). Carbohydrate analysis. *Methods Enzymol SB*, 265-277.

HORIUCHI, J-I; SHIMIZU, T.; TADA, K.; KANNO T.; KOBAYASHI M. (2002). Seletive production of organic acids in anaerobic acid reactor by pH control. *Bioresource Technology*, 82:209-213.

HONG Q; ZHANG Z; HONG Y; LI S (2007). A microcosm study on bioremediation of fenitrothion-contaminated soil using Burkholderia sp. FDS-1. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 59:55-61.

IVERSEN, C.; LEHNER, A.; MULLANE, N.; BIDLAS, E.; CLEENWERCK, I.; MARUGGI, J.; FANNIG, S.;STEPHAN, R.; JOOSTEN, H. (2007). The taxonomy of *Enterobacter sakazakii*: proposal of a new genus *Cronobacter* gen.nov. and descriptions of *Cronobacter sakazakii* comb. nov. *Cronobacter sakazakii* subsp. *Sakazakii*, comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *Malonaticus* subsp. Nov., *Cronobacter turicensis* sp.nov., *Cronobacter muytjensii* sp. Nov., *Cronobacter dublinensis* sp. Nov. and *Cronobacter genomospecies* I. *BMC Evolutionary Biology*, 7:64.

JIA et al. (2007) Não publicado. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

KALIA, V.C.; SADHANA L.; GHAI R.; MANDAL M. CHAUHAN A. (2003). Mining genomic databases to identify novel hydrogen producers. *Trends in Biotechnology*, 21(4):152-156.

KATAOKA, N.; MIYA, A.;KIRIYAMA, K. (1997). Studies on hydrogen production by continuous culture system of hydrogen-producing anaerobic bacteria. *Wat.Sci.Tech.*, 36(6-7):41-47.

KAWAGOSHI, Y.; HINO, N; FUJIMOTO, A.; NAKAO, M.; FUJITA, Y.; SUGIMURA, S.; FURUKAWA.; K. (2005). Effect of seed sludge conditioning on hydrogen fermentation and pH effect on bacterial community relevant to hydrogen production. *Journal of Bioscience and Bioenginneering*, 100(5):524-530.

KEIS, S.; BENNETT, C. F.; WARD, V. K.; JONES, D. T. (1995). Taxonomy and Phylogeny of Industrial Solvent-Producing Clostridia. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45, 693-705.

KHANAL, S.K.; CHEN, W-H; LI, L.; SUNG, S. (2004). Biological hydrogen production: effects and intermediate products. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29:1123-1131.

KIM D-H; HAN S-K; KIM S-H; SHIN H-S (2006). Effect of gás sparging on continuous fermentative hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31:2158-2169.

KOTAY S. M.; DAS D. (2007). Microbial hydrogen production with *Bacillus coagulans* IIT-BT S1 isolated from anaerobic sewage sludge. *Bioresource Technology*, 98:118-1190.

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

LANE, D.J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In: *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, p.115-175. Edited by E. Stackebrandt.

LEE, Y-J; ROMANEK, C.S.; WIEGEL, J. (2007). *Clostridium aciditolerans* sp. Nov., an acid-tolerant spore-forming anaerobic bacterium from constructed wetland sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57:311-315.

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

LIN, C-Y; LEE, CY; TSENG, I-C; SHIAO, I. Z. (2005). Biohydrogen production from sucrose using base-enriched anaerobic mixed microflora. *Process Biochemistry*, 41:915-919.

LIN, C-Y; CHENG, C-H (2006). Fermentative hydrogen production from xylose using anaerobic mixed microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31:832-840.

LIN, C-Y; HUNG, C-H; CHEN, C-H; CHUNG, W-T; CHENG, L-T. C. (2006). Effects of initial cultivation pH on fermentative hydrogen production from xylose using natural mixed cultures. *Process Biochemistry*, 41:1386-1390.

LIN, C-Y; WU C-C; HUNG, C-H (2008). Temperature effects on fermentative hydrogen production from xylose using mixed anaerobic cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33:43-50.

LUEDERS, T.; POMMERENKE, B.; FRIEDRICH, M. W. (2004). Stable-isotope probing of microorganisms thriving at thermodynamic limits: Syntrophic propionate oxidation in flooded soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 70:778-5786.

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

Mc CLELLAND, M. *et al.* (2006). Não publicado. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

MORAES, E. M., ADORNO M. A. T., ZAIAT M. E FORESTI E. (2000), Determinação de Ácidos Voláteis por Cromatografia Gasosa em Efluentes de Reatores Anaeróbios Tratando

Resíduos Líquidos e Sólidos In: VI Oficina e Seminário Latino-Americano de Digestão Anaeróbia, 2000, Recife - PE. Anais da VI Oficina e Seminário Latino-Americano de Digestão Anaeróbia. Recife – PE. Ed. Universitária - UFPE, 2:235-238.

MORETTI, P. E. (2007). Microbiologia, Fundamentos & Aplicações – Métodos em Microbiologia.

MUTHUKUMARASAMY R; KANG U G; PARK K D; JEON W – T; PARK C Y; CHO Y S; KWON S-W; SONG J; ROH D –H; REVATHI G (2006). Enumeration, isolation and identification of diazotrophs from Korean wetland rice varieties grown with long-term application of N and compost and their short-term inoculation effect on rice plants. *Journal of Applied Microbiology*, 102:981-991.

NEWCOMBE *et al.* (2008). Não publicado. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

NI M; LEUNG, D. Y. C.; LEUNG, M. K. H.; SUMATHY, K. (2006). An overview of hydrogen production from biomass. *Fuel Processing Technology*, 87:461-472.

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

OH, S.E.; GINKEL, S.V.; LOGAN, B.E (2003). The relative effectiveness of pH control and heat treatment for enhancing biohydrogen gas production. *Environ.Sci.Technol.*, 37:5186-5190.

PACE, N.R. (1997). A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science*, 276:734-740.

PUMA J LI (2007). Update on *Burkholderia* nomenclature and resistance. *Clinical Microbiology Newsletter*, 29: 65-69.

QUYEN *et al.* (2006). Não publicado. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

RUZICKA M. (1996). The effect of hydrogen on acidogenic glucose cleavage. *Water Research*, 30(10):2447-2451.

SAITOU, N.; NEI, M. (1987). The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 4:406-425.

SATOH A.; WATANABE M.; UEKI A.; UEKI K. (2002). Physiological Properties and Phylogenetic Affiliations of Anaerobic Bacteria Isolated from Roots of Rice Plants Cultivated on a Paddy Field. *Anaerobe*, 8:233-246.

SALERMO M.B.; PARK W.; ZUO Y.; LOGAN B. (2006). Inhibition of biohydrogen production by ammonia. *Water research*, 40:1167-1172.

SEVEG O.; ABELIOVICH A.; KUSHMARO A. (2007). Biodegradation of dibromoneopentyl glycol by a bacterial consortium. *Chemosphere*, 68:958-964.

SHIN, J-H; YOON, J-H; AHN, E.K., KIM, M-S, SIM, S.J.; PARK, T.H. (2007). Fermentative hydrogen production by the newly isolated *Enterobacter asburiae* SNU-1. *International Journal of Hydrogen Energy*, 32:192-199.

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

SPEECE, R.E. (1996). *Anaerobic Biotechnology for Industrial Wastewaters*. Nashville, Tennessee, Archae Press.

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

VAN GINKEL, S.W.; LOGAN, B. (2005). Increased biological hydrogen production with reduced organic loading. *Water Research*, 39:3819-3826.

VASCONCELOS D. C.; TEPOLE F S; RAMIREZ C.J.; ORDAZ N.R.; MAYER C.J.J.G. (2006). Cometary degradation of chlorophenols by a strain of *Burkholderia* in fed-batch culture. *Enzyme and Microbial Technology*, 40:57-60.

WANG, C.C.; CHANG, C.W.; CHU, C.P.; LEE, D.J.; CHANG, B.V.; LIÃO, C.S. (2003). Producing hydrogen from wastewater sludge by *Clostridium bifermentans*. *Journal of Biotechnology*, 102:83-92.

WANG C-H; LIN P-J; CHANG J-S (2006). Fermentative conversion of sucrose and pineapple waste into hydrogen gas in phosphate-buffered culture seeded with municipal sewage sludge. *Process Biochemistry*, 41:1353-1358.

WIDDEL, F., PFENNIG, N. (1984), Genus *Desulfobacter*. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2, 1599p.

WU, S. Y.; LIN, C.; CHANG, J.; LEE, K.; LIN, P. (2002). Microbial hydrogen production with immobilized sewage sludge. *Biotechnol. Prog.*, 18:921-926.

XU *et al.* (2007). Não publicado. Site: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

ZHANG, T., FANG, H. H. P. (2000). Digitization of DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) profile and cluster analysis of microbial communities. *Biotechnol. Lett.*, 22:399-405.

ZHANG, H.; BRUNS, M.A.; LOGAN, B.E. (2006) Biological hydrogen production by *Clostridium acetobutyricum* in an unsaturated flow reactor. *Water Research*, 40:728-734.

ZHANG Y.; LIU G.; SHEN J. (2005). Hydrogen production in batch culture of mixed bacteria with sucrose under different iron concentrations. *International Journal of Hydrogen Energy*, 30:855-860.

APÊNDICE I

Tabela I.1 Medidas de absorvância e Massa Seca de duplicata de reatores anaeróbios operados com 2000 mg sacarose/L

ABS (600 nm)			MASSA SECA (g SSV/L)						
R1	R2	MÉDIA	PO	P1	R1	PO	P1	R2	MÉDIA
0,01	0,02	0,01	21,89	21,89	0,05	28,53	28,53	0,03	0,04
0,05	0,04	0,05	24,42	24,43	0,08	22,45	22,45	0,10	0,09
0,14	0,10	0,12	29,26	29,29	0,56	22,83	22,83	0,08	0,32
0,07	0,09	0,08	22,72	22,73	0,27	29,20	29,21	0,14	0,20

R1 e R2 – duplicatas de reatores

PO – cápsula calcinada

P2 – massa seca

Figura I.1 Obtenção da equação que relaciona absorvância e massa seca para reatores anaeróbios operados com 2000 mg sacarose/L

APÊNDICE II

Tabela II.1 Medidas de absorvância e Massa Seca de duplicata de reatores anaeróbios operados com 2000 mg xilose/L

ABS (600 nm)					MASSA SECA (g SSV/L)				
R1	R2	MEDIA	PO	P1	R1	PO	P1	R2	MÉDIA
0,03	0,03	0,03	26,65	26,65	0,03	22,73	22,73	0,04	0,04
0,04	0,03	0,04	24,43	24,43	0,04	28,18	28,19	0,04	0,04
0,07	0,07	0,07	21,52	21,53	0,08	30,97	30,97	0,04	0,06
0,07	0,08	0,08	23,35	23,35	0,05	21,89	21,89	0,07	0,06
0,07	0,08	0,08	23,41	23,41	0,06	23,80	23,81	0,08	0,07
0,08	0,08	0,08	27,41	27,41	0,11	30,34	30,35	0,09	0,10
0,12	0,13	0,12	30,30	30,30	0,10	22,68	22,68	0,10	0,10
0,22	0,16	0,19	23,56	23,57	0,15	22,17	22,18	0,19	0,17
0,19	0,21	0,20	24,54	24,54	0,17	21,16	21,16	0,14	0,15

R1 e R2 – duplicatas de reatores

PO – cápsula calcinada

P2 – massa seca

Figura II.1 Obtenção da equação que relaciona absorvância e massa seca para reatores anaeróbios operados com 2000 mg xilose/L

APÊNDICE III

CURVA DE HIDROGÊNIO – CROMATÓGRAFO GC 2010

Temperatura ambiente = 301° K

Pressão ambiente = 696,7 mmHg

Constante dos gases = 62,3

$PV = nRT$

Tabela III.1 Volumes de H₂ injetados e área cromatográfica obtida para curva de calibração de medidas de H₂ em cromatógrafo gasoso GC 2010

Volume de H ₂ (uL)	Volume de H ₂ (L)	Mols de H ₂	Área cromatogr.	Mols de H ₂	Área cromatogr.
5	0,000005	1,85764E-07	50485,2	1,85764E-07	50489,15
5	0,000005	1,85764E-07	47063,3	3,71528E-07	149070,7
5	0,000005	1,85764E-07	48139,7	1,11458E-06	654138
5	0,000005	1,85764E-07	56268,4	1,85764E-06	1184133,525
		1,85764E-07	50489,15	2,97222E-06	1733606,625
10	0,00001	3,71528E-07	156438,1	3,71528E-06	1974617,3
10	0,00001	3,71528E-07	152910,8		
10	0,00001	3,71528E-07	141546,5		
10	0,00001	3,71528E-07	145387,4		
		3,71528E-07	149070,7		
30	0,00003	1,11458E-06	695433,4		
30	0,00003	1,11458E-06	658669,7		
30	0,00003	1,11458E-06	631484,5		
30	0,00003	1,11458E-06	630964,4		
		1,11458E-06	654138		
50	0,00005	1,85764E-06	1209234,7		
50	0,00005	1,85764E-06	1224414,1		
50	0,00005	1,85764E-06	1198311,2		
50	0,00005	1,85764E-06	1104574,1		
		1,85764E-06	1184133,525		
80	0,00008	2,97222E-06	1751216,7		
80	0,00008	2,97222E-06	1752115		
80	0,00008	2,97222E-06	1814666,2		
80	0,00008	2,97222E-06	1616428,6		
		2,97222E-06	1733606,625		
100	0,0001	3,71528E-06	1995665		
100	0,0001	3,71528E-06	2091263,5		
100	0,0001	3,71528E-06	1970608,8		
100	0,0001	3,71528E-06	1840931,9		
		3,71528E-06	1974617,3

Figura III.1 - Obtenção da equação que relaciona mols de H₂ e área cromatográfica

APÊNDICE IV

DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS E ÁLCOOIS

Tabela IV.1 Equações das curvas de calibração e R² – y = fator de resposta e x = concentração (mg/L)

ÁCIDOS E ÁLCOOIS	EQUAÇÕES DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO (média entre as áreas das triplicatas)	R ²
Cromatografia gasosa- Cromatógrafo HP 6890/FID de ionização de chama		
Acético	$y = 0,122507x + 0,00208471$	0,999703
Butírico	$y = 1,17386x + 0,101491$	0,99962
Iso-butírico	$y = 1,14571x + 0,0152344$	0,99966
Iso-valérico	$y = 1,20633x + 0,00721814$	0,9996
Propiônico	$y = 0,695240x - 0,0009376$	0,99988
Cromatografia gasosa - Cromatógrafo gasoso Shimadzu GC-2010 de ionização de chama e amostrador automático para <i>headspace</i> COMBI-PAL		
Acético	$y = 0,003574 + 0,1251875$	0,9995
Butírico	$y = 0,0492 + 1,196695$	0,9847
Iso-butírico	$y = 0,06579 - 0,051253$	0,9809
Iso-valérico	$y = 0,1301833 - 0,03868$	0,9809
Propiônico	$y = 0,017979 + 0,00937$	0,9923
Acetona	$y = 0,01695x - 0,0324$	0,9993
Etanol	$y = 0,0040982 - 0,05661$	0,9894
Metanol	$y = 0,0009196 - 0,011847$	0,9865
N-butanol	$y = 0,01804 - 0,004384$	0,9998

Fator de resposta = área ácido/área padrão interno

Padrão interno para Álcoois = isobutanol

Padrão interno para ácidos = ácido crotônico

APÊNDICE V

a) Curva de calibração para determinação de sacarose

Tabela V.1 Medidas de absorbância obtidas a partir de soluções com concentrações diferentes de sacarose

Sacarose(mg/L)	ABS (480 nm) Duplicata 1	ABS (480 nm) Duplicata 2	Média (480 nm)
200	2,122	2,076	2,099
100	1,069	1,073	1,071
50	0,541	0,484	0,5125
20	0,209	0,217	0,213
10	0,105	0,123	0,114

Figura V.1 Obtenção da equação que relaciona absorbância e concentração de sacarose

b) Curva de calibração para determinação de xilose

Tabela V.2 Medidas de absorvância obtidas a partir de soluções com concentrações diferentes de xilose

Xilose (mg/L)	ABS (480 nm) Triplicata 1	ABS (480 nm) Triplicata 2	ABS (480 nm) Triplicata 3	Média (480 nm)
10	0,244	0,238	0,211	0,231
25	0,551	0,589		0,57
50	0,966	0,898	0,976	0,946667
100	2,59	1,846	2,001	2,145667
150	2,632	2,618	2,695	2,648333
180	3,046	3,009	3,081	3,045333

Figura V.2 Obtenção da equação que relaciona absorvância e concentração de xilose

APÊNDICE VI

Tabela VI.1 Variação temporal do crescimento celular e consumo de sacarose nos reatores anaeróbios da condição (1) com 630,0 mg sacarose/L

Tempo (h)	ABS (600 nm)	SSV (g/L)	Sacarose (mg/L)
0	0,03	0,07	630,0
2	0,04	0,10	530,4
3,5	0,06	0,16	475,1
5	0,08	0,20	344,1
6,5	0,09	0,23	275,3
8	0,10	0,26	178,0
9,5	0,10	0,26	161,8
11	0,09	0,25	162,5
13	0,10	0,25	151,0
15	0,10	0,25	152,0
28	0,10	0,25	123,6

Tabela VI.2 Variação temporal da porcentagem e pressão parcial de gás H₂ nos reatores anaeróbios da condição (1) com 630,0 mg sacarose/L

Tempo	H₂	PH₂
(h)	% (v/v)	(atm)
0	0	0
2	0,7	0,0016
3,5	3,0	0,0086
5	8,1	0,0233
6,5	14,0	0,0367
8	17,8	0,0440
9,5	22,3	0,0568
11	25,2	0,0581
13	27,0	0,0650
15	27,4	0,0650
28	28,6	0,0680

Tabela VI.3 Variação temporal do crescimento celular e consumo de sacarose dos reatores anaeróbios da condição (2) com 1184,0 mg sacarose/L

Tempo (h)	ABS (600 nm)	SSV (g/L)	Sacarose (mg/l)
0	0,035	0,084	1184,0
2	0,039	0,095	-
4	0,035	0,084	1188,2
6	0,040	0,098	-
8	0,055	0,138	1065,2
10	0,077	0,197	-
12	0,085	0,217	849,7
14	0,087	0,224	-
16	0,100	0,258	678,5
18	0,117	0,304	-
20	0,115	0,304	567,6
23	0,112	0,289	-
25	0,113	0,289	535,1
28	0,115	0,297	-
30	0,091	0,232	502,5
34	-	-	404,5
40	-	-	197,4

(-) análise não realizada

Tabela VI.4 Variação temporal da porcentagem e pressão parcial de gás H₂ nos reatores anaeróbios da condição (2) com 1184,0 mg sacarose/L

Tempo	H₂	PH₂
(h)	% (v/v)	(atm)
0	0	0
2	0	0
4	0	0
6	0	0
8	0,6	0,001
10	2,4	0,005
12	5,3	0,011
14	9,0	0,015
16	12,2	0,021
18	26,7	0,027
20	-	-
23	22,0	0,036
25	26,1	0,055
28	27,8	0,080
30	30,0	0,074
32	31,8	0,085
34	30,9	0,083
40	29,7	0,080-
48	43,8	0,116
72	33,7	0,090
96	33,6	0,103

(-) análise não realizada

Tabela VI.5 Variação temporal do crescimento celular e consumo de sacarose dos reatores anaeróbios da condição (3) com 1816,0 mg sacarose/L

Tempo (h)	ABS (600nm)	SSV (g/L)	Sacarose (mg/L)
0	0,03	0,07	1816,0
24	0,08	0,20	1737,5
33	0,08	0,20	-
48	0,09	0,22	1659,5
54	0,09	0,24	-
60	0,11	0,27	-
72	0,13	0,34	1359,9
79	0,16	0,42	-
83	0,19	0,49	-
96	0,17	0,45	444,7
106	0,14	0,37	282,3
120	0,11	0,28	233,6
140	-	-	-
168	-	-	200,9
202	-	-	304,9

(-) análise não realizada

Tabela VI.6 Variação temporal da porcentagem e pressão parcial de gás H₂ nos reatores anaeróbios da condição (3) com 1816,0 mg sacarose/L

Tempo	H₂	PH₂
(h)	% (v/v)	(atm)
0	0	0
24	2,7	0,003
30	4,8	0,006
48	7,4	0,010
72	17,6	0,041
77	30,0	0,111
92	37,8	0,147
106	33,6	0,241
110	50,3	0,236
114	51,9	0,488
120	54,6	0,449
133	55,8	0,393
140	56,3	0,365
168	44,9	0,332
202	45,2	0,199

(-) análise não realizada

Tabela VI.7 Variação temporal do crescimento celular e consumo de sacarose dos reatores anaeróbios da condição (4) com 4128,0 mg sacarose/L

Tempo (h)	ABS (600 nm)	SSV (g/L)	Sacarose (mg/L)
0	0,04	0,09	4128,0
3,5	0,05	0,11	-
6,0	0,05	0,11	-
17,5	0,08	0,21	3682,5
21,5	0,08	0,21	-
25	0,08	0,21	-
29,5	0,08	0,21	3712,5
41,5	0,09	0,24	3558,4
65,5	0,09	0,24	3566,9
74	0,10	0,26	-
89,5	0,10	0,26	3322,6
97,5	-	-	3268,5
113,5	-	-	3027,6
153,5	0,10	0,26	2265,8
177,5	0,09	0,24	-
185,5	0,12	0,32	1388,6
201,5	0,13	0,34	-
209	0,12	0,32	-
219,5	0,11	0,30	1287,0
222	0,10	0,28	1219,3

(-) análise não realizada

Tabela VI.8 Variação temporal da porcentagem e pressão parcial de gás H₂ nos reatores anaeróbios da condição (4) com 4128,0 mg sacarose/L

Tempo	%H₂	PH₂
(h)	(v/v)	(atm)
0	0	0
17,5	0,7	0,001
21,5	1,4	0,002
25,0	1,5	0,004
29,5	1,6	0,004
41,5	1,7	0,004
46,0	1,8	0,004
65,5	0,9	0,002
74,0	0,6	0,001
89,5	0,2	0,000
98,0	-	-
114,0	-	-
153,5	1,1	0,002
162,0	1,3	0,003
185,5	4,4	0,010
201,5	8,6	0,025
209,0	18,0	0,049
219,5	19,2	0,062
222	19,9	0,056

(-) análise não realizada

Tabela VI.9 Medidas de Absorbância, SSV, Xilose e %H₂ (v/v) no headspace dos reatores anaeróbios da condição (5) com 630,0 mg xilose/L

Tempo (h)	ABS₆₀₀ (nm)	SSV (g/L)	Xilose (mg/L)	%H₂ área (v/v)
0	0,02	0,03	630,0	0
9	0,03	0,04	-	0
14	0,04	0,05	535,0	0
18	0,05	0,05	-	1,5
24	0,07	0,07	410,0	4,2
28	0,07	0,07	-	6,0
33	0,09	0,08	342,0	7,1
40	0,10	0,09	215,0	9,1
49	0,11	0,09	-	10,9
55	0,12	0,10	39,0	11,4
61	0,11	0,10	-	11,7
76	0,12	0,10	16,0	5,9
97	0,09	0,08	15,0	1,0
127	0,08	0,07	12,0	0,9

(-) análise não realizada

Tabela VI.10 Medidas de Absorbância, SSV, Xilose e %H₂ (v/v) no headspace dos reatores anaeróbios da condição (5) com 1341,0 mg xilose/L

Tempo (h)	ABS₆₀₀ (nm)	SSV (g/L)	Xilose (mg/L)	%H₂ área (v/v)
0	0,02	0,03	1341,0	0
4	0,01	0,02	-	0
9	0,03	0,04	-	0
14	0,05	0,05	1297,0	0
18	0,06	0,06	-	2,8
24	0,07	0,07	1059,0	5,7
28	0,08	0,08	-	7,8
33	0,09	0,08	867,0	8,7
40	0,11	0,10	789,0	10,6
49	0,11	0,10	-	12,4
55	0,11	0,10	606,6	13,9
61	0,12	0,10	-	15,2
76	0,11	0,10	437,1	14,3
97	0,09	0,10	347,9	14,2
127	0,11	0,10	206,6	18,1
151	0,08	0,08	26,3	25,4
175	0,07	0,07	36,1	25,8

(-) análise não realizada

Tabela VI.11 Medidas de Absorbância, SSV, Xilose e %H₂ (v/v) no headspace dos reatores anaeróbios da condição (7) com 1848,0 mg xilose/L

Tempo (h)	ABS₆₀₀ (nm)	SSV (g/L)	Xilose (mg/L)	%H₂ área (v/v)
0	0,04	0,05	1848,0	0
18	0,08	0,07	1804,9	0
23	0,09	0,08	-	0
42	0,12	0,11	1658,8	0
47	0,13	0,11	-	0,1
66	0,14	0,12	1619,7	0,2
72	0,14	0,12	-	0,3
90	0,14	0,12	1556,8	0,8
97	0,14	0,12	-	0,9
114	0,14	0,12	-	1,5
120	0,14	0,12		1,9
138	0,20	0,16	944,2	13,8
144	0,20	0,17	733,5	18,1
148	0,23	0,19	596,8	24,2
162	0,14	0,12	324,7	30,9
169	0,13	0,11	-	32,0
171	-	-	-	32,1
186	0,08	0,07	48,9	40,2
191	0,06	0,06	52,7	37,0
194	-	-	-	40,3
197	-	-	-	40,1
213	-	-	-	40,0

(-) análise não realizada

Tabela VI.12 Medidas de Absorbância, SSV, Xilose, e %H₂ (v/v) no headspace dos reatores anaeróbios da condição (8) com 3588,0 mg xilose/L

Tempo (h)	ABS₆₀₀ (nm)	SSV (g/L)	Xilose (mg/L)	%H₂ área (v/v)
0	0,03	0,04	3588,0	0
7	0,04	0,04	-	0
23	0,13	0,11	3212,0	0
27	0,15	0,12	3219,0	0
31	0,15	0,13	3220,0	5,5
36	0,15	0,12	3236,0	5,7
45	0,15	0,13	3221,0	5,0
53	0,14	0,12	3218,0	5,0
69	0,17	0,14	2867,0	4,7
77	0,16	0,13	-	4,9
93	0,16	0,13	2814,0	5,3
109	0,15	0,13	2775,0	5,4
125	0,15	0,13	2771,0	5,8
143	-	-	2813,0	-
148	-	-	2719,0	-
173	0,13	0,11	1762,0	7,0
202	0,19	0,16	1327,0	9,8
226	0,25	0,20	473,0	16,9
245	0,26	0,20	103,0	27,2
253	0,26	0,20	-	28,6
269	0,24	0,20	92,0	38,3
293	0,18	0,15	91,0	44,2
317	0,15	0,13	-	44,4
331	0,16	0,13	-	44,3

(-) análise não realizada