Universidade de São Paulo

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto

Departamento de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

“Produção de hidrogênio por fermentação por um novo isolado de *Clostridium beijerinckii*”.

Bruna Constante Fonseca

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: **Química.**

RIBEIRÃO PRETO - SP
2016

Universidade de São Paulo

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

“Produção de hidrogênio por fermentação por um novo isolado de *Clostridium beijerinckii*”.

Bruna Constante Fonseca

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Química.
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Valéria Reginatto Spiller

RIBEIRÃO PRETO – SP

2016

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 à fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Fonseca, Bruna Constante

“Produção de hidrogênio por fermentação por um novo isolado de *Clostridium beijerinckii*” – Ribeirão Preto, SP, 2016.
109 p.: 30 cm

Versão Corrigida

Dissertação de mestrado, apresentada a Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/ USP – Área de Concentração: Química.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Valéria Reginatto Spiller

1. *Clostridium beijerinckii* Br21. 2. Lodo de tratamento de vinhaça. 3. Galactose. 4. Glicose. 5. Produção de H₂.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Fonseca, Bruna Constante

Título: Produção de hidrogênio por fermentação por um novo isolado de *Clostridium beijerinckii*.

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Química

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Valéria Reginatto Spiller

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

*Àqueles que me apoiam incondicionalmente,
principalmente nas minhas incertezas, por
todo carinho e paciência, meu pai e minha
mãe.*

*Àquele que pelo amor e amizade, tem sempre
uma palavra de companheirismo e incentivo,
meu irmão.*

*Sem vocês nenhuma conquista teria sentido.
Amo vocês.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por permitir a realização desse trabalho, por sempre me apontar o caminho correto e por me conceder a força que foi necessária para suportar a saudade de casa e da minha família e acima de tudo a fé para continuar quando tudo parecia estar difícil demais.

Agradeço ao meu pai Paulo e minha mãe Joana, a quem devo meu caráter e minha disciplina na vida e no trabalho, agradeço por sempre me darem o melhor, toda a compreensão e todo o carinho que pode existir e principalmente por acreditarem sempre em mim. Aguentando sempre a minha ausência e o meu mau humor.

Agradeço ao meu irmão Paulo pelo apoio sempre sincero, por ser um exemplo e orgulho para mim, espero que muito de mim se pareça com você. Agradeço também por me dar uma irmã, que é a Alessandra, que também me apoia e torce por mim sempre. E agradeço principalmente por tornarem todos os momentos uma brincadeira, alegrando meus dias.

Agradeço ao meu namorado Rodrigo, por todo amor, atenção e paciência, por fazer parte da minha vida, sendo meu companheiro e tornando os meus dias nesta cidade mais fáceis, ajudando a passar pelos momentos de cansaço e desânimo. Obrigada pelas risadas infinitas, e por sempre acreditar em mim.

Agradeço a minha orientadora, Valéria Reginatto Spiller, principalmente pela oportunidade de realizar este trabalho ao lado de alguém que transpira sabedoria, meu respeito e admiração pela sua serenidade, pela sua capacidade em entender as minhas dificuldades, pelo seu Dom de ensinar com paciência, e principalmente, por toda confiança que sempre depositou em mim.

Agradeço a duas Estrelas que me acompanham e me guiam sempre ao sucesso, vó Egydia, que acompanhou bem de perto todo meu esforço e sei que está feliz por ver esta etapa terminada, e vó Margarida, que desempenhando o papel mais importante na minha infância me tornou a pessoa que sou hoje. Sei que confiam na minha capacidade e agora estão orgulhosas de mim.

Agradeço a minha irmã Akemi, por sua constante presença em todos os meus dias, mesmo que tudo parecesse triste, é quem transforma em cor de rosa. Por trazer alegria a Ribeirão, por ser minha estagiária, minha hóspede, minha melhor amiga. Obrigada por todas as palavras de incentivo, e por aguentar todos os momentos que te deixei falando sozinha para cuidar das minhas bactérias. Acredite que amo mais você do que elas.

Agradeço a todos os meus amigos que mesmo não estando tão perto, nunca mediram esforços para me apoiarem, seja com palavras, com pensamentos, com orações e com torcidas. E principalmente por aguentarem toda a minha ausência. Camila, Carina, Thays, Gabby, Cláudia, Caroline, Vanessa, Tati, Bebel, Fer, Jú, Heitor, Zé, Alexandre, Felipinho e Nayara, obrigada por nunca desistirem de mim. E também aos meus queridos alunos que sempre acreditaram em mim.

Em especial, gostaria de agradecer a todos os meus amigos do laboratório, Mércia, Larissa, Thamiris, Denisse, Roberta, Janaína, Vinícius, Douglas, Giovanni, Lucas, Thalita, Emelin e Rafaela, que sempre me apoiaram, agradeço por todas as horas de trabalho juntos, por todas as brincadeiras, risadas, por todos os passeios, pelo carinho e amizade. Em especial, agradeço a Bianca, que além de companheira de laboratório, é uma grande amiga, e a pessoa mais dedicada e inspiradora que me deparei nessa fase, me espelho em você e agradeço por sempre estar presente oferecendo toda bondade e toda ajuda que é capaz. E também aos amigos que já concluíram seus trabalhos no laboratório, Fran e Marcos, foi muito bom conviver com vocês e obrigada por oferecerem toda a ajuda que precisei.

Um agradecimento especial a Maria Eugênia Guazzaroni, por ter me recebido tão bem e me auxiliado no trabalho, com toda sua experiência e palavras de incentivo, sua participação foi fundamental para a realização deste projeto.

Agradeço ao programa de pós-graduação do Departamento de Química – FFCLRP – USP, pela estrutura oferecida para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço aos demais professores, técnicos, alunos e profissionais que sempre estiveram dispostos a me ajudar, emprestando o espaço e os equipamentos de seus laboratórios, doando reagentes, tirando minhas dúvidas e dando conselhos.

Agradeço, por fim, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida durante o mestrado.

“ Não há céu sem tempestades, nem caminhos sem acidentes. Só é digno do pódio quem usa as derrotas para alcançá-lo. Só é digno da sabedoria quem usa as lágrimas para irrigá-la. Os frágeis usam a força; os fortes a inteligência. Seja um sonhador, mas una seus sonhos com disciplina, pois sonhos sem disciplina produzem pessoas frustradas. Seja um debatedor de ideias. Lute pelo que você ama. ”

Augusto Cury

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE TABELAS	xiii
LISTA DE ABREVIACÕES	xiv
RESUMO	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUÇÃO	4
2. OBJETIVOS	7
2.1. Objetivos Específicos.....	7
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
3.1 O Hidrogênio.....	8
3.2 Formas de Obtenção do Hidrogênio.....	9
3.3 Processos Biológicos de Obtenção de Hidrogênio.....	11
3.4 Produção de H ₂ por fermentação.....	14
3.4.1 Produção de H ₂ por culturas mistas.....	14
3.4.2 Produção de H ₂ por culturas puras.....	17
3.5 Substratos utilizados na produção de H ₂ por fermentação escura.....	21
4. MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1 Inóculo.....	27
4.2 Pré-tratamentos realizados no lodo para o enriquecimento em bactérias produtoras de H ₂	29
4.3 Isolamento de culturas produtoras de H ₂	31
4.4 Identificação da cultura isolada e análises filogenéticas.....	33
4.4.1 Extração do DNA genômico da cultura isolada.....	33
4.4.2 Amplificação do gene RNAr 16S.....	33
4.4.3 Purificação dos produtos da PCR.....	34
4.4.4 Clonagem do produto da PCR em vetor pJET1.2/blunt.....	35
4.4.5 Transformação de <i>E. coli</i>	36
4.4.6 Extração plasmidial.....	37
4.4.7 Sequenciamento.....	37
4.5 Métodos de quantificação da bactéria isolada.....	38
4.6 Ensaios de fermentação em batelada para a produção de H ₂	40
4.6.1 Ensaios preliminares utilizando diferentes fontes de carbono.....	40

4.6.2 Ensaio de fermentação com diferentes pH iniciais e temperaturas	41
4.6.3 Ensaio cinético de fermentação utilizando diferentes concentrações de glicose e de galactose	42
4.6.4 Cálculo do Rendimento e Eficiência dos Ensaio de Fermentação	43
4.7 Modelagem dos resultados dos ensaios cinéticos de fermentação para a produção de H₂	44
4.8 Determinações analíticas	45
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	47
5.1 Isolamento e Identificação da Cultura Isolada e Análises Filogenéticas	47
5.2 Quantificação da bactéria isolada	50
5.3 Utilização de diferentes substratos pela cultura isolada	51
5.4 Efeito da temperatura na produção de hidrogênio pela cepa isolada	56
5.5 Efeito do pH na produção de hidrogênio	58
5.6 Efeito da concentração de glicose e de galactose na produção de hidrogênio pela cultura isolada.	62
5.6.1 Ensaio cinético de fermentação em batelada utilizando diferentes concentrações de glicose	63
5.6.2 Ensaio de fermentação com diferentes concentrações de galactose	69
6. CONCLUSÃO	77
7. REFERÊNCIAS	78

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Etapas do processo de degradação anaeróbio por culturas mistas partindo de matéria orgânica (SA et al., 2014 modificado).....	16
Figura 2 - Via metabólica para a conversão de glicose em H ₂ , CO ₂ , ácidos orgânicos e solventes por microrganismos do gênero <i>Clostridium</i> sp. (adaptado de SINHA e PANDEY, 2011). NFOR: NADH- ferredoxina oxidoredutase, PFOR: piruvato ferredoxina oxidoredutas, Fd: ferredoxina.....	20
Figura 3 - Estrutura básica de carragenanas (adaptado de Piculell 1995).	22
Figura 4 - Esquema das principais etapas realizadas para o isolamento de uma cultura produtora de H ₂ partindo do lodo após os pré-tratamentos.	32
Figura 5 - Mapa esquemático do vetor pJET 1.2/blunt mostrando a origem de replicação e o sítio múltiplo de clonagem.	36
Figura 6 - Fontes de carbono utilizadas nos ensaios preliminares de produção de H ₂ pela cultura isolada.....	41
Figura 7 - Esquema das principais etapas realizadas nos ensaios de diferentes pHs iniciais e diferentes temperaturas de incubação da cultura isolada produtora de H ₂	42
Figura 8 - Imagem obtida por microscópio com aumento de 400X indicando resultado positivo ao teste de Gram e morfologia de bastonete da bactéria isolada.....	48
Figura 9 - Árvore filogenética mostrando a relação entre a cepa isolada de <i>Clostridium beijerinckii</i> Br21 e as espécies relacionadas baseada nas sequências dos genes de RNAr 16S.	49
Figura 10 - Correlação entre concentração de massa celular seca e a densidade ótica (D.O.) a 600 nm com a respectiva equação da reta.	50
Figura 11 - Correlação entre o número de células.10 ⁶ /mL e a densidade ótica (D.O.) a 600 nm com a respectiva equação da reta.....	51
Figura 12 - Concentração de glicose consumida, concentração de H ₂ produzido, rendimento (Y), eficiência de produção de H ₂ e concentração celular em massa seca da cultura isolada, após os ensaios de fermentação em meio contendo glicose (15,0 g/L) e diferentes valores de pH iniciais.....	60
Figura 13 - Concentração de glicose consumida, concentração de ácidos orgânicos formados e pH ao final dos ensaios de fermentação com diferentes pH iniciais.	62
Figura 14 - Volume de H ₂ produzido em função do tempo em ensaios de fermentação em batelada com o <i>C. beijerinckii</i> Br21 com diferentes concentrações de glicose.....	64

Figura 15 - Glicose consumida e concentração dos ácidos orgânicos e etanol ao final dos ensaios de fermentação em diferentes concentrações de glicose.....	68
Figura 16 - Volume de H ₂ produzido em função do tempo em ensaios de fermentação em batelada com o <i>C. beijerinckii</i> Br21 com diferentes concentrações de galactose.	70
Figura 17 - Concentração de galactose consumida, concentração de ácidos orgânicos e etanol ao final dos ensaios de fermentação com <i>C. beijerinckii</i> Br 21 com diferentes concentrações de galactose.....	73

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Meio de cultura para o cultivo de lodo anaeróbio (GONZALEZ-GIL et al., 2002).	28
Tabela 2 - Solução de oligoelementos para o meio de cultura para o cultivo de lodo anaeróbio (GONZALEZ-GIL et al., 2002)	29
Tabela 3 - Meio de cultura para cultivo de microrganismos produtores de hidrogênio (CHEN et al., 2004).	31
Tabela 4 - Substrato consumido (mmol), H ₂ produzido (mmol), rendimento (mmol de H ₂ /mmol de substrato consumido), concentração de H ₂ produzido (mmol/L), concentração celular final (mg/L) e pH final nos ensaios de fermentação com o <i>C. beijerinckii</i> Br21 em 2 g/L de diferentes fontes de carbono.	52
Tabela 5 - Substrato consumido (mmol), H ₂ produzido (mmol), rendimento (mmol de H ₂ /mmol de substrato consumido), concentração de H ₂ produzido (mmol/L), concentração celular final (mg/L) e pH final nos ensaios de fermentação com o <i>C. beijerinckii</i> Br21 em 10 g/L de diferentes fontes de carbono.	53
Tabela 6 - Velocidade máxima de produção de H ₂ (R _m), produção máxima de H ₂ , (H _{máx}), rendimento (Y), concentração de massa celular seca e pH final dos ensaios de fermentação em diferentes concentrações de glicose.	65
Tabela 7 - Concentração de massa celular seca, velocidade máxima de produção de H ₂ (R _m), produção máxima de H ₂ (H _{máx}), rendimento (Y) e pH final em diferentes concentrações de galactose.	71
Tabela 8 - Parâmetros cinéticos da produção de H ₂ por cepas de <i>C. beijerinckii</i> em ensaios de fermentação em batelada da literatura, com diferentes substratos.	75

LISTA DE ABREVIACÕES

%	Porcentagem.
°C	Grau Celsius.
µg	Microgramas.
µL	Microlitros.
A	Área.
ABE	Acetona, Butanol e Etanol.
ART	Açúcares Redutores Totais.
atm	Atmosfera.
ATP	Adenosina Trifosfato.
BPNS	Bactéria Fotossintetizantes Púrpuras Não Sulfurosas.
BRN	Bactérias Redutoras de Nitrato.
BRS	Bactérias Redutoras de Sulfato.
CG	Cromatógrafo a Gás.
cm ²	Centímetros quadrados.
COT	Carbono Orgânico Total.
CT	Carbono Total.
D.O.	Densidade Ótica.
DCT	Detector de Condutividade Térmica.
ddNTP	Didesoxinucleotídeo.
DMSO	Dimetilsulfóxido.
DNA	Ácido Desoxirribonucleico.
DNS	Ácido 3,5 – dinitrosalicílico.
dNTPs	Desoxirribonucleosídeo Trifosfato.
EDTA	Etileno Diamino Tetracetato.
H _{máx}	Máxima Produção de Hidrogênio.
HMF	Hidroximetilfurfural.
HPLC (CLAE)	<i>High-Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência).
HPR	<i>Hydrogen Production Rate</i> .
IDR	Índice de Refração.
K	Kelvin.

KJ	KiloJoules.
KV	Kilovolts.
LB	Luria Bertani.
M	Concentração Molar.
m	Massa.
mg	Miligrama.
mL	Mililitro.
mM (mmol/L)	Concentração Milimolar.
mmol	Milimol.
n	Número de mol.
NADH	Nicotinamida e Adenina Dinucleotídeo.
NDIR	<i>Non-Dispersive Infrared Gas Analyzer</i> .
NFOR	NADH Ferredoxina Oxidorredutase.
ng	Nanograma.
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i> .
nm	Nanômetro.
P	Pressão.
P.A.	Padrão Analítico.
pb	Pares de Base.
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação de polimerase em cadeia).
PFOR	Piruvato Ferredoxina Oxidorredutase.
R	Constante Universal dos Gases Ideais.
RAFA	Reator Anaeróbio de Fluxo Ascendente.
rDNA	Ácido Desoxiribonucleico Ribossomal.
Rm	Velocidade Máxima de Produção de Hidrogênio.
RNA	Ácido Ribonucleico.
rpm	Rotações por Minuto.
RNAr	Ácido Ribonucleico Ribossomal.
TAE	Tris, Ácido Acético e EDTA.
UV	Radiação Ultravioleta.
V	Volts.
λ	Fase Lag.

Fonseca, Bruna Constante. **Produção de hidrogênio por fermentação por um novo isolado de *Clostridium beijerinckii***. 2016. 109 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

RESUMO

O hidrogênio (H_2) tem sido considerado uma fonte de energia limpa bastante promissora, pois sua combustão origina apenas moléculas de água, sendo uma alternativa ao uso de combustíveis fósseis. Entretanto, os métodos atuais de produção de H_2 demandam matérias-primas finitas e uma grande quantidade de energia, tornando a sua obtenção não sustentável. Mais recentemente, a via fermentativa tem sido considerada para a produção de H_2 , utilizando como matérias-primas efluentes industriais, materiais lignocelulósicos e biomassa de algas, denominado de bio-hidrogênio de primeira, segunda e terceira geração, respectivamente. Neste trabalho foi isolada uma bactéria anaeróbia a partir de uma cultura mista (lodo) de um sistema de tratamento de vinhaça, após pré-tratamento do lodo a pH 3 por 12 horas. Este microrganismo foi identificado com 99% de similaridade como *Clostridium beijerinckii* com base na sequência do gene RNAr 16S denominado de *C. beijerinckii* Br21. A temperatura e o pH mais adequados para o crescimento e produção de H_2 por esta cultura foi 35 °C e pH inicial 7,0. A bactéria possui a capacidade de utilizar ampla variedade de fontes de carbono para a produção de H_2 por fermentação, especialmente, monossacarídeos resultantes da hidrólise de biomassa de algas, tais como glicose, galactose e manose. Foram realizados ensaios em batelada para a produção de H_2 com a bactéria isolada empregando diferentes concentrações de glicose e galactose, visando a sua futura utilização em hidrolisados de alga. Os parâmetros cinéticos dos ensaios de fermentação estimados pelo modelo de *Gompertz* modificado, como a velocidade máxima de produção (R_m), a quantidade máxima de hidrogênio produzido

($H_{m\acute{a}x}$) e o tempo necessário para o início da produção de hidrogênio (fase lag) para a glicose (15 g/L) foram de: 58,27 mL de H_2 /h, 57,68 mmol de H_2 e 8,29 h, respectivamente. Para a galactose (15 g/L), a R_m , $H_{m\acute{a}x}$ e λ foram de 67,64 mL de H_2 /h, 47,61 mmol de H_2 e 17,22 horas, respectivamente. O principal metabólito detectado ao final dos ensaios de fermentação, foi o ácido butírico, seguido pelo ácido acético e o etanol, tanto para os ensaios com glicose, como com galactose. *C. beijerinckii* é um candidato bastante promissor para a produção de H_2 por fermentação a partir de glicose e galactose e, conseqüentemente, a partir de biomassa de algas como substratos.

Palavras chaves: Isolamento, *Clostridium beijerinckii*, galactose, glicose, produção de H_2 .

ABSTRACT

Hydrogen (H_2), considered an alternative to fossil fuels, is a promising source of clean energy because its combustion originates water molecules only. However, the current H_2 production methods require finite raw materials and a large amount of energy, which makes them unsustainable. The fermentative pathway has been considered for H_2 production from renewable raw materials such as industrial wastewater, lignocellulosic materials, and algal biomass, the so-called first, second, and third bio-hydrogen generation, respectively. In this work, after pre-treatment at pH 3 for 12 h, a H_2 -producing bacterium was isolated from a mixed culture (sludge) collected from an anaerobic bioreactor used to treat sugarcane vinasse. The microorganism was identified as *Clostridium beijerinckii* based on the sequence of the 16S rRNA gene; it was named *C. beijerinckii* Br21. The most appropriate temperature and initial pH to achieve H_2 production by this strain was 35 °C and 7, respectively. The bacterium was able to use a wide variety of carbon sources, especially the monosaccharides glucose, galactose, and mannose resulting from hydrolysis of algal biomass. Batch assays using different concentrations of glucose and galactose were performed to produce H_2 . The kinetic parameters of the tests were estimated by the *Gompertz* modified model. The maximum production rate (R_m), the maximum amount of produced H_2 ($H_{m\acute{a}x}$), and the phase lag (λ) for glucose and galactose, both at 15 g/L, were 58.27 and 67.64 mL of H_2 /h, 57.68 and 47.61 mmol of H_2 , and 8.29 and 17.22 h, respectively. The main metabolite detected at the end of fermentation tests was butyric acid, followed by acetic acid and ethanol. The results indicated that the new *C. beijerinckii* isolate is a promising candidate for fermentative H_2 production from algal biomass.

Keywords: Isolation, *Clostridium beijerinckii*, glucose, galactose, bio-hydrogen.

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de tecnologias para obtenção de energia mais limpa e renovável é uma questão de interesse global. O hidrogênio é um combustível limpo, pois além de poder ser produzido a partir de matérias-primas renováveis, a sua combustão origina apenas moléculas de água e uma quantidade significativa de energia. (CHEN *et al.*, 2006; WANG e WAN, 2009). Portanto, a produção e utilização do hidrogênio (H₂) tem recebido grande atenção devido a sua importância como uma alternativa ao uso de combustíveis fósseis.

Existem diferentes métodos de obtenção de hidrogênio. O H₂ pode ser obtido por processos eletroquímicos partindo da água, por processos químicos partindo do petróleo ou do carvão e por processos biológicos, principalmente a partir de carboidratos. As duas primeiras maneiras, tais como a eletrólise da água e o processamento de petróleo ou carvão, demandam grande consumo de energia, sendo que as duas últimas utilizam matérias primas não renováveis, o que os torna não sustentáveis (ALDERUCCI, 1993; BAIND *et al.*, 2002). Já os processos biológicos tem sido considerados como uma alternativa sustentável para a produção de H₂, pois podem utilizar matérias primas renováveis, tais como águas residuais ou materiais ricos em carboidratos como substratos. Os processos biológicos, na maioria das vezes são operados a temperatura e pressão ambientes, demandando menos energia do que os processos tradicionais (LI e FANG, 2007; LI *et al.*, 2012).

Os processos para a obtenção biológica de H₂ têm sido divididos em dois grupos: os dependentes de luz como fonte de energia, tais como a biofotólise, realizado por algas e cianobactérias a partir da água, e a foto-decomposição, sendo este realizado por bactérias fotossintetizantes partindo de ácidos orgânicos. Os processos que não dependem

de luz ocorrem pela fermentação de compostos orgânicos, também chamada de fermentação escura, que é realizada por microrganismos anaeróbios estritos ou facultativos (FAN *et al.*, 2006, ZHANG *et al.*, 2006). A fermentação escura é, dentre os processos citados, reconhecidamente o mais favorável por apresentar as velocidades mais elevadas de produção de H_2 e a possível utilização de substratos de baixo custo como alguns materiais ricos em carboidratos (HAWKES *et al.*, 2007; HALLENBECK, 2009; VAZQUEZ e VARALDO, 2009; ELSHARNOUBY *et al.*, 2013).

Recentemente, pesquisadores têm voltado as suas atenções para o uso da biomassa de algas como matéria prima para a produção de biocombustíveis de terceira geração, incluindo o biohidrogênio (WANG e WAN, 2009; REN *et al.*, 2009). As algas possuem altas concentrações de polissacarídeos, têm a capacidade de sequestrar grandes quantidades de CO_2 e crescer em elevadas velocidades, em comparação com outros tipos de biomassas. São organismos aquáticos e, portanto, não competem em espaço com a produção de alimentos. Além disso, estes organismos não contêm lignina, o que facilita a sua hidrólise para a disponibilização de açúcares fermentáveis (ANDERSON *et al.*, 2014).

Dentre as algas, as vermelhas contêm, principalmente, monômeros de D-galactose em sua estrutura como a sua unidade base e também contêm outros monômeros como a glicose e a manose, o que as torna bastante atrativas para a sua utilização em processos de fermentação (PARK *et al.*, 2011). Portanto, para uma produção eficiente de H_2 a partir de biomassa de algas, microrganismos produtores de H_2 devem ser capazes de converter a galactose e a glicose, principalmente, com alto rendimento de H_2 .

Neste trabalho foi realizado o isolamento, a identificação e a caracterização de uma bactéria produtora de H_2 , a partir de uma cultura mista de um sistema de tratamento de vinhaça. A capacidade da bactéria isolada produzir H_2 por fermentação utilizando

diferentes concentrações de galactose e de glicose foi estudada com mais detalhes, uma vez que esta dissertação faz parte de um projeto de pesquisa que visa estudar a biomassa de algas como substrato (FAPESP 06074-1: Produção de biohidrogênio de terceira geração a partir de biomassa de alga e seus derivados de hidrólise).

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi isolar um microrganismo produtor de hidrogênio e caracterizar o seu crescimento e produção de H_2 em diferentes temperaturas e pH iniciais, assim como em diferentes fontes de carbono, especialmente glicose e galactose.

2.1. Objetivos Específicos

- Isolar microrganismos produtores de hidrogênio.
- Selecionar o(s) microrganismos isolados produtores de H_2 em ensaios preliminares de fermentação.
- Identificar um microrganismo isolado, cujo resultado da produção de hidrogênio tenha sido positivo.
- Testar a utilização de diferentes fontes de carbono pelo microrganismo isolado para a produção de H_2 em ensaios de fermentação preliminares.
- Avaliar o pH e temperatura mais apropriados para o crescimento e geração de H_2 pelo microrganismo isolado.
- Avaliar a cinética de produção de H_2 pelo microrganismo isolado utilizando glicose e galactose como fontes de carbono em ensaios de fermentação em batelada.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 O Hidrogênio

O hidrogênio é o elemento químico mais leve, sendo que o seu núcleo é constituído unicamente por um próton e sua molécula (H₂) é constituída de dois átomos ligados covalentemente entre si. A temperatura e pressão de 25 °C e 1 atm, o hidrogênio apresenta-se como um gás extremamente inflamável, inodoro, insípido, incolor e insolúvel em água. Para se apresentar no estado líquido, tem que estar armazenado numa temperatura de -253 °C, em sistemas de armazenamento conhecidos como sistemas criogênicos. Acima desta temperatura, o hidrogênio pode ser armazenado em forma de gás comprimido em cilindros de alta pressão (ESTEVÃO, 2008).

O H₂ apresenta uma elevada densidade energética, cerca de 142 kJ/g, sendo o combustível de mais alta energia por unidade de peso comparativamente com qualquer combustível. Já outros combustíveis como o metano, o propano e a gasolina apresentam densidade energética de 55,53 kJ/g, 50,36 kJ/g e 47,5 kJ/g, respectivamente, sendo aproximadamente três vezes menor do que o valor do H₂ (DOS SANTOS, 2003).

Atualmente, o H₂ é universalmente aceito como uma fonte de energia limpa e renovável quando produzido por meio de matérias-primas renováveis, ou seja, uma alternativa ideal para os combustíveis fósseis. O hidrogênio não contribui para o efeito estufa por ser livre de carbono, dessa forma a sua combustão direta e completa produz apenas moléculas de água, conforme a Equação 1 (MATHEWS e WANG, 2009; DAS e VEZIROGLU, 2008):

Em relação a sua utilização, o hidrogênio pode ser usado como combustível em motor a combustão interna, ou diretamente em uma célula a combustível fornecendo energia elétrica ao reagir com o oxigênio (DAS e VEZIROGLU, 2008).

Por ser altamente reativo, o H_2 encontra-se sempre associado a outros elementos, portanto, para o hidrogênio ser obtido de forma pura, é necessário gastar energia na dissociação de uma fonte primária. As tecnologias convencionais de produção do hidrogênio necessitam de energia sob alguma forma, tais como calor, luz ou eletricidade de forma a que se inicie o processo. A escolha do melhor método de produção do hidrogênio depende da quantidade desejada e do seu grau de pureza (DOS SANTOS, 2003).

3.2 Formas de Obtenção do Hidrogênio

Os métodos de obtenção de hidrogênio normalmente se dividem em função das matérias-primas utilizadas. Utilizando os combustíveis fósseis como matéria prima, os métodos incluem a reforma a vapor do gás natural, a oxidação parcial de hidrocarbonetos pesados e a gaseificação do carvão. Quando se utiliza a água como matéria prima tem-se principalmente a eletrólise da água. A biomassa pode servir como matéria prima pela sua gaseificação, na reforma a vapor do etanol e em processos biológicos como a fotoferrmentação e a fermentação anaeróbia.

Dentre os métodos disponíveis para a obtenção do hidrogênio, a reforma do gás natural contribui com cerca de 40 % do hidrogênio produzido, seguido pela oxidação de hidrocarbonetos pesados (30 %), gaseificação do carvão (18 %) e eletrólise da água (5 %). Atualmente, a produção biológica de hidrogênio contribui com apenas 1 % do total

de hidrogênio produzido. No entanto, espera-se que esta porcentagem cresça exponencialmente com o desenvolvimento de novas técnicas e processos (SÁ *et al*, 2013).

Na reforma a vapor do gás natural, há a passagem de vapor de água juntamente com o gás natural por um catalizador, o hidrogênio é obtido quebrando as moléculas de hidrocarboneto que compõem o gás, gerando CO₂ além do H₂ (SIQUEIRA, 2015).

Na oxidação parcial de hidrocarbonetos, como por exemplo o metano, pode ser parcialmente oxidado a hidrogênio e monóxido de carbono na presença de oxigênio em quantidades limitantes. Essa oxidação parcial se processa em duas etapas. Na primeira (Equação 2), o metano é oxidado a CO₂ e H₂O, e na segunda (Equação 3 e 4), o metano residual sofre reforma com a H₂O e o CO₂ para produzir CO e H₂ conforme as seguintes equações (WANG *et al*, 2012):

Altas temperaturas entre 1300 a 1500 °C e pressões entre 30 e 100 bar são vantajosas para uma alta conversão nesses produtos (WANG *et al*, 2012).

Na gaseificação do carvão, a reação típica deste processo é a qual o carbono é convertido em monóxido de carbono e hidrogênio pela equação:

Apesar de ser um método de baixo custo e com matéria prima disponível, como desvantagem há a retirada do carvão do solo e também os resíduos lançados na atmosfera, tornando-o ambientalmente pouco viável (RIBEIRO, 2011).

A produção de hidrogênio a partir da água ocorre principalmente por meio da eletrólise da água. Neste método, a passagem de corrente elétrica permite romper a molécula de água em átomos de hidrogênio e oxigênio, com isto, são criadas partículas carregadas (cátions e ânions). O hidrogênio se concentra no cátodo e o oxigênio, no ânodo. A tensão necessária varia com a pressão e a temperatura de operação, como por exemplo, uma voltagem de 1,24 V é necessária para separar os átomos de oxigênio e de hidrogênio em água pura a uma temperatura de 25 °C e uma pressão de 1,03 kg/cm². A desvantagem desse tipo de processo é o alto custo além de que o consumo energético é maior do que a quantidade de energia que o hidrogênio produzido é capaz de fornecer. (DE SOUZA, 2004; DRAPCHO *et al.*, 2008).

3.3 Processos Biológicos de Obtenção de Hidrogênio

Apesar dos métodos biológicos representarem apenas 1 % da obtenção atual de H₂, nas vias biológicas, não há utilização de combustíveis fósseis diretamente, nem indiretamente. Portanto, existe um interesse no desenvolvimento de novas tecnologias para que a produção biológica de hidrogênio contribua com maior porcentagem na produção total deste combustível (DRAPCHO *et al.*, 2008).

Quando obtido por vias biológicas o H₂ é normalmente denominado de biohidrogênio. Os processos biológicos se dividem em biofotólise da água, fotofermentação e fermentação escura.

A biofotólise da água é um processo biológico que converte energia solar em energia química armazenada, útil para a célula, este processo ocorre sobre a ação da luz resultando na decomposição da água produzindo hidrogênio. Esse método divide-se em dois, a biofotólise indireta e a direta.

A biofotólise indireta é o processo que ocorre em dois estágios separados, mas que são acoplados pela fixação do CO₂. As cianobactérias são os organismos mais estudados na biofotólise indireta. Estas utilizam a energia armazenada nos carboidratos oriundos da fotossíntese para gerar hidrogênio a partir da água, ou seja, são capazes de formar hidrogênio e oxigênio a partir da energia solar e da água. (ESTEVÃO, 2008; KIM *et al.*, 2010). Como desvantagens da biofotólise indireta pode-se mencionar que a nitrogenase é muito sensível ao oxigênio e também exige uma elevada quantidade de ATP, o que diminui a sua eficácia na conversão da energia solar. Uma desvantagem tecnológica é que pode ocorrer a não homogeneidade da distribuição da luz nos fotorreatores, o que contribui para a redução da eficiência total da conversão da luz (ESTEVÃO, 2008; KIM *et al.*, 2010).

Na biofotólise direta para a produção de hidrogênio, utiliza-se microalgas fotossintetizantes, as algas verdes, para converter energia solar em energia química. Esta produção de H₂ é possível devido à presença da enzima hidrogenase nos microrganismos. A absorção de luz solar gera elétrons que são transferidos para uma molécula de ferredoxina, reduzindo-a e a enzima hidrogenase recebe esses elétrons para combiná-los com os prótons (H⁺) e assim formar H₂ (KIM *et al.*, 2010; RAN *et al.*, 2009). Porém, neste caso, a produção de hidrogênio é um processo transitório devido à alta sensibilidade da enzima hidrogenase ao oxigênio, subproduto da fotossíntese das algas verdes (KIM *et al.*, 2010).

Ambos os métodos de biofotólise podem ser considerados economicamente viáveis e sustentáveis em termos de consumo de CO₂, mas como desvantagem, há a inibição da enzima hidrogenase e nitrogenase em presença de O₂, a dependência de iluminação constante, a alta demanda de ATP e o fato de não ser possível metabolizar resíduos industriais, não contribuindo com a diminuição da matéria orgânica (SÁ *et al.*, 2014; BAIND, 2004).

Um outro processo biológico é a fotodecomposição, que se trata da produção de hidrogênio na presença constante de iluminação, através de bactérias fotossintetizantes púrpuras não sulfurosas (BPNS), que têm capacidade de converter completamente a glicose a gás carbônico e hidrogênio. A vantagem desse método é a capacidade de obter altos rendimentos de conversão teórica e capacidade de usar compostos orgânicos derivados de resíduos como substrato, porém a necessidade de iluminação é uma desvantagem nesse processo (DAS e VEZIROGLU, 2008). A reação global da produção de hidrogênio a partir do processo de fotodecomposição pode ser observada abaixo:

Por fim, a fermentação escura é o processo que converte substratos ricos em carboidratos em gás hidrogênio e CO₂ por meio de microrganismos anaeróbios estritos ou facultativos, em ausência de luz (AMORIM, 2007). O grande interesse nesse processo para a indústria, é devido a produção contínua sem a dependência de luz, a alta velocidade de reação, a facilidade das bactérias fermentativas em se reproduzirem, a tecnologia simples, de baixo custo e ambientalmente adequada comparada aos demais métodos. Além dos fatores citados existe a fermentação que possibilita a utilização de águas residuárias, resíduos e matérias ricas em carboidratos para a produção de hidrogênio (NICODEMOS *et al.*, 2008; MIZUNO, 2000).

Por ser este processo o objeto de estudo deste trabalho, ele será tratado com mais detalhes no item seguinte.

3.4 Produção de H₂ por fermentação

Os processos fermentativos para a produção de hidrogênio podem utilizar culturas mistas ou puras de microrganismo.

3.4.1 Produção de H₂ por culturas mistas

A utilização de culturas mistas é favorecida por não necessitar de meios de cultura estéreis, o que diminui o custo total da produção. Principalmente por esse motivo, a maioria dos estudos para a produção de biohidrogênio utilizam culturas mistas (HAFEZ *et al.*, 2010; CHEN *et al.*, 2012; KAN, 2013; NASR *et al.*, 2011; O-THONGA *et al.*, 2011; SEM e SUTTAR, 2012; PHOWANA e DANVIRUTAI, 2014; SHANMUGAMA *et al.*, 2014). Os lodos de sistemas anaeróbios de tratamento de águas residuais, (PARK *et al.*, 2011; DONGA *et al.*, 2009), dejetos de animais (NA *et al.*, 2014; SARIPANA e REUNGSANG, 2014), chorume (RATTI *et al.*, 2013; ZHU *et al.*, 2015), solos (CHAGANTIA *et al.*, 2012; SARAPHIROMA e REUNGSANG, 2011) e resíduos alimentícios (KIM *et al.*, 2008) são as fontes de culturas mistas ou consórcios microbianos mais utilizados para a produção de hidrogênio pelo processo de fermentação.

Os principais microrganismos produtores de H₂ descritos na literatura, que geralmente encontram-se presentes nas culturas mistas citadas, são dos gêneros *Enterobacter*, *Clostridium*, e *Escherichia* (ELSHARNOUBY, 2013). No entanto, muitos microrganismos presentes nestas culturas mistas são consumidores de H₂, como as

árqueas metanogênicas, as bactérias homoacetogênicas e as bactérias redutoras de nitrato e sulfato (SEM e SUTTAR, 2012). Isto torna necessário a submissão dessas culturas mistas a pré-tratamentos como forma de eliminar os microrganismos consumidores de H_2 enriquecendo-as em microrganismos produtores de H_2 .

Os métodos de enriquecimento de culturas mistas em bactérias produtoras de H_2 mais comumente descritos na literatura consistem em submeter as culturas mistas ao calor excessivo como por exemplo a temperatura de $80^{\circ}C$, à adição de compostos químicos como ácidos e bases alterando assim o pH e à radiação (SINGH e WAHID, 2015). Todos estes tratamentos são realizados pressupondo, principalmente, a esporulação das bactérias do gênero *Clostridium* sp., sendo este o mais frequente gênero relacionado à produção de H_2 . Tais pré-tratamentos eliminariam ou prejudicariam os gêneros não produtores de H_2 , tendo em vista que estes são menos resistentes a alterações drásticas em seu meio (LAMAISON *et al.*, 2014).

Culturas mistas que realizam a degradação anaeróbia de materiais orgânicos possuem muitas etapas em comum com a fermentação para a produção de hidrogênio. Na digestão anaeróbia, diferentes grupos de microrganismos realizam uma sequência de reações, tais como a hidrólise, a acidogênese, a acetogênese e a metanogênese, degradando compostos orgânicos complexos em produtos mais simples (CHERNICARO, 1997; LAKANIEMI *et al.*, 2013). Na figura 1 está representada as etapas assim como os microrganismos responsáveis por cada degradação.

Na hidrólise, a matéria orgânica é degradada em compostos menos complexos e solúveis por meio de enzimas extracelulares, esses novos compostos podem adentrar às membranas das bactérias fermentativas. Na acidogênese, os compostos solúveis gerados durante a hidrólise são consumidos e convertidos em substâncias orgânicas mais simples, tais como álcoois, lactato e os ácidos acético e butírico (LAKANIEMI *et al.*, 2013).

Figura 1 - Etapas do processo de degradação anaeróbica por culturas mistas partindo de matéria orgânica (SA et al., 2014 modificado).

Os ácidos, acético e butírico, são subprodutos da produção fermentativa de H₂. Os produtos formados na acidogênese são oxidados durante a acetogênese resultando em ácido acético e H₂ que são, normalmente utilizados pelas arqueias metanogênicas durante a etapa de metanogênese. Bactérias homoacetogênicas consomem o H₂ e na presença de CO₂ produzem acetato. As metanogênicas hidrogenotróficas são responsáveis por consumir também o H₂, reduzindo o CO₂ e formando assim o metano. Já as metanogênicas acetoclásticas são responsáveis por converter o acetato em metano e CO₂ (SA et al., 2014).

De todas as formas, na metanogênese há o consumo do H₂ produzido durante as etapas anteriores, por esse motivo, é importante a eliminação desses microrganismos consumidores quando o interesse é a produção de H₂. O hidrogênio também pode ser

consumido pelas bactérias redutoras de nitrato (BRN) para a formação de amônia na presença de nitrato no meio e pelas bactérias redutoras de sulfato (BRS) para a formação de sulfeto na presença de sulfato no meio (VAZQUEZ e VARALDO, 2009).

Portanto, todos anaeróbios que fazem a degradação da matéria orgânica são potenciais fontes de microrganismos produtores de H_2 , entretanto existe a presença, sempre provável, de microrganismos consumidores de H_2 (NTAIKOU *et al.*, 2010; FANG, 2010). A estratégia para minimizar este efeito consiste no pré-tratamento do inóculo, como explicado anteriormente, que possui a finalidade de selecionar os microrganismos produtores de H_2 inibindo ou eliminando os microrganismos consumidores de H_2 (SA *et al.*, 2011).

3.4.2 Produção de H_2 por culturas puras

Os rendimentos de hidrogênio são significativamente influenciados pelo tipo de inóculo, que incluem as culturas mistas de bactérias e as culturas puras.

As culturas puras são compostas por um único tipo de microrganismo, e são utilizadas com o intuito de estudar as características da produção de hidrogênio, como os produtos da fermentação, o rendimento de H_2 e as características de crescimento do microrganismo (HALLENBECK, 2009). Como vantagens do uso de culturas puras pode-se citar o conhecimento do metabolismo microbiano referente à cultura, o que permite controlar as condições de cultivo para manipulá-lo quanto à produção de subprodutos indesejáveis, aumentando o rendimento do hidrogênio (NTAIKOU *et al.*, 2010). Dessa forma, há grande interesse em isolar culturas puras produtoras de H_2 a partir de culturas mistas.

O estudo e isolamento de microrganismos produtores de H_2 , geralmente anaeróbios estritos, foi facilitado devido ao crescente desenvolvimento de técnicas laboratoriais para o cultivo e amostragem dessas culturas que necessitam de maiores cuidados para garantir a ausência completa de oxigênio, tais medidas incluem o uso de jaras de anaerobiose e os métodos de inoculação em meios líquidos e sólidos. (TORTORA *et al.*, 2006).

Muitas culturas puras foram usadas em estudos recentes para a produção de hidrogênio a partir de diversos substratos, tais como as do gênero *Clostridium*, *Ethanoligenens*, *Enterobacter* e *Bacillus*, isoladas de biorreatores e ambientes naturais. *Clostridium* é um dos gêneros produtores de hidrogênio altamente eficazes e muitas linhagens vem sendo isoladas e estudadas. *Clostridium acetobutylicum* e *Clostridium beijerinckii* são espécies mais estudadas.

Clostridium beijerinckii é uma bactéria anaeróbia, mesófila, formadora de esdósporos, gram-positiva, é capaz de utilizar variedade de substratos. Estas características o torna uma opção atrativa para a produção de biocombustíveis a partir de biomassa, sendo que estas são constituídas por uma ampla gama de açúcares (WIEGEL *et al.*, 2006). *C. beijerinckii* é uma das espécies que tem recebido muita atenção, principalmente por ser um microrganismo que, além de produzir o hidrogênio, também tem sido estudado para a produção de Acetona, Butano e Etanol, também denominada fermentação ABE (ZHAO *et al.*, 2011).

O metabolismo do *C. beijerinckii* é caracterizado como bifásico por possuir uma fase acidogênica, durante a fase de crescimento exponencial da cultura, na qual o H_2 , juntamente com os ácidos acético e butírico são formados. Quando a cultura entra na sua fase estacionária, tem-se a fase solvetogênica do metabolismo que envolve a produção de acetona, etanol e butanol (CHEN e BLASCHEK, 1999).

Microrganismos do gênero *Clostridium* produzem H_2 por fermentação a partir da oxidação de materiais orgânicos, o excesso dos elétrons gerados pela oxidação é dissipado, durante a fermentação, pela formação de H_2 , mantendo assim o equilíbrio redox intracelular (SINHA e PANDEY, 2011). O piruvato formado a partir da glicose durante a glicólise é convertido em acetil-CoA e CO_2 por meio da enzima piruvato ferredoxina oxidoredutase (PFOR). A ferredoxina que compõe esta enzima é re-oxidada pela transferência dos elétrons aos íons H^+ , formando o hidrogênio molecular (H_2). Essa transferência é catalisada pela enzima hidrogenase, resultando em 2 mol de H_2 por mol de glicose (SINHA e PANDEY, 2011). Outra etapa é a re-oxidação do NADH produzido durante a glicólise, cujos elétrons também podem ser transferidos à ferredoxina pela enzima NADH-ferredoxina oxidoredutase (NFOR) e posteriormente aos íons H^+ , gerando mais 2 mol de H_2 .

Assim, na ausência de oxigênio, o rendimento máximo teórico de H_2 é de 4 mol por mol de glicose oxidada, com a formação de 2 mol de ácido acético. Porém, a enzima que atua na segunda etapa citada, a NFOR, apresenta atividade apenas sob baixas pressões parciais de H_2 , sendo assim, rendimentos menores que os teóricos são alcançados (VAZQUEZ e VARALDO, 2009; SINHA e PANDEY, 2009). Com a inibição da enzima NFOR, o NADH será reoxidado em outras vias do metabolismo como na formação de butirato, lactato ou etanol, diminuindo o rendimento de H_2 . Portanto, o rendimento de H_2 depende dos metabólitos formados durante a fermentação. Quando o subproduto da reação é o ácido acético (Equação 8), 4 mol de H_2 são produzidos a partir de 1 mol de glicose, ao passo que, quando o ácido butírico é produzido, apenas 2 mol de H_2 são produzidos (Equação 9).

As vias bioquímicas utilizadas pelo gênero *Clostridium* sp ao degradar a glicose estão expressas na Figura 2.

Figura 2 - Via metabólica para a conversão de glicose em H₂, CO₂, ácidos orgânicos e solventes por microrganismos do gênero *Clostridium* sp. (adaptado de SINHA e PANDEY, 2011). NFOR: NADH-ferredoxina oxidoreductase, PFOR: piruvato ferredoxina oxidoreductase, Fd: ferredoxina.

Muitos microrganismos capazes de produzir H₂ utilizam diversos substratos para isso. As culturas puras, mesmo sendo mais sensíveis a contaminação e necessitando de assepsia para seu manuseio, apresentam maior seletividade relacionada ao substrato, qsnúmero menor de subprodutos e, conseqüentemente, elevados rendimentos de H₂, o que facilita o estudo a respeito do processo de produção de H₂.

3.5 Substratos utilizados na produção de H₂ por fermentação escura

Os vários microrganismos que produzem hidrogênio por fermentação escura apresentam diferentes necessidades nutricionais, preferência por tipo de substrato, temperatura e pH (WANG e WAN, 2009). São essas preferências que determinarão o crescimento específico do microrganismo, assim como a via metabólica que este irá utilizar, influenciando no rendimento processo. (NTAIKOU *et al.*, 2010).

Na fermentação para a produção de H₂, diversas fontes de carbono, tais como, carboidratos, lipídios e outros compostos orgânicos podem ser utilizadas como substrato (GUO *et al.*, 2010; WANG e WAN, 2009; LAY *et al.*, 2003). A escolha do substrato adequado para essa finalidade está relacionada ao custo deste e a sua biodegradabilidade (HAWKES *et al.*, 2002).

Fontes puras de carboidratos como a glicose e a sacarose, são facilmente biodegradáveis, porém, a sua utilização encarece o processo em larga escala de produção de H₂. Portanto, tem-se estudado a utilização de resíduos ricos em carboidratos, gerados por processos industriais, tais como os efluentes da indústria de laticínios (BERGAMASCO e TAVARES, 1997), a manipueira (COLIN *et al.*, 2007; FERRAZ *et al.*, 2009; LAMAISSON, 2009; CAPPELLETTI, 2009), as águas residuárias da indústria de refrigerantes (WEBER, 2006; PEIXOTO, 2008), vinhaça (MORAES *et al.*, 2014), resíduos alimentícios industriais ou domésticos (VIJAYARAGHAVAN e AHMAD, 2006), resíduos da indústria de papel (SHIN *et al.*, 2004), resíduos do processamento do óleo de palma (NOPARAT *et al.*, 2011), e vários materiais lignocelulósicos (REGINATTO e ANTÔNIO, 2015)

Recentemente, pesquisadores têm voltado as suas atenções para o uso da biomassa de algas como matéria prima para a produção de biocombustíveis de terceira geração, incluindo o biohidrogênio (REN *et al.*, 2009). As algas possuem altas concentrações de polissacarídeos, têm a capacidade de sequestrar grandes quantidades de CO₂ e crescer em elevadas velocidades, em comparação com outros tipos de biomassas. São organismos aquáticos e, portanto, não competem em espaço com a produção de alimentos. Além disso, estes organismos não contêm lignina, o que facilita a sua hidrólise para a disponibilização de açúcares fermentáveis (ANDERSON *et al.*, 2014).

Algas são constituídas por vários tipos de polissacarídeos. As algas vermelhas, por exemplo, contêm principalmente agaranas e carragenanas em sua composição. A estrutura base das carragenanas consiste de uma cadeia linear alternando β -D-galactose e α -D-galactose com suas unidades ligadas nas posições 1 $\rightarrow$ 3 (unidade A) e 1 $\rightarrow$ 4 (unidade B), respectivamente, dispostas como unidade de repetição (AB)_n (DA CUNHA *et al.*, 2009), conforme representado na Figura 3.

Figura 3 - Estrutura básica de carragenanas (adaptado de Piculell 1995).

O fato das algas vermelhas serem constituídas por aproximadamente 50 % de carboidratos, como carragenanas, que possuem monômeros D-galactose como a sua unidade base, torna estas algas bastante atrativas para a sua utilização em processos de

fermentação. Entretanto, para uma produção eficiente de H₂ a partir de biomassa de algas, microrganismos produtores de H₂ devem ser capazes de converter, principalmente, a galactose com alto rendimento de H₂ (PARK *et al.*, 2011).

3.5 Métodos moleculares de identificação de microrganismos

Tradicionalmente, as técnicas de identificação de bactérias eram feitas por critérios morfológicos, bioquímicos e nutricionais, ou seja, de acordo com as fontes de carbono e energia, com as suas exigências nutricionais, com o meio de cultivo para seu crescimento e por meio da observação direta por microscópio (KENNEDY, 1999; HERBERT, 1990). Porém, as informações fornecidas por essas técnicas eram limitadas e então novos métodos foram desenvolvidos como alternativa para as técnicas tradicionais.

O avanço tecnológico na área de biologia molecular aliado as limitações dos métodos tradicionais, fazem com que as técnicas moleculares sejam muito utilizadas para identificar microrganismos (COUTINHO *et al.*, 1999). Técnicas para análise de DNA estão em constante desenvolvimento, possibilitando o estudo de microrganismos isolados por meio da exploração genética. Para que sejam realizados estudos utilizando o DNA dos microrganismos, este deve inicialmente ser extraído. Para essa extração, existem diversas técnicas, porém, a escolha depende da natureza de cada tipo de amostra (ZHOU *et al.*, 1996).

O primeiro grande impulso para os métodos moleculares foi o desenvolvimento da técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase) (SAIKI *et al.*, 1985). É uma das técnicas mais empregadas na biologia molecular, pois permite amplificar determinadas sequências de interesse contidas em uma amostra complexa de DNA, possibilitando a utilização de métodos automatizados. É uma técnica que pode ser utilizada para análise

de uma ampla gama de amostras, pois permite uma série de modificações tornando-a bastante flexível. Trata-se de uma reação específica, que mesmo em amostras com grande diversidade de sequências de nucleotídeos é possível determinar organismos específicos. Para isso, o DNA é desnaturado e utiliza-se *primers*, que são sequências iniciadoras complementares àquelas localizadas em locais específicos do DNA, a partir dessa região, com a ação da enzima DNA polimerase, há a extensão do fragmento. A maioria das técnicas moleculares utilizadas na atualidade usam PCR ou alguma variação dessa técnica para a identificação de um microrganismo (SAIKI *et al.*, 1985).

As moléculas mais adequadas para estudos na identificação de microrganismos são os ácidos ribonucleicos ribossomais (RNAr). Os genes desses biopolímeros, os DNAr são as moléculas essenciais para a sobrevivência dos organismos, com maior grau de conservação existente entre as bactérias o que é uma das vantagens de se usar as sequências de RNAr. Outra vantagem é a sua disponibilidade em bases de dados permitindo a comparação de novas sequências com as já presentes (COUTINHO *et al.*, 1990).

Grande quantidade de informações úteis para as análises filogenéticas são geradas pelo RNAr 16S, que é um fragmento de RNAr contendo cerca de 1500 pares de bases nucleotídicas que é mais utilizado devido a maior facilidade no sequenciamento (STAHL, 1997).

A identificação de um microrganismo específico pode ser feita através do sequenciamento de clones de RNAr 16S, que se baseia na amplificação por PCR de um fragmento específico do DNAr 16S a partir do DNA genômico utilizando-se iniciadores específicos. Os produtos de PCR são então clonados em vetores apropriados e é realizado o sequenciamento desses insertos. As sequências geradas a partir do sequenciamento de DNAr 16S representam uma grande quantidade de dados que são então processados

utilizando algoritmos específicos. As informações geradas a partir do sequenciamento de genes de RNAr 16S são comparadas em sequências presentes em bancos de dados como o GeneBank do NCBI para determinar o organismo cuja sequência apresenta a maior porcentagem de similaridade. Sequências de DNAr 16S com similaridade maiores que 80 % são consideradas do mesmo filo, maiores que 95 % do mesmo gênero e maiores que 97 % da mesma espécie (BUENO, 2012).

O sequenciamento de DNA pode ser feito pelo método desenvolvido por Fred Sanger e colaboradores em 1978, que se trata de um método baseado na produção de um conjunto de fitas simples de DNA que são separadas pelo princípio de eletroforese (OKUBO *et al.*, 1992). O método de Sanger gera dados que são mais facilmente interpretados. Por isso, essa tem sido a técnica mais utilizada para sequenciamento (STERKY e LUNDEBERG, 2000).

O desenvolvimento e utilização de sequenciadores automáticos tornaram mais eficiente e rápido o sequenciamento de DNA, já que algumas etapas do método, como a leitura do gel e o processamento de sequências são realizadas através de programas de computador. A reação de sequenciamento pelo método de Sanger (1979) utiliza uma mistura de nucleotídeos normais e modificados, ou seja, é baseado na incorporação de desoxinucleotídeos (dNTPs) e de didesoxinucleotídeos (ddNTPs) a uma cadeia de DNA em crescimento, tendo como molde o DNA de interesse. Os didesoxinucleotídeos não apresentam um grupo hidroxila (OH) 3' necessário para a ligação do próximo desoxinucleotídeo (dNTP), por esse motivo, quando os ddNTPs são adicionados, a extensão da cadeia é interrompida. Como os ddNTPs são marcados, podem ser detectados e a sequência dos nucleotídeos identificada.

Os produtos são submetidos ao sequenciador automático, cujo os fragmentos serão separados em um gel de agarose, montando a sequência correta. Quatro diferentes

substâncias contendo fluorocromos com colorações diferentes são ligadas aos nucleotídeos modificados, e após uma excitação por um laser, a luz emitida pelos fluorocromos é detectada por um fotomultiplicador e a informação é processada através de um computador (BUENO, 2012).

As novas tecnologias de sequenciamento, denominadas de tecnologias de sequenciamento de nova geração (*Next Generation Sequencing*-NGS), estão evoluindo rapidamente desde 2005 quando começaram a ser comercializadas. Informações sobre milhões de pares de bases são obtidas em uma única corrida ao utilizar essas técnicas de sequenciamento de DNA. Enquanto, um sequenciador de eletroforese como no método Sanger processa, no máximo, 96 fragmentos por vez, os sequenciadores de nova geração podem ler até bilhões de fragmentos ao mesmo tempo (CARVALHO, 2010).

Embora distintas, as técnicas de Sanger e NGS apresentam vantagens e desvantagens, assim como limitações de custo/benefício para obter e gerar dados. A principal vantagem do método de Sanger é a maior precisão da base gerada (*base calling*), que tende a ser 10x maior que nos métodos NGS; já para os métodos de segunda geração, a principal vantagem consiste na construção *in vitro* de bibliotecas genômicas sem amplificação de fragmentos de DNA e sem clonagem (KIRCHER, 2010).

Neste trabalho foi utilizado o método de Sanger para o sequenciamento.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Figura 4 - Fluxograma resumindo as etapas realizadas neste trabalho

4.1 Inóculo

A cultura mista (lodo) utilizada para o isolamento de microrganismos produtores de H_2 foi coletada de um reator anaeróbio de fluxo ascendente (RAFA) para o tratamento de efluentes de uma usina de açúcar e etanol (vinhaça), localizada na Região de Ribeirão Preto – SP, Brasil, operado a 45 °C. O lodo foi trazido diretamente ao laboratório, colocado em um béquer de 5 L e esperou-se o tempo necessário para sedimentar a parte sólida. Após este período, o líquido sobrenadante foi descartado e substituído por água de

torneira duas vezes ao dia durante 5 dias, como forma de eliminar totalmente a vinhaça residual.

Após a lavagem, o lodo precipitado foi colocado em um frasco de 5 L e completado o volume com meio de cultura adaptado de GONZALEZ-GIL *et al.* (2002), para o cultivo de lodo anaeróbio, com a composição descrita na Tabela 1 e 2. Todos os reagentes eram de grau analítico com pureza de 99,9 % da marca Dinâmica. Após a substituição do sobrenadante pelo meio de cultura, o pH foi ajustado em pH 6,0 ($\pm 0,2$), gás argônio foi borbulhado por 3 minutos a fim de manter a anaerobiose e o frasco incubado a 35 °C. Este procedimento de substituição do sobrenadante pelo meio de cultura foi realizado durante 1 mês e teve como objetivo favorecer o crescimento das células anaeróbias.

Tabela 1 - Meio de cultura para o cultivo de lodo anaeróbio (GONZALEZ-GIL *et al.*, 2002).

Meio de Cultura	
Reagentes	Concentração (g/L)
Glicose	10,00
NH ₄ Cl	0,11
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,10
KH ₂ PO ₄	0,68
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	0,09
Oligoelementos	1,0 mL/L

Os reagentes e as concentrações da solução de oligoelementos estão especificados na Tabela 2.

Tabela 2 - Solução de oligoelementos para o meio de cultura para o cultivo de lodo anaeróbico (GONZALEZ-GIL et al., 2002)

Solução de oligoelementos	
Reagentes	Concentração (mg/L)
FeCl ₂ · 4H ₂ O	2,0
H ₃ BO ₃	50,0
CuCl ₂ · 2H ₂ O	38,0
MnCl ₂ · 4H ₂ O	500,0
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O	50,0
AlCl ₃ · 6H ₂ O	90,0
CoCl ₂ · 6H ₂ O	2,0
NiCl ₂ · 6H ₂ O	142,0
Na ₂ SeO ₃ · 5H ₂ O	164,0
EDTA	1,0
HCl a 36 %	1,0 mL/L

4.2 Pré-tratamentos realizados no lodo para o enriquecimento em bactérias produtoras de H₂

O lodo cultivado conforme o item 4.1 foi submetido a diferentes pré-tratamentos descritos na literatura como forma de enriquecê-lo em microrganismos produtores de hidrogênio, eliminando ou diminuindo a população de bactérias não produtoras de H₂ (KRAEMER e BAGLEY, 2007). Antes dos pré-tratamentos foi feita a análise de sólidos voláteis totais (SVT) no lodo (APHA, 1995).

As condições dos pré-tratamentos aos quais o lodo foi submetido foram anteriormente testadas em nosso laboratório com sucesso para aumentar a produção de

H₂ (LAMAISON, 2014). Os pré-tratamentos realizados foram o térmico, o ácido e o combinado (térmico + ácido) como mostrado na Figura 5.

Figura 5 - Condições dos pré-tratamentos aos quais o lodo foi submetido.

O tratamento pré-térmico foi feito com a utilização de banho termostatzado (FanemTM), no qual uma alíquota de 150 mL do lodo anaeróbio em béquer de 250 mL foi submetida a temperatura de 80 °C durante 60 minutos e outra alíquota foi submetida a temperatura de 80 °C por 15 minutos.

Para o tratamento ácido uma alíquota de 150 mL do lodo anaeróbio em béquer de 250 mL foi submetida a pH 3 durante 12 horas e outra alíquota foi submetida a pH 3 durante 24 horas. Para tal foi utilizada solução de ácido clorídrico (HCl – 7,0 mol/L) e hidróxido de sódio (NaOH – 6,25 mol/L) (VetecTM).

No tratamento combinado uma alíquota de 150 mL do lodo anaeróbio em béquer de 250 mL foi submetida a temperatura de 80 °C durante 60 minutos e acidificada a pH 3 durante 24 horas, e outra alíquota do lodo foi submetida a temperatura de 80 °C durante 15 minutos e acidificada a pH 3 durante 12 horas.

4.3 Isolamento de culturas produtoras de H₂

Após os pré-tratamentos, uma amostra de 100 µL de cada um dos lodos pré-tratados foi semeada em placas de Petri estéreis. Nas placas, foi adicionado 30 mL de meio de cultura para cultivo de *Clostridium butyricum* produtor de H₂ – denominado de meio CH e descrito por CHEN *et al.* (2006) com pH 7,0. Portanto, a semeadura foi feita pela técnica de derramamento, também denominada de *Pour Plate* e em seguida a placa foi mantida a temperatura ambiente até a solidificação do meio.

Tabela 3 - Meio de cultura para cultivo de microrganismos produtores de hidrogênio (CHEN *et al.*, 2004).

Meio de Cultura - CH	
Reagentes	Concentração (g/L)
Sacarose	15,00
Extrato de Levedura	1,00
Na ₂ HPO ₄	5,00
KH ₂ PO ₄	1,00
NaCl	1,00
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,10
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,045
Solução de Oligoelementos	2,0 mL/L
H ₃ BO ₃	2,86g/L
MnSO ₄ .4H ₂ O	2,03g/L
FeCl ₃ .6H ₂ O	0,167g/L

As placas foram incubadas a 35 °C em jaras de anaerobiose Anaerojar (Oxoid® AG025A), com sachê de anaerobiose Anaerogen (Oxoid® AN025A) até o aparecimento de colônias. As colônias que cresceram foram retiradas das placas com alça estéril, suspensas em solução de NaCl (0,9 % m/v) e reinoculadas em placas de Petri, novamente

pela técnica de *Pour Plate* descrita acima para assegurar o isolamento das colônias que cresceram.

As colônias isoladas foram então novamente ressuspensas em solução de NaCl (0,9 % m/v) e 1,0 mL da suspensão foi inoculada em frascos de penicilina de 50 mL contendo 14 mL de meio CH estéril para o crescimento dos isolados. Nestes frascos foi borbulhado gás argônio para manutenção da anaerobiose, em seguida foi fechado com uma rolha de borracha e lacre de alumínio e incubados em estufa microbiológica a 35 °C por 72 h.

Após o período de incubação de 72 horas, coletou-se 50 μ L de gás do *head-space* pela parte superior dos frascos de penicilina por meio de uma seringa *gás tight* e injetou no cromatógrafo a gás (CG).

A Figura 6 mostra um esquema das etapas descritas anteriormente para o isolamento de microrganismos produtores de H₂.

Figura 6 - Esquema das principais etapas realizadas para o isolamento de uma cultura produtora de H₂ partindo do lodo após os pré-tratamentos.

A cultura isolada que apresentou hidrogênio na composição do gás do *head-space* foi separada para a sua identificação e ensaios de produção de H₂.

4.4 Identificação da cultura isolada e análises filogenéticas

Como uma primeira etapa de caracterização da cultura isolada, realizou-se a coloração de Gram pelo método de Hucker (DOETSCH, 1981), que consiste na fixação das bactérias em uma lâmina e coloração utilizando violeta de genciana, tintura de iodo e fucsina básica, e posterior análise dessa lâmina em microscópio. O exame morfológico foi realizado utilizando um microscópio óptico (Coleman - N101-B) com aumento de 400X.

4.4.1 Extração do DNA genômico da cultura isolada

O DNA genômico foi extraído a partir dos *pellets* contendo as células da cultura isolada. Os pellets foram obtidos a partir de, 2,0 mL do cultivo da célula em meio CH com densidade óptica de 0,08 a 600 nm, o que corresponde a $4,06 \cdot 10^7$ células/mL, centrifugado a 1000 rpm em centrífuga (Eppendorf - 5417- R).

Inicialmente preparou-se o DNA molde adicionando a cada *pellet* 50 µL de água Milli-Q esterilizada e submetendo a 100 °C em banho por 5 minutos para lisar as células, que após este procedimento foram mantidas em gelo.

4.4.2 Amplificação do gene RNAr 16S

O gene RNAr 16S da bactéria isolada foi amplificado por PCR, como descrito por GUZZARONI *et al.*, 2013. A amplificação do gene de RNAr 16S (1286 pb) da cepa isolada foi realizada por PCR utilizando *primers* específicos para bactérias F27 (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') e R1492 (5'-CGGYTACCTTGTTACGACTT-3')

em concentrações de 10,0 μM . A PCR foi feita em um volume final de 75 μL contendo 3,75 μL do *primer* F27 e 3,75 μL do *primer* R1492, 1,5 μL de desoxinucleotídeos trifosfato (dNTP - Adenina(A), Tirosina (T), Guanina (G) e Uracila (U)), 15,0 μL da enzima *Phusion High-Fidelity* DNA polimerase (Thermo Cientific) em tampão 5X da reação (200 mM Tris-HCl, 100 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 100 mM KCl, 1 mg/mL BSA, 1 % Triton X-100, 20 mM MgSO_4 , pH 8,8), 2,25 μL de DMSO (dimetilsulfóxido), 0,75 μL da enzima *Phusion Pol* (Thermo Cientific), 2,0 μL de DNA molde, 46,5 μL de água Milli-Q. As reações foram conduzidas em termociclador *MyCycler Thermal Cycler* (Bio-Rad). O programa de termociclagem teve um ciclo inicial de desnaturação da dupla fita de DNA a 90 °C por 1 minutos; 28 ciclos para anelamento dos iniciadores à sequência de DNA molde e extensão da fita dupla (49,3 °C por 30 s e 72 °C por 2 min), 1 ciclo final de extensão por 45 s a 72 °C.

4.4.3 Purificação dos produtos da PCR

Os produtos de amplificação da PCR foram purificados usando eletroforese em gel de agarose, no qual 10 μL das amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 0,8 % (m/v), em tampão TAE (Tris-acetato 0,04 mol/L, EDTA 0,001 mol/L pH 8,0), a 90 V, por 45 minutos. O gel foi corado com brometo de etídio por 15 minutos para visualização da banda relacionada à amplificação da PCR em aparelho transiluminador UV (SAMBROOK e RUSSEL, 2001).

Após a confirmação pelo aparecimento de bandas de tamanho esperado no gel de agarose (aproximadamente 1500 pares de bases), a banda contendo o produto da PCR foi cortada do gel com utilização de um bisturi e esse gel foi colocado em um microtubo, ao qual foi adicionado 350 μL de *Membrane Binding Solution* e submetido a 65 °C por 10

minutos até a dissolução do gel. Após isso realizou-se a purificação do produto da PCR usando o Kit Wizard® SV e PCR *Clean-Up System* (Promega, Madison, EUA). Nesse procedimento, o DNA é adsorvido em uma membrana de sílica enquanto as impurezas são eficientemente lavadas com tampões adequados. Os produtos de PCR puros foram eluídos com água RNase *Free*.

4.4.4 Clonagem do produto da PCR em vetor pJET1.2/blunt

Os produtos amplificados e purificados da PCR do gene RNAr 16S foram ligados no vetor de clonagem pJET1.2/blunt (estojo de clonagem de PCR *Clone JET™*, MBI *Fermentas / Thermo Scientific*), a reação de ligação do produto de PCR purificado ao vetor consistiu-se de 1 µL da enzima T4 DNA ligase (Thermo Cientific), 10 µL de tampão T4 ligase 1X, 8 µL de produto de PCR purificado e 1 µL do vetor de clonagem pJET1.2.

O vetor de clonagem pJET1.2, cujo mapa está expresso na Figura 7, possui 2974 pares de bases e foi linearizado com Eco321(EcoRV) com número de acesso EF694056 (GenBank/EMBL). As extremidades rompidas do vector contem grupos 5'-fosforil.

Figura 7 - Mapa esquemático do vetor pJET 1.2/blunt mostrando a origem de replicação e o sítio múltiplo de clonagem.

4.4.5 Transformação de *E. coli*

O produto purificado da PCR ligado ao vetor pJet1.2/blunt foi utilizado para transfor bactérias *E. coli* DH β eletrocompetentes (Invitrogen, Alemanha) (SAMBROOK e RUSSEL, 2001). A eletroporação é feita utilizando o programa Ec1 do eletroporador *MicroPulser* (Bio-Rad) com voltagem de 2,5 kV. O vetor contendo o inserto foi inserido nas células de *E.coli* DH β eletrocompetentes através de choque térmico (SAMBROOK *et al.*, 1989), que consiste em adicionar a um microtubo 4 μ L do produto da ligação juntamente com 100 μ L de células eletrocompetentes, submetidos a banho de gelo por 30 minutos, 42 °C por 90 segundos, novamente em gelo por 2 minutos. Adicionou-se 900 μ L de meio de cultura Luria Bertani (LB) (Tryptona 1 %, extrato de levedura 0,5 %, cloreto de sódio 1 %) líquido e estéril e a cultura foi incubada por 60 minutos, a 37 °C sob agitação de 180 rpm. Após esse tempo, o microtubo foi centrifugado a 10.000 rpm por 1 minuto e retirado o sobrenadante em excesso, deixando apenas 150 μ L. Esse volume foi plaqueado

em placa de Petri contendo meio LB sólido estéril e contendo ampicilina a uma concentração de 100 µg/mL, sendo a placa incubada a 37 °C *over night*.

Após a incubação, a colônia sobrevivente, que possui o inserto com resistência à ampicilina, foi pinçada e inoculada em tubo Falcon® contendo 3 mL de meio de cultura LB líquido suplementado com 3 µL de ampicilina e cultivada a 37 °C, sob agitação de 180 rpm *over night*.

4.4.6 Extração plasmidial

Os plasmídios foram recuperados através de extração plasmidial utilizando o Kit *QIAprep Spin Miniprep* (Qiagen) seguindo as recomendações do fabricante. Esse procedimento tem como fundamento a desestabilização da parede celular bacteriana, lise da membrana plasmática, desnaturação de proteínas e a desnaturação diferencial do DNA. O DNA cromossomal é desnaturado, enquanto o DNA plasmidial circular (que tem um tamanho menor) permanece inalterado e em solução. A separação do DNA plasmidial ocorre através de uma membrana de sílica presente em uma coluna. A quantidade do DNA foi estimada por meio de espectrofotometria utilizando o *Nanodrop 2000c* (Thermo Scientific), no comprimento de onda de 260 nm.

4.4.7 Sequenciamento

Cinco clones de DNAr obtidos de bactérias independentes foram sequenciados usando *primers* pJET1.2 *forward* (5' 'CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC -3') e pJET1.2 *reverse* (5'AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG-3 ') de acordo com o

protocolo da *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing de Applied Biosystems* (USA). Cada reação foi preparada com 400 ng totais de DNA, 0,25 μ M de iniciadores, 8 μ L de tampão de sequenciamento 2,5X (Tris 200 mM, $MgCl_2$ 5 mM, pH 9,0) e 1 μ L da solução *Mix Big Die* (deoxinucleosídeos trifosfatos: dATP, dCTP, dGTP e dUTP), terminador A-Dye marcado com dicloro [R6G], terminador C-Dye marcado com dicloro [ROX], terminador G-Dye marcado com dicloro [R110], terminador T-Dye marcado com dicloro [TAMRA], AmpliTaq DNA polimerase com pirofosfatase termoestável, em um volume final de reação de 20 μ L.

A reação foi incubada em termociclador (MyCycler – Biorad), nas seguintes condições de termociclagem: 2 minutos a 96 °C, 40 ciclos de (30 segundos a 96 °C, 15 segundos a 50 °C, 4 minutos a 60 °C). As amostras foram precipitadas, ressuspendidas em tampão e aplicadas em gel de sequenciamento padrão 4,25 % (18 g uréia, 5,3 mL acrilamida 40 %, 0,5 g de resina, 5 mL TBE 10X (10,8 g de trisma base, 35 g de ácido bórico, 9,3 g de EDTA), 250 μ L de persulfato de amônia 10 % e 35 μ L de TEMED). As reações de sequenciamento foram analisadas usando equipamento AB 3730 XL de *Applied Biosystems* (USA).

As sequências de genes RNAr 16S obtidas foram exploradas pelo *GenBank* utilizando o programa *BLAST* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). A árvore filogenética foi criada usando o método da máxima verossimilhança baseada no modelo Jukes-Cantor. Análise da probabilidade máxima foi realizada com o programa de MEGA 6,0 (TAMURA *et al.*, 2013).

4.5 Métodos de quantificação da bactéria isolada

Para quantificar a bactéria isolada foram estabelecidas correlações entre diferentes métodos utilizados na quantificação de microrganismos, tais como a massa

celular seca, a densidade ótica a 600 nm e a contagem de células em Câmara de Neubauer. Para realizar estas correlações foram utilizadas diferentes diluições de um cultivo líquido da bactéria em solução salina NaCl (0,9 % m/v) e realizada a medida da densidade ótica (D.O.), em 600 nm, a contagem em Câmara de Neubauer e a determinação da massa celular seca de cada uma delas (APHA, 1995).

A medida de massa celular seca consiste em filtrar as amostras (suspensão da bactéria) utilizando membrana de acetato-celulose (UnifilTM) com porosidade de 45 µm previamente secas em forno micro-ondas ajustado na potência de 180 W por 15 minutos e pesadas. Após a filtração de um volume conhecido da amostra, os filtros foram secos a 105 °C por 24 horas e pesados novamente. A diferença de peso das membranas (filtros) antes e depois da secagem é a massa seca de célula. Para transformar a massa seca em concentração de massa celular seca foi levado em consideração o volume da cultura filtrado.

As diluições da cultura celular também foram submetidas a contagem com auxílio de uma câmara de Neubauer e um microscópio óptico (Coleman - N101-B) com aumento de 400X.

A leitura da D.O. das diferentes diluições da cultura da célula foi feita em espectrofotômetro UV/Vis (BEL Engineering – UV - M51).

Com os resultados obtidos foram traçados gráficos correlacionando D.O. a 600 nm x Massa celular seca (mg/L) e D.O. a 600 nm x Número de Células (cél/mL). A partir das equações de reta fornecidas por estes gráficos foi possível estimar o número de células nas culturas ou a concentração de massa celular seca, apenas com a medida de D.O. a 600 nm.

4.6 Ensaios de fermentação em batelada para a produção de H₂

4.6.1 Ensaios preliminares utilizando diferentes fontes de carbono

Como uma forma de avaliar as fontes de carbono que o microrganismo isolado é capaz de converter em hidrogênio, realizou-se testes preliminares em frascos de penicilina de 50 mL contendo meio CH modificado, no qual a sacarose foi substituída por diferentes monossacarídeos, dissacarídeos, polissacarídeos e não carboidratos como fontes de carbono, representados na Figura 8. Todos os reagentes foram de grau analítico P.A (Sigma-AldrichTM). As concentrações testadas das fontes de carbono foram 2 g/L e 10 g/L, com o pH inicial do meio de 6,5. A cultura celular do isolado utilizada como inóculo foi previamente centrifugada e ressuspensa em solução salina (NaCl - 0,9 m/v) para atingir D.O. a 600 nm de 0,08, correspondendo a $4,05 \cdot 10^7$ células/mL.

Em cada frasco de penicilina contendo 14 mL do meio de cultura CH com diferentes fontes de carbono foi adicionado 1 mL de inóculo. Após inoculados, gás argônio foi borbulhado nos frascos, os quais, em seguida, foram fechados com tampa de borracha e com lacre de alumínio e mantidos a 35 °C. Após o período de 72 h, o gás do *head-space* foi analisado por cromatografia a gás. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas independentes e os resultados apresentados como médias com seus respectivos desvios das médias.

Amostras do meio de cultura no início e no fim dos ensaios de fermentação foram retiradas para a determinação do carbono orgânico total (COT), da D.O. a 600 nm e do pH.

Figura 8 - Fontes de carbono utilizadas nos ensaios preliminares de produção de H_2 pela cultura isolada.

4.6.2 Ensaios de fermentação com diferentes pH iniciais e temperaturas

O pH inicial e a temperatura de incubação mais adequado para a produção de H_2 pela bactéria isolada foram avaliados em ensaios de fermentação em frascos de penicilina de 50 mL, contendo 14 mL de meio de cultura CH. Nos ensaios com diferentes pH iniciais o meio CH continha 15,0 g/L de glicose e o pH inicial foi ajustado com NaOH (6,25 mol/L) ou HCl (7,0 mol/L) em 4,0, 5,0, 6,0, 7,0 e 8,0 ($\pm 0,02$) e incubados a 35 °C por 72 horas.

Nos ensaios em diferentes temperaturas utilizou-se o meio de cultura CH contendo 15 g/L de glicose, o pH inicial ajustado em 7,0 e as temperaturas de incubação testadas foram de 25, 35 e 50 °C por 72 horas.

Como inóculo para os ensaios foi utilizado 1,0 mL da cultura isolada crescida em meio CH, pH 7,0 e 35 °C por 72 horas. A D.O. a 600 nm do inóculo foi padronizada em 0,08. Os frascos foram borbulhados com gás argônio e, em seguida, fechados com tampa de borracha e com lacre de alumínio. Todos os ensaios foram realizados em triplicata

independentes e os resultados apresentados como médias com seus respectivos desvios das médias. Após o tempo de incubação dos ensaios (72 h), a composição do gás do *head-space* foi determinada.

Amostras do meio de cultura no início e no final dos ensaios de fermentação foram retiradas para a determinação da concentração de açúcares redutores totais (ART), a D.O. a 600 nm e o pH.

Na figura 9 está representado o esquema simplificado das principais etapas destes ensaios.

Figura 9 - Esquema das principais etapas realizadas nos ensaios de diferentes pHs iniciais e diferentes temperaturas de incubação da cultura isolada produtora de H₂.

4.6.3 Ensaios cinéticos de fermentação utilizando diferentes concentrações de glicose e de galactose

Ensaios cinéticos foram realizados visando estudar o microrganismo isolado em relação a produção de H₂, ao crescimento celular, ao consumo de substrato e variação do pH no decorrer do tempo. Esses ensaios cinéticos foram realizados em batelada com

diferentes concentrações iniciais de glicose P.A. (VetecTM) e galactose P.A. (Sigma-AldrichTM). Os ensaios para a produção de H₂ utilizando diferentes concentrações de galactose foram realizados substituindo-se a fonte de carbono do meio CH por galactose nas concentrações de 1,0, 5,0, 10,0, 15,0, e 20,0 g/L, e os ensaios utilizando diferentes concentrações de glicose foram realizados substituindo-se a fonte de carbono do meio CH por glicose nas concentrações de 2,0, 5,0, 10,0, 15,0, e 20,0 g/L. Os ensaios foram realizados em tubos de Durham[®] de 2 L contendo 600 mL de meio, pH inicial de 7,0 e adicionando-se 45 mL do inóculo com D.O. 0,08 a 600 nm. Gás argônio foi borbulhado nos frascos antes de iniciar os testes e, em seguida, fechados com tampa de borracha e incubados a 35 °C pelo tempo de duração do ensaio de fermentação. Durante os ensaios, periodicamente, foram retiradas amostras de 5 mL de meio com seringa estéril para a leitura da D.O. a 600 nm, para a determinação da concentração de açúcares redutores totais (ART), dos metabólitos solúveis e do pH. A composição do gás do *head-space* foi determinada retirando-se uma alíquota de 100 µL com uma seringa *gás tight*. O ensaio foi terminado quando o volume de H₂ se manteve constante. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas ou duplicatas de forma independente, e os resultados apresentados como a média e seus desvios médios.

4.6.4 Cálculo do Rendimento e Eficiência dos Ensaios de Fermentação

O volume de H₂ no *head-space* dos frascos de fermentação foi calculado multiplicando-se o volume total (mL) do *head-space* pela porcentagem do H₂ analisada no gás do *head-space*. O volume de H₂ foi convertido em mmol aplicando-se a Equação dos Gases Ideais ($P.V=n.R.T$), na qual P é a pressão (1 atm), V é o volume de H₂ (L), n é o

número de mol de H_2 , R é a constante universal de um gás ideal (0,082 atm.L/K.mol) e T é a temperatura dos ensaios em Kelvin (308K).

O fator de conversão, também denominado de rendimento ($Y_{p/s}$) de H_2 (produto-p) em relação ao substrato (s) consumido nos ensaios de fermentação foram calculados dividindo-se o número de mmol de H_2 produzido durante os ensaios pela quantidade de substrato consumido em mmol, conforme Equação 10:

$$Y_{p/s} = \frac{\Delta p}{\Delta s} \quad (\text{Equação 10})$$

Sendo $Y_{p/s}$ o fator de conversão de substrato em produto no mesmo intervalo de tempo. ΔS em mmol é a diferença entre o número de mmols do substrato no início e no final do ensaio; ΔP é o número de mmols formado no período do ensaio.

A eficiência da produção de H_2 foi calculada de acordo com a Equação 11:

$$Eficiência(\%) = \frac{Y_{p/s} \cdot 100}{Y_{teórico}} \quad (\text{Equação 11})$$

Onde $Y_{teórico}$ refere-se ao rendimento máximo fornecido pelas equações estequiométricas para a produção de H_2 a partir de cada fonte de carbono, no caso das hexoses, $Y_{teórico}$ é 4 mol de H_2 /mol de hexose, para as pentoses é 3,3 mol de H_2 /mol de pentose e para os dissacarídeos esse fator é 8 mol de H_2 /mol de dissacarídeos (NASCIMBENI, 2013; KONGJAN e ANGELIDAKI, 2009).

4.7 Modelagem dos resultados dos ensaios cinéticos de fermentação para a produção de H_2

O modelo de *Gompertz* modificado foi utilizado para estimar os parâmetros cinéticos referentes à produção de hidrogênio em ensaios em batelada contendo diferentes concentrações de glicose e galactose. O volume de H₂ obtido durante o ensaio em função do tempo é tratado no programa *Statistica 7* e modelados conforme Equação 12, para a obtenção dos parâmetros cinéticos R_m, H_{max} e λ.

$$P = H_{max} \cdot \exp \left\{ -\exp \left[\frac{R_m \cdot e}{P} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (\text{Equação 12})$$

Nesta equação, P representa o volume de H₂ acumulado no ensaio (mL), H_{max} representa o potencial máximo de produção de H₂ (mL) nos resultados está em mmol, o R_m indica a velocidade máxima de produção de H₂ (mL/h), λ indica o tempo da fase *lag* ou o tempo para o início da produção de H₂ (h) e por fim, t que representa o tempo do experimento (h).

A velocidade volumétrica de produção de H₂ ou do inglês *hydrogen production rate* (HPR) foi calculada dividindo-se o R_m pelo volume útil final (meio) do reator.

4.8 Determinações analíticas

Para a determinação de carbono orgânico total - COT, o equipamento utilizado foi o analisador Shimadzu - Modelo TOC-VCPN, por método de medida Direto-Combustão- oxidação catalítica a 680 °C. A detecção foi por NDIR (*non-dispersive infrared gas analyzer*), sendo utilizado um volume de amostra para TC (carbono total) de 20 µL. O gás carregador utilizado foi o oxigênio com fluxo de 230 mL/min. A condição de calibração utilizada foi a auto diluição de padrão de biftalato de potássio 1000 ppm (seco a 110 °C por 1 h), variação de 50 a 1000 rpm.

Durante a realização dos ensaios de fermentação a concentração de glicose e de galactose foi analisada pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) para a determinação de açúcares redutores totais (ART). Esse método consiste em adicionar em um tubo de ensaio, 0,75 mL da amostra com 1,5 mL do reagente de DNS e submeter a um banho termostatizado a 100 °C por 5 minutos. Após esse tempo deve-se submeter o tubo de ensaio em banho de gelo para cessar a reação, adicionar 10,0 mL de água destilada, agitar e medir em espectrofotômetro a 540 nm (MILLER, 1959).

As medidas das concentrações dos subprodutos solúveis da fermentação, tais como ácido butírico, acético, láctico, etanol e acetona foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência – CLAE (Shimadzu, Japão). As condições utilizadas foram coluna Aminex HPX-87H, fase móvel consistindo de H₂SO₄ (0,005 mol/L), fluxo de 0,6 mL/min (84 Kgf/cm²). Foi usado como detector o RID-10 (índice de Refração) para o etanol e acetona e arranjo de Diodos nos comprimentos de 190 nm e 213 nm para os demais metabólitos. A aquisição e o tratamento dos dados foram realizados pelo software *Class VP 6.1* (Shimadzu, Japão).

A concentração de hidrogênio no gás foi determinada em cromatógrafo a gás (CG 2014, Shimadzu, Japão), equipado com detector de condutividade térmica (DCT). A coluna utilizada foi a peneira molecular 5A (2,0 m x 4,7 mm), sendo o gás de arraste argônio sob vazão de 30 mL/min. As temperaturas do injetor, da coluna e do detector foram 80 °C, 50 °C e 100 °C, respectivamente. O volume de gás hidrogênio em cada intervalo de tempo foi calculado através da composição de gás e do volume do *head-space* no intervalo de tempo da amostragem. Para comparação os volumes de gás foram calculados sob condições padrão (273,15 K, 1 atm).

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Isolamento e Identificação da Cultura Isolada e Análises

Filogenéticas

A partir da cultura mista do sistema de tratamento de vinhaça, após os pré-tratamentos descritos em materiais e métodos, foram isoladas vinte e uma (21) colônias. Foram isoladas 5 colônias do lodo pré-tratado a 80 °C por 15 minutos, 6 colônias do lodo após o tratamento a 80 °C por 60 minutos, 8 colônias do lodo após tratamento ácido pH 3 por 12 horas e 2 colônias do lodo que sofreu tratamento combinado a 80 °C por 15 minutos e pH 3 por 12 horas. Após o plaqueamento das amostras de lodo que sofreram o pré-tratamento combinado (temperatura + pH) não foi observado o crescimento de colônias, sob as condições utilizadas neste trabalho.

Todas as colônias isoladas foram testadas para a produção de hidrogênio em ensaios de fermentação em batelada. Dentre as colônias testadas, apenas uma delas, denominada de Br21, submetida ao pré-tratamento ácido em pH 3 por 12 horas, apresentou produção de H₂, após 72 horas, nas condições estudadas (meio CH com 15 g/L de sacarose, 35 °C e pH inicial 7,0).

Após o ensaio de fermentação com o microrganismo que produziu hidrogênio, foi realizada uma coloração de Gram, como forma de iniciar a caracterização da colônia isolada. Por meio desta coloração, foi possível observar que o microrganismo isolado se tratava de um Gram positivo, pois apresentou coloração violeta, conforme pode ser observado na imagem obtida ao microscópio. A partir desta imagem também foi possível verificar que se tratava de uma bactéria no formato de bastonete. A imagem obtida da observação em microscópio (com aumento de 400X) está apresentada na Figura 10.

Figura 10 - Imagem obtida por microscópio com aumento de 400X indicando resultado positivo ao teste de Gram e morfologia de bastonete da bactéria isolada.

Para a identificação da bactéria produtora de H_2 (cepa Br21) foi extraído o seu DNA genômico para a posterior amplificação da sequência do gene RNAr 16S. Após clonagem da sequência amplificada em um vetor de clonagem pJET1.2 e transformação em células eletrocompetentes de *E. coli* DH10B, o DNA foi extraído novamente e enviado para o sequenciamento. A comparação da sequência de bases obtida pelo sequenciamento com a base de dados do *Genbank* (número de acesso no *GenBank*: KT626859) mostrou que a sequência apresentava maior semelhança com o *Clostridium beijerinckii* TB8 (99 %) (número de acesso no *GenBank*: LC020493).

A partir dos resultados foi construída uma árvore filogenética que representa graficamente as relações de parentesco entre as espécies por meio do uso de algoritmos computacionais, os comprimentos dos ramos desta árvore indicam o número de mudanças evolutivas entre as espécies, ou seja, uma maior distância representa menor semelhança. A árvore filogenética construída está mostrada na Figura 11.

Figura 11 - Árvore filogenética mostrando a relação entre a cepa isolada de *Clostridium beijerinckii* Br21 e as espécies relacionadas baseada nas sequências dos genes de RNAr 16S.

O *C. beijerinckii* é um microrganismo produtor de H₂, mas também reconhecido como produtor de acetona (A), butanol (B) e etanol (E), denominada de fermentação ABE (EZEJI *et al.*, 2007; LEE *et al.*, 2015). Outra característica do *C. beijerinckii* é a sua resistência a compostos inibidores de fermentação presentes em hidrolisados, especialmente os obtidos pela hidrólise ácida de materiais lignocelulósicos, tais como o hidroximetilfurfural (HMF) e o furfural, além do ácido acético e dos derivados de lignina (PARK *et al.* 2011; PATEL *et al.*, 2014). Alguns destes inibidores, como o HMF e o ácido acético, também aparecem em hidrolisados ácidos de biomassa de algas, pois são produtos de degradação de hexoses e da hemicelulose, respectivamente. Esta resistência aos inibidores de fermentação presentes em hidrolizados lignocelulósicos foi descrita por Quéméneur *et al.* (2012), que observaram a predominância de *C. beijerinckii* em culturas mistas utilizadas para a produção de H₂ com hidrolisados de talos de girassol como

substrato. Em outro estudo foi verificado que a fermentação ABE por *C. beijerinckii* não foi inibida na presença de HMF e furfural em concentrações de até 3 g/L utilizando reator em batelada (EZEJI *et al.* 2007). Estes estudos revelam que o *C. beijerinckii* é um bom candidato para a produção de H₂ a partir de materiais lignocelulósicos e de biomassa de algas, ou seja, para a produção de biohidrogênio de segunda e terceira geração, respectivamente.

5.2 Quantificação da bactéria isolada

Para a quantificação da bactéria nos ensaios de fermentação foram correlacionados três métodos de quantificação de microrganismos, a D.O. a 600 nm, a concentração de massa celular seca e o número de células. A partir dos resultados obtidos foi traçado um gráfico correlacionando a D.O. a 600 nm e a concentração de massa celular seca (mg/L) e outro a D.O. a 600 nm e o número de células (cel/mL). As equações de reta fornecidas por estas correlações, Figuras 12 e 13, auxiliaram a estimar o número de células e a massa celular seca, a partir da medida da densidade ótica nos ensaios de fermentação realizados neste trabalho.

Figura 12- Correlação entre concentração de massa celular seca e a densidade ótica (D.O.) a 600 nm com a respectiva equação da reta.

Figura 13 - Correlação entre o número de células.10⁶/mL e a densidade ótica (D.O.) a 600 nm com a respectiva equação da reta.

5.3 Utilização de diferentes substratos pela cultura isolada

A biomassa terrestre é rica em polissacarídeos cujos monômeros principais são a glicose e a xilose, a produção de hidrogênio a partir destes tem sido amplamente investigada (VRIJE *et al.*, 2007; FANG e LIU, 2002; LIN e CHENG, 2006; PIERRA *et al.*, 2014; SALERNO *et al.*, 2006; TIEN ANH *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2009). No entanto, a biomassa marinha como as algas é rica em polissacarídeos cujos monômeros principais são a glicose, galactose e a manose (WEI *et al.*, 2013), apresentando um notável potencial para produção de hidrogênio (XIA *et al.*, 2015). Os ensaios de fermentação com diferentes fontes de carbono para a produção de hidrogênio por *C. beijerinckii* Br21, além de servirem para a caracterização da cepa, auxiliaram na escolha de substratos com elevados rendimentos de H₂.

Os resultados dos ensaios de fermentação para a produção de H₂ pela bactéria isolada utilizando diferentes fontes de carbono na concentração inicial de 2 g/L estão expressos na Tabela 4.

Tabela 4 - Substrato consumido (mmol), H₂ produzido (mmol), rendimento (mmol de H₂/mmol de substrato consumido), concentração de H₂ produzido (mmol/L), concentração celular final (mg/L) e pH final nos ensaios de fermentação com o *C. beijerinckii* Br21 em 2 g/L de diferentes fontes de carbono.

Fonte de carbono	Substrato consumido (mmol)	H ₂ produzido (mmol)	Y (mmol H ₂ /mmol substrato)	Concentração de H ₂ produzido* (mmol/L)	Massa celular seca (mg/L)	pH final
Glicose	2,13 ± 0,12	1,64 ± 0,02	0,77 ± 0,05	34,44 ± 0,02	24,09 ± 0,18	5,32 ± 0,63
Galactose	2,14 ± 0,09	0,76 ± 0,02	0,36 ± 0,04	16,89 ± 0,02	22,39 ± 0,07	4,43 ± 0,10
Manose	3,79 ± 0,28	0,95 ± 0,02	0,25 ± 0,13	21,11 ± 0,02	22,88 ± 0,16	4,57 ± 0,23
Frutose	3,94 ± 0,29	0,57 ± 0,02	0,14 ± 0,03	12,67 ± 0,02	21,78 ± 0,52	4,59 ± 0,52
Xilose	3,80 ± 0,41	0,69 ± 0,01	0,18 ± 0,02	15,33 ± 0,01	22,13 ± 0,35	4,25 ± 0,08
Arabinose	2,40 ± 0,02	0,57 ± 0,02	0,24 ± 0,00	12,67 ± 0,02	21,69 ± 0,03	4,35 ± 0,17
Sacarose	1,26 ± 0,19	1,74 ± 0,01	1,38 ± 0,09	38,67 ± 0,01	24,21 ± 0,57	4,37 ± 0,18
Trealose	1,09 ± 0,55	1,70 ± 0,03	1,56 ± 0,26	37,78 ± 0,01	23,36 ± 0,63	4,51 ± 1,44
Celobiose	0,53 ± 0,23	0,71 ± 0,02	1,35 ± 0,10	15,78 ± 0,02	21,84 ± 0,02	4,63 ± 0,19
Lactose	1,73 ± 0,44	0,56 ± 0,02	0,32 ± 0,02	12,44 ± 0,02	21,87 ± 0,49	4,90 ± 0,28
Avicel	-	-	-	-	-	6,35 ± 0,01
Amido	-	0,24 ± 0,01	-	5,33 ± 0,01	20,21 ± 0,24	6,55 ± 0,14
Glicerol	2,78 ± 0,26	0,67 ± 0,02	0,24 ± 0,12	14,89 ± 0,02	20,75 ± 0,22	6,42 ± 0,98
Etanol	5,04 ± 0,17	-	-	-	-	6,62 ± 0,14

*valores obtidos dividindo-se a quantidade de H₂ (mmol) pelo volume do *head-space* dos frascos (0,045 L)

Os resultados dos ensaios de fermentação com as fontes de carbono com concentração inicial de 10 g/L estão representados na Tabela 5.

Tabela 5 - Substrato consumido (mmol), H₂ produzido (mmol), rendimento (mmol de H₂/mmol de substrato consumido), concentração de H₂ produzido (mmol/L), concentração celular final (mg/L) e pH final nos ensaios de fermentação com o *C. beijerinckii* Br21 em 10 g/L de diferentes fontes de carbono.

Fonte de Carbono	Substrato consumido (mmol)	H ₂ produzido (mmol)	Y (mmol H ₂ /mmol substrato)	Concentração de H ₂ produzido* (mmol/L)	Massa celular seca (mg/L)	pH final
Glicose	1,36 ± 0,02	1,75 ± 0,01	1,29 ± 0,00	38,89 ± 0,01	23,74 ± 0,49	4,96 ± 0,30
Galactose	2,19 ± 0,12	0,93 ± 0,01	0,42 ± 0,06	20,67 ± 0,01	23,09 ± 0,14	4,54 ± 0,16
Manose	2,05 ± 0,28	1,16 ± 0,05	0,57 ± 0,11	25,78 ± 0,05	23,34 ± 0,22	4,32 ± 0,31
Frutose	2,65 ± 0,33	0,66 ± 0,02	0,25 ± 0,16	14,67 ± 0,02	21,94 ± 0,66	4,40 ± 0,40
Xilose	2,82 ± 0,16	0,72 ± 0,01	0,25 ± 0,08	16,00 ± 0,01	22,76 ± 0,60	4,76 ± 0,28
Arabinose	1,72 ± 0,36	0,57 ± 0,02	0,33 ± 0,17	12,67 ± 0,02	21,84 ± 0,03	4,61 ± 0,15
Sacarose	1,16 ± 0,18	1,65 ± 0,01	1,43 ± 0,09	36,67 ± 0,01	23,98 ± 0,68	4,37 ± 0,11
Trealose	1,94 ± 0,49	1,67 ± 0,04	0,86 ± 0,23	37,11 ± 0,04	23,79 ± 0,90	4,47 ± 1,38
Celobiose	1,17 ± 0,12	0,64 ± 0,03	0,55 ± 0,04	14,22 ± 0,03	21,99 ± 0,01	4,52 ± 1,08
Lactose	1,04 ± 0,26	0,62 ± 0,01	0,60 ± 0,13	13,78 ± 0,01	22,08 ± 0,43	4,52 ± 0,04
Avicel	-	-	-	-	-	6,53 ± 1,08
Amido	-	0,53 ± 0,01	-	11,78 ± 0,01	21,59 ± 0,23	6,42 ± 0,08
Glicerol	6,22 ± 0,48	0,83 ± 0,08	0,13 ± 0,01	18,44 ± 0,08	22,57 ± 0,79	6,45 ± 1,03
Etanol	0,32 ± 0,20	-	-	-	-	6,27 ± 0,13

*valores obtidos dividindo-se a quantidade de H₂ (mmol) pelo volume do *head-space* dos frascos (0,045 L)

De uma maneira geral a produção de H₂ foi proporcional ao crescimento celular como pode ser observado por meio dos resultados da concentração de massa celular seca e quantidade de H₂, apresentados nas Tabelas 4 e 5. Nas fontes de carbono em que não houve crescimento celular, também não houve produção de H₂, como no etanol e na celulose microcristalina (Avicel®), em ambas as concentrações iniciais de substrato.

A cepa isolada foi capaz de produzir H_2 utilizando como fonte de carbono todos os monossacarídeos e dissacarídeos testados nas concentrações de 2 e 10 g/L. O aumento da concentração dos monossacarídeos de 2 g/L (Tabela 4) para 10 g/L (Tabela 5) promoveu um aumento no rendimento de H_2 .

Por outro lado, quando as concentrações dos dissacarídeos aumentaram de 2 para 10 g/L este efeito não foi observado, com exceção da lactose. Para a sacarose não houve diferença significativa entre os rendimentos com as duas concentrações. Entretanto, para a celobiose e a trealose o rendimento diminuiu com o aumento da concentração de 2 para 10 g/L, de $1,35 \pm 0,10$ para $0,55 \pm 0,04$, e $1,56 \pm 0,26$ para $0,86 \pm 0,23$ mmol de H_2 /mmol de substrato, respectivamente.

Em relação aos rendimentos de H_2 a partir das diferentes fontes de carbono os valores obtidos nestes ensaios preliminares estão na mesma ordem de grandeza dos citados na literatura. Nas concentrações iniciais de 2 g/L, os valores variaram entre 0,14 e 1,56 mmol de H_2 /mmol de substrato e com 10 g/L estes valores foram entre 0,13 e 1,43 mmol de H_2 /mmol de substrato. PAN *et al.* (2008), utilizaram uma cepa de *C. beijerinckii* e glicose como fonte de carbono. Os autores obtiveram rendimento de 2,52 mmol de H_2 /mmol de glicose 10 g/L, valor maior do que 1,29 mmol de H_2 /mmol de glicose encontrado neste estudo com concentração inicial de 10 g/L. Entretanto, valores menores foram obtidos quando a fontes de carbono foi xilose a 2 g/L, de 0,85 mmol de H_2 /mmol de xilose (YE *et al.*, 2011). Menor rendimento da xilose em relação a glicose também foi observado neste estudo, pois a 10 g/L o rendimento com estes substratos foram de 0,25 e 1,29 mmol de H_2 / mmol de substrato, respectivamente.

Glicose, galactose e manose foram os monossacarídeos nos quais o microrganismo apresentou maiores quantidades e rendimentos de H_2 . Em concentração inicial de 2 g/L de glicose, galactose e manose a eficiência de produção de H_2 foi de 19, 9 e 6 %,

respectivamente. Para concentrações de 10 g/L destes mesmos monossacarídeos as eficiências foram ainda maiores: 32 % para a glicose, 11 % para a galactose e 14 % para a manose. Este é um resultado interessante, por serem estes os principais monossacarídeos que compõe a biomassa de algas. Portanto, o microrganismo isolado é bastante promissor para a produção de hidrogênio a partir de hidrolisados de algas.

Comparando com os resultados da literatura, MEI *et al.* (2014), obteve concentrações de H₂ de 21,95 e 16,85 mM de H₂ utilizando 2 g/L de glicose e a galactose em ensaios de fermentação em batelada realizados com uma cepa *PROH2* pertencente ao gênero *Clostridium* isolado a 16,5 metros de profundidade na Baía de Prony (Sul da Caledônia). Neste trabalho, uma concentração maior de H₂, 36,4 mM foi obtida no ensaio com 2 g/L de glicose (Tabela 4), e uma concentração bem similar a dos autores acima mencionados, 16,8 mM, quando a galactose foi utilizada como substrato.

Os dissacarídeos forneceram concentrações de H₂ entre $12,44 \pm 0,02$ a $38,67 \pm 0,01$ mM para concentrações iniciais de 2 g/L com destaque para a sacarose, a trealose e a celobiose, com $38,67 \pm 0,01$, $37,78 \pm 0,01$ e $15,78 \pm 0,02$ mM, respectivamente. Para as concentrações de 10 g/L as concentrações de H₂ variaram entre $13,78 \pm 0,01$ e $37,11 \pm 0,04$, também com destaque para a sacarose, a trealose e a celobiose, com $36,67 \pm 0,01$, $37,11 \pm 0,04$ e $14,22 \pm 0,03$ mM, respectivamente. MEI *et al.* (2014), em ensaios de fermentação em batelada a 37 °C com concentração inicial de 10 g/L, obtiveram valores inferiores aos apresentados neste trabalho: 13,87 mM de H₂ para a sacarose, 14,16 mM de H₂ para a trealose e 4,99 mM de H₂ para a celobiose utilizando uma cepa de *Clostridium* sp.

Dentre os polissacarídeos testados, o isolado produziu, H₂ a partir do amido, mas não foi capaz de produzir H₂ utilizando celulose microcristalina (Avicel®), nas condições do ensaio. Foi observado por AN *et al.* (2014), que obtiveram 22,1 mL de H₂/ g de amido e PAN *et al.* (2008), que obtiveram 3,1 mL de H₂/g de amido e 77,9 mL de H₂/g de celulose

microcristalina (Avicel®).

A utilização dos dissacarídeos e polissacarídeos testados pelo *C. beijerinckii* Br21 indica que o microrganismo possui a capacidade de romper ligações α -glicosídicas, da trealose (α -1,1) e do amido (α -1,4), e também β -glicosídicas do dissacarídeo celobiose (β -1,4). Estas características conferem a esta cepa uma elevada versatilidade em termos de utilização de carboidratos, tornando-o bastante interessante para a produção de H₂ a partir de diferentes sacarídeos.

Além dos carboidratos, o glicerol também serviu como substrato para a produção de H₂ pela cepa isolada, assim como no estudo feito por AN *et al.* (2014), com um isolado de *C. beijerinckii* a partir de dejetos bovinos.

Portanto, o *C. beijerinckii* Br21 apresentou melhores resultados em termos de crescimento celular e produção de H₂ em ambas as concentrações iniciais (2 e 10 g/L) para a glicose, seguida da manose e da galactose em comparação aos monossacarídeos testados. Com relação aos dissacarídeos, os melhores resultados obtidos foram com a utilização da sacarose e da trealose. Para as fontes complexas testadas, a utilização do glicerol forneceu melhores resultados.

5.4 Efeito da temperatura na produção de hidrogênio pela cepa isolada

A temperatura é considerada um dos principais fatores de influência na produção de hidrogênio via fermentação, isto pois está associada com a atividade microbiana e com a solubilidade do hidrogênio na fase aquosa (FERNANDES, 2008). Embora o isolamento do microrganismo tenha sido feito a 35 °C, o sistema de tratamento no qual foi coletado o lodo, era operado a 45 °C.

Foram realizados ensaios de fermentação para a produção de H₂ com a bactéria isolada a 25, 35 e 50 °C, com glicose a 15 g/L, pH inicial 7,0 em 72 h. O crescimento da cultura e a produção de H₂ foram observadas apenas nos ensaios realizados a 35 °C. Nesta temperatura foi obtido $21,12 \pm 3,48$ mM de H₂, rendimento de $1,24 \pm 0,08$ mmol de H₂/mmol de substrato consumido e eficiência de 31 %. Este valor é pouco menor do que o encontrado por ZHAO *et al.* (2011), de 1,86 mol H₂/mol de substrato para o *C. beijerinckii* utilizando a glicose a 10 g/L, mas é promissor, uma vez que outras variáveis do ensaio ainda podem ser otimizadas.

A maior parte dos estudos sobre a influência da temperatura na produção de hidrogênio indica a faixa mesofílica (de 30 a 40 °C) como a mais adequada, na qual as bactérias podem fermentar ampla gama de substratos poliméricos complexos gerando H₂ (RAJ *et al.*, 2012).

Os ácidos orgânicos são indicadores da produção de H₂, por serem os principais metabólitos relacionados à sua produção. A produção de H₂ a partir da glicose formando apenas o ácido acético tem rendimento de 4 mol de H₂ por mol de glicose, enquanto que quando o ácido butírico é formado, 2 mols de H₂ são formados por mol de glicose, conforme mostrado pelas equações 8 e 9 citadas no item 3.4.2 da revisão bibliográfica.

O ácido lático pode ser produzido por algumas espécies de *Clostridium*, mas não participa diretamente da via metabólica da produção de H₂, ao contrário, a sua produção compete por equivalentes redutores (NOIKE *et al.*, 2002).

Ao final dos ensaios de fermentação a 35 °C para a produção de H₂ pela cepa isolada, verificou-se para os ácidos orgânicos as seguintes concentrações: ácido butírico ($11,63 \pm 0,98$ mmol/L), ácido acético ($2,32 \pm 0,31$ mmol/L) e ácido lático ($2,38 \pm 0,01$ mmol/L), após 72 h de ensaio.

KIM *et al.* (2008), estudaram a produção de H₂ por *C. beijerinckii* em diferentes

temperaturas, verificando que as maiores concentrações de ácido acético e butírico e de H₂ foram obtidas a 40 °C. No entanto, PAN *et al.* (2008), encontraram maiores concentrações de ácido acético (12,15 mmol/L), de ácido butírico (7,82 mmol/L) e maior velocidade de produção de H₂ (39,0 mL/g-glucose.h) a 35 °C, dentre as temperaturas estudadas para a produção de H₂ com uma cepa *Clostridium beijerinckii* Fanp3. Neste estudo foi observada concentração mais elevada de ácido butírico e valor inferior para o ácido acético, indicando a preferência do microrganismo pela via do ácido butírico.

5.5 Efeito do pH na produção de hidrogênio

O pH é um fator que influi fortemente no processo de produção de H₂ por afetar na ação da hidrogenase (enzima que catalisa a oxidação reversível do hidrogênio molecular) e outras enzimas envolvidas na rota metabólica do *Clostridium* (WANG e WAN, 2009). Estudos mostram que o pH ótimo em termos de produção de H₂ se encontra na faixa de 5 a 7 (KHANAL *et al.*, 2004; GINKEL e SUNG, 2001). Entretanto, a produção de H₂ já foi observada em valores de pH mais elevados. Por exemplo, nos estudos feitos por AN *et al.* (2014), verificou-se o pH 8,0 como o mais adequado para a produção de H₂ utilizando *Clostridium beijerinckii* YA001.

Neste estudo, o efeito do pH inicial do meio na produção de H₂ foi investigada na faixa entre 4,0 e 8,0 e os resultados estão apresentados na Figura 14. Foi observada uma grande influência do pH inicial no crescimento do microrganismo isolado e consequentemente na produção de H₂. De maneira geral, o rendimento de H₂ decresceu à medida que o pH inicial se afastou de 7,0. Em pH inicial 4,0 ocorreu inibição total do crescimento celular, e a partir de pH 5,0 foi observado o crescimento da cultura, assim como a produção de H₂. A maior concentração de H₂ foi observada no ensaio conduzido em pH

inicial de 7,0, 1,37 mol de H_2 /L, porém este valor diminuiu para 0,89 mol de H_2 /L, quando em pH inicial foi alterado para 8,0. Portanto, o pH inicial mais adequado para a produção de H_2 pelo microrganismo isolado foi de 7,0. Este resultado foi similar ao descrito por PAN *et al.* (2008), que relataram a faixa de pH entre 6,47 e 6,98 como ótima para a produção de H_2 por *C. beijerinckii*, utilizando a glicose como fonte de carbono. No estudo conduzido por SKONIECZNY e YARGEAOU (2009), o maior rendimento de H_2 ocorreu a um pH de 6,1 usando 3,0 g/L de glicose como substrato e a um pH de 6,3 quando a concentração de glicose foi 2,5 g/L. LIU *et al.* (2011) estudaram a produção de H_2 a partir de glicose por duas cepas de *Clostridium*, o *C. butyricum* e o *C. tyrobutyricum*, os quais apresentaram pH ótimos de produção de H_2 de 6,0 e entre 6,4-6,6, e com rendimentos de 1,77 e 1,83 mmol de H_2 /mmol glicose, respectivamente. Nos estudos feitos por AN *et al.* (2014), utilizando *C. beijerinckii* YA001 o rendimento máximo de hidrogênio de 1,86 mol de H_2 /mol de xilose foi observado em pH inicial de 8,0.

Figura 14- Concentração de glicose consumida, concentração de H_2 produzido, rendimento (Y), eficiência de produção de H_2 e concentração celular em massa seca da cultura isolada, após os ensaios de fermentação em meio contendo glicose (15,0 g/L) e diferentes valores de pH iniciais.

O pH também pode modificar o espectro de subprodutos formados durante a fermentação. TEMUDO *et al.* (2008) observaram que em pH abaixo de 6,0, os principais metabólitos formados são os ácidos butírico e acético, enquanto que em elevados valores de pH há formação de ácido acético e etanol. Isso ocorre, pois, o decaimento do pH de 7,0 para cerca de 4,5, especificamente em espécies de *Clostridium*, está relacionado a uma mudança da fase acidogênica de crescimento máximo, de produção de H_2 e ácidos orgânicos para uma fase solvetogênica com formação de etanol. Segundo LEE *et al.* (2010), o *Clostridium* tem tipicamente duas fases distintas de formação de produtos: acidogênese e solvetogênese. A acidogênese ocorre na fase de crescimento exponencial com produção de acetato e butirato e a solvetogênese, na qual o crescimento celular se torna estacionário e a célula consome

acetato e butirato para formar acetona, butanol e etanol (ABE). Assim, o *Clostridium* é capaz de alterar o seu metabolismo para qualquer destas vias. No entanto, apenas a fase acidogênica apresenta rendimentos elevados de H₂. A formação dos ácidos orgânicos, juntamente com a produção de H₂, causam uma queda no pH do meio, que se não for controlada, o pH decai para 4,5, induzindo assim a mudança para a solvetogênese e resultando na diminuição da produção de H₂ (VAZQUEZ e VARALDO, 2009).

Os metabólitos solúveis foram analisados ao final de cada ensaio com diferentes pH e o ácido butírico, o ácido acético e o ácido láctico, foram os principais metabólitos detectados (Figura 15). Em pH 4,0, onde não foi observado crescimento celular, foi detectada apenas uma baixa concentração de ácido láctico. Nos ensaios com pH iniciais de 5,0 e 6,0 foram detectados principalmente o ácido butírico, 5,09 mmol/L e 2,90 mmol/L, respectivamente, e o ácido acético com 1,12 mmol/L e 1,52 mmol/L, respectivamente.

Em pH 7,0, no qual também foi observada a maior concentração de H₂ foram detectadas as maiores concentrações de ácido butírico (12,38 mmol/L) e acético (2,49 mmol/L) comparado aos ensaios com outros pHs iniciais. Os ácidos butírico e acético são os principais metabólitos das vias de produção de H₂ por *Clostridium* sp. Contudo, o ácido butírico leva a rendimentos mais baixos de hidrogênio, 2 mol de H₂/mol de glicose (CHENG *et al.*, 2014), conforme descrito na Equação 8 (item 3.4.2). A formação do ácido butírico como principal subproduto da produção de H₂ pela cepa isolada é, provavelmente, responsável pelo rendimento de H₂ relativamente baixo, quando comparada com outros trabalhos da literatura, conforme discutido anteriormente. Porém, em muitos estudos com o *C. beijerinckii*, o ácido butírico tem sido descrito como o principal subproduto das fermentações para a produção de H₂ (AN *et al.*, 2014; NOPARAT *et al.*, 2011; RAMOS *et al.*, 2012).

Figura 15- Concentração de glicose consumida, concentração de ácidos orgânicos formados e pH ao final dos ensaios de fermentação com diferentes pH iniciais.

5.6 Efeito da concentração de glicose e galactose na produção de hidrogênio pela cultura isolada.

A concentração e o tipo de substrato normalmente desempenham um papel importante na produção de hidrogênio. Ensaios cinéticos foram realizados visando estudar a produção de H_2 pelo microrganismo isolado utilizando glicose e galactose como substrato. Estes monossacarídeos foram escolhidos, pois apresentaram os maiores rendimentos de H_2 nos ensaios preliminares (item 5.3). Além disso, estes são os principais monômeros que compõem a biomassa de algas, a qual será posteriormente estudada como substrato para a

produção de H_2 por esta cepa. Durante os ensaios cinéticos foi acompanhado, além do volume de H_2 produzido, o crescimento celular pela determinação da massa celular seca, o consumo de substrato e a variação do pH no decorrer do tempo.

5.6.1 Ensaios cinéticos de fermentação em batelada utilizando diferentes concentrações de glicose

A Figura 16 mostra o volume acumulado de H_2 em função do tempo em ensaios de fermentação em batelada contendo diferentes concentrações de glicose (pH inicial 7,0 e 35 °C). Observa-se que ocorreu um aumento no volume de hidrogênio com o aumento da concentração de glicose. Porém na concentração mais elevada estudada, 20,0 g/L, o volume de H_2 acumulado diminuiu significativamente, em relação à concentração de 15 g/L.

Figura 16- Volume de H_2 produzido em função do tempo em ensaios de fermentação em batelada com o *C. beijerinckii* Br21 com diferentes concentrações de glicose.

A partir dos resultados dos ensaios cinéticos apresentados na Figura 16 foram calculadas as velocidades máximas de produção de H_2 (R_m), o volume máximo de H_2 ($H_{máx}$) e a lag fase (λ) pelo modelo de *Gompertz* modificado, além do rendimento ($Y_{p/s}$), da massa celular seca e do pH ao final dos ensaios. Estes resultados estão resumidos na Tabela 6.

Tabela 6 - Velocidade máxima de produção de H_2 (R_m), produção máxima de H_2 , ($H_{máx}$), rendimento (Y), concentração de massa celular seca e pH final dos ensaios de fermentação em diferentes concentrações de glicose.

Concentração de glicose (g/L)	R_m (mL H_2 /h)	H_2 máx (mL)	Y (mmol H_2 /mmol substrato)	Massa celular seca (mg/L)	λ (h)	pH final
2	$15,72 \pm 1,77$	$247,79 \pm 42,78$	$1,93 \pm 0,32$	$11,14 \pm 0,10$	$24,68 \pm 0,34$	$4,53 \pm 0,01$
5	$26,51 \pm 1,84$	$447,74 \pm 25,07$	$2,29 \pm 0,10$	$13,93 \pm 1,43$	$12,33 \pm 0,73$	$4,96 \pm 0,09$
10	$52,40 \pm 9,03$	$817,39 \pm 84,05$	$2,57 \pm 0,10$	$14,82 \pm 0,28$	$11,29 \pm 1,13$	$4,17 \pm 0,09$
15	$58,27 \pm 7,72$	$1456,76 \pm 44,15$	$3,24 \pm 0,14$	$29,01 \pm 0,67$	$8,29 \pm 0,51$	$4,84 \pm 0,05$
20	$55,57 \pm 14,26$	$989,49 \pm 193,35$	$2,01 \pm 0,11$	$8,86 \pm 0,22$	$6,62 \pm 0,98$	$3,67 \pm 0,04$

Como pode ser observado na Tabela 6 a lag fase (λ) diminui com o aumento da concentração de glicose. O $H_{máx}$ aumentou até a concentração de 15 g/L de glicose, diminuindo em 20 g/L. A velocidade máxima de produção de H_2 (R_m) foi significativamente igual nos ensaios com 10, 15 e 20 g/L de glicose. Em todos os ensaios foi observada uma queda do pH, que iniciou em 7,0, para valores abaixo de 5,0, exceto na concentração mais alta de glicose, na qual a queda de pH foi ainda mais acentuada e ficou abaixo de 4,0.

Em relação aos rendimentos, valores bem elevados foram obtidos, pois variaram entre 1,93 e 3,24 mmol de H_2 /mmol de glicose consumida (Tabela 6). Os rendimentos mais elevados de H_2 foram alcançados com 10 e 15 g/L de glicose, de $2,57 \pm 0,10$ mmol de H_2 /mmol de glicose e $3,32 \pm 0,14$ mmol de H_2 /mmol de glicose, respectivamente. Com 20 g/L de glicose, o rendimento diminuiu para $2,01 \pm 0,11$ mmol de H_2 /mmol de glicose.

Comparando-se o rendimento máximo teórico de 4 mmol de H_2 /mmol de glicose consumida, o valor de 3,24 obtido para 15 g/L de glicose, representou 81 % de eficiência de conversão do substrato em produto. Valores de rendimento tão elevados quanto aos obtidos neste trabalho tem sido descrito para culturas puras, mas especialmente para espécies

termofílicas por possuírem enzimas mais estáveis. A bactéria hipertermofílica *Thermotoga neapolitana*, em ensaios em batelada operados a 77 °C e pH de 7,5, foi capaz de produzir 3,85 mol de H₂/mol de glicose, a partir de 2,5 g/L de glicose (MUNRO *et al.*, 2009).

Por outro lado, ZHU *et al.* (2008), relataram um rendimento máximo de hidrogênio de 3,8 mol de H₂/mol de glicose utilizando a bactéria *Pantoea agglomerans*, a 37 °C, com 10 g/L de glicose e pH inicial de 7,2.

Entretando, valores similares e inferiores de rendimentos foram reportados em outros estudos utilizando glicose. LIN *et al.* (2007), usando *C. beijerinckii* L9 obtiveram 2,8 mmol de H₂/mmol de glicose em concentração inicial de 10 g/L. MASSET *et al.* (2012), utilizando *C. beijerinckii* DSM1820 obtiveram 1,5 mmol de H₂/mmol de glicose. Já ZHAO *et al.* (2011) reportaram o valor de 2,0 mmol de H₂/mmol de glicose com *C. beijerinckii* RZF-1108.

Nos ensaios do efeito da temperatura (item 5.4) também foi usada a concentração de 15 g/L de glicose, e um rendimento menor do que os observados nos ensaios cinéticos foi obtido, de $1,24 \pm 0,08$ mmol de H₂/mmol de glicose. Porém, nesse ensaio, uma única determinação de H₂ e do substrato consumido foi realizada após 72 h, o que talvez possa ter levado a célula a utilizar a glicose em outras vias metabólicas, diminuindo desta forma o rendimento em H₂. Além disso, os ensaios preliminares foram realizados em frascos de penicilina de 50 mL, com um pequeno volume de *head-space*, o que pode ter inibido as enzimas envolvidas na formação do H₂ pelo aumento da pressão parcial de H₂ durante os ensaios. Já estes ensaios cinéticos foram realizados em frascos de 2 litros, contendo 600 mL de meio, o que proporcionou um aumento do *head-space* e diminuição da pressão parcial de H₂.

Como pode ser observado também na Tabela 6, a massa celular seca obtida ao final do ensaio de fermentação na concentração de 15 g/L foi mais elevada do que nas demais

concentrações. Esta concentração de glicose, dentro das condições em que os ensaios foram realizados, foi a mais adequada para a produção do H₂.

5.6.1.1 Metabólitos solúveis da produção de H₂ por fermentação utilizando diferentes concentrações de glicose

A presença de diferentes metabólitos, tais como o ácido fórmico, ácido butírico, ácido acético, ácido láctico, etanol, propanol, butanol e propionato durante a fermentação por *Clostridium sp.* tem sido relatada (KIM *et al.*, 2006; HAWKES *et al.*, 2002; FANG *et al.*, 2002).

A Figura 17 mostra as concentrações de metabólitos solúveis, os ácidos butírico, acético, láctico, fórmico e etanol obtidos no final dos ensaios utilizando a glicose como substrato.

Verificou-se que as concentrações de ácido butírico, acético e fórmico aumentaram à medida que a concentração de glicose aumentou. As concentrações de ácido butírico foram aproximadamente as mesmas, $8,15 \pm 0,33$, $7,95 \pm 0,43$ e $8,18 \pm 0,86$ mmol/L nas respectivas concentrações de 10,0, 15,0 e 20,0 g/L de glicose. No caso do ácido láctico, a concentração mais elevada de $7,65 \pm 0,01$ mmol/L foi detectada na concentração de 10,0 g/L de glicose. Em relação ao ácido acético os maiores valores foram encontrados para as concentrações de 15,0 e 20,0 g/L, de $4,35 \pm 0,33$ e $5,08 \pm 0,56$ mmol/L, respectivamente. Para o ácido fórmico, as maiores concentrações também foram encontradas a 15,0 e 20,0 g/L de glicose, $3,52 \pm 0,82$ e $4,36 \pm 0,49$ mmol/L, respectivamente.

Figura 17 - Glicose consumida e concentração dos ácidos orgânicos e etanol ao final dos ensaios de fermentação em diferentes concentrações de glicose.

PAN *et al.* (2008) utilizaram uma cepa de *C. beijerinckii* para fermentar 10/L de glicose (pH 6,5 a 35 °C). Sob estas condições, os autores obtiveram concentrações de 7,82, 12,15 e 5,63 mmol/L de ácido butírico, acético e o etanol, respectivamente. Estes valores podem ser comparados aos encontrados neste estudo utilizando a glicose (10 g/L, pH 6,5 a 35°C), que foram de 8,15 mmol/L de ácido butírico, 3,18 mmol/L de ácido acético, não sendo detectada a presença de etanol.

LIU *et al.* (2011), utilizaram uma concentração de 6,0 g/L de glicose em pH 7,0 e obtiveram 8,2 %, 13,7 %, 27,4 %, 1,5 % e 1,0 % de ácido butírico, acético, láctico, fórmico e de etanol, respectivamente. Convertendo as concentrações dos metabólitos nos ensaios com 5 g/L de glicose e pH 7, em porcentagem, 40,2, 25,4, 15,6 e 18,8 % para o ácido butírico, acético, láctico e fórmico, respectivamente. O etanol não foi detectado nos ensaios a essa concentração.

O ácido butírico foi o principal metabólito formado independentemente da concentração de glicose utilizada no ensaio.

5.6.2 Ensaio de fermentação com diferentes concentrações de galactose

O outro monossacarídeo utilizado nos ensaios cinéticos de fermentação foi a galactose, ainda não explorada como substrato para a produção de H_2 pelo *C. beijerinckii*. A galactose está presente em muitas matérias primas baratas, tais como carboidratos heterogêneos utilizados para conversão em biocombustíveis, além de ser um dos principais monossacarídeos componentes da biomassa de algas que pode ser utilizada na produção de H_2 de terceira geração. Tendo em vista que verificou-se para o isolado bom rendimento de H_2 a partir deste monossacarídeo, foram realizados ensaios cinéticos de fermentação para a produção de H_2 utilizando a galactose em diferentes concentrações.

A Figura 18 apresenta o volume acumulado de H_2 em função do tempo nos ensaios de fermentação com diferentes concentrações de galactose. Assim como nos ensaios com a glicose, para a galactose também ocorreu aumento no volume de hidrogênio produzido à medida que se aumentou a sua concentração (pH inicial 7,0 e a 35 °C).

A Figura 16 mostra que a faixa de concentração de galactose estudada, entre 1 e 20 g/L influenciou na produção de H_2 pelo *C. beijerinckii* Br21. A medida que as concentrações de galactose aumentam até 15 g/L, o volume total de H_2 aumentou. No entanto, a 20 g/L de galactose, o volume de H_2 produzido diminuiu significativamente. Há relatos na literatura de que a produção de H_2 diminui com o aumento da concentração de glicose, porém, nenhum desses estudos foram realizados com culturas puras de espécies de *Clostridium*, nem com a galactose como substrato (KIM *et al.*, 2008; SKONIECZNY *et al.*, 2009).

Figura 18- Volume de H_2 produzido em função do tempo em ensaios de fermentação em batelada com o *C. beijerinckii* Br21 com diferentes concentrações de galactose.

A Tabela 7 apresenta os parâmetros cinéticos obtidos do modelo de Gompertz modificado, bem como o rendimento ($Y_{p/s}$), a concentração de massa celular seca e o pH ao final dos ensaios.

O tempo necessário para o início da produção de H_2 , ou seja, a lag fase, aumentou com o aumento nas concentrações de galactose, o que foi atribuído à grande diferença na concentração de galactose entre o inóculo (5 g/L) e as concentrações em que os ensaios foram realizados.

Tabela 7 - Concentração de massa celular seca, velocidade máxima de produção de H_2 (R_m), produção máxima de H_2 ($H_{máx}$), rendimento (Y) e pH final em diferentes concentrações de galactose.

Concentração de galactose (g/L)	R_m (mL H_2 /h)	$H_{máx}$ (mL)	Y (mmol H_2 /mmol substrato)	Massa celular seca (mg/L)	λ (h)	pH final
1	$18,44 \pm 3,42$	$44,73 \pm 3,98$	$0,44 \pm 0,10$	$10,38 \pm 0,50$	$9,68 \pm 0,34$	$4,69 \pm 0,01$
5	$19,90 \pm 3,19$	$178,12 \pm 45,62$	$0,65 \pm 0,15$	$12,91 \pm 0,18$	$9,22 \pm 0,73$	$4,91 \pm 0,09$
10	$52,34 \pm 16,83$	$967,05 \pm 36,69$	$1,85 \pm 0,21$	$22,54 \pm 0,29$	$21,01 \pm 1,13$	$5,16 \pm 0,09$
15	$67,64 \pm 16,17$	$1202,46 \pm 10,53$	$2,10 \pm 0,01$	$22,95 \pm 0,55$	$17,22 \pm 0,51$	$5,28 \pm 0,05$
20	$12,97 \pm 4,73$	$207,42 \pm 24,68$	$0,36 \pm 0,05$	$15,08 \pm 2,05$	$11,59 \pm 0,98$	$4,79 \pm 0,04$

A massa celular seca, a velocidade máxima de produção de H_2 (R_m), a produção máxima de H_2 ($H_{máx}$), e o rendimento ($Y_{p/s}$) aumentaram com a concentração até 15,0 g/L de galactose (Tabela 7). A 20,0 g/L de galactose, todas as variáveis cinéticas diminuíram, provavelmente devido à inibição pelo substrato.

Neste estudo, os rendimentos mais elevados de H_2 foi alcançado com 10 e 15 g/L de galactose, $1,85 \pm 0,21$ mmol de H_2 /mmol de galactose e $2,1 \pm 0,01$ mmol de H_2 /mmol de galactose, respectivamente. Com 20 g/L de galactose, o rendimento diminuiu para $0,36 \pm 0,05$ mmol de H_2 /mmol de galactose.

Similarmente, a maior velocidade de produção de H_2 , $67,6 \pm 16,17$ mL de H_2 /L.h, foi obtida nos ensaios com 15 g/L de galactose, o que corresponde a cerca de 15 mL de H_2 /g de galactose/h. PAN *et al.* (2008) utilizaram uma cultura de *Clostridium* e obtiveram 7,2 mL de H_2 /g de galactose/h como velocidade máxima produção de H_2 , valor duas vezes menor que o obtido neste estudo.

Park *et al.* (2014) obtiveram velocidades máximas de produção de H_2 entre 40,3 e 116,4 mL de H_2 /g de galactose/h usando uma cultura mista enriquecida com espécies de

Clostridium. No entanto, os rendimentos obtidos por estes autores estão entre 0,8 e 1,3 mol de H₂/mol de galactose, que é muito menor do que o rendimento alcançado neste estudo, de $2,1 \pm 0,01$ mol de H₂/mol de galactose com 15 g/L de galactose. Em outro estudo, Park *et al.* (2011) utilizando uma cultura mista para investigar a produção de H₂ a partir de galactose obtiveram 2,3 mol de H₂/mol de galactose, valor semelhante ao obtido por esse estudo.

Apesar da galactose e da glicose serem ambas hexoses e, portanto, teoricamente, proporcionar a mesma quantidade de H₂ por mol de hexose (4 mol de H₂/mol de hexose), as suas absorções pela célula bacteriana é diferente. Primeiramente, a galactose deve ser convertida em glicose através da via de *Leloir*. Nesta via, a galactose é transportada para dentro da célula por meio da enzima galactose permease e transformada em glicose-1-fosfato por meio da galactoquinase, galactose-1-P uridil transferase e UDP-glicose 4-epimerase. A glicose-1-fosfato deve ser ainda transformada em glicose-6-fosfato por meio da fosfoglucomutase e utilizada como substrato para a via glicolítica.

Assim, a conversão de galactose em glicose-1-fosfato consome mais energia química do que a conversão de glicose em glicose-1-fosfato (PARK *et al.*, 2014). Por esta razão, os rendimentos de fermentação mais baixos são esperados quando galactose é usada como substrato. No entanto, o rendimento de H₂ obtido neste estudo (2,1 mol de H₂/mol de galactose) está na mesma ordem de grandeza que o rendimento de H₂ alcançado a partir de glicose utilizando culturas puras mesófilas (valores entre 1,97 e 2,81 mol de H₂/mol de glicose) (ELSHARNOUBY *et al.*, 2013).

5.6.2.1 Metabólitos solúveis da produção de H₂ por fermentação utilizando diferentes concentrações de galactose.

A Figura 19 mostra a concentração de galactose consumida e a concentração de

metabolitos solúveis detectada no final dos testes de fermentação conduzidos com diferentes concentrações de iniciais de galactose.

Figura 19 - Concentração de galactose consumida, concentração de ácidos orgânicos e etanol ao final dos ensaios de fermentação com *C. beijerinckii* Br 21 com diferentes concentrações de galactose.

Em geral, o número de metabólitos detectados aumentou com o aumento da concentração de galactose. No entanto, os ácidos butírico e acético, que são os principais metabólitos da via de fermentação de H_2 , foram detectados em altas concentrações nos ensaios de fermentação independentemente da concentração inicial de galactose. Os ácidos, acético e butírico, e o etanol foram detectados na concentração mais baixa de galactose, 1 g/L. Nos ensaios com 5 g/L de galactose, ácido fórmico e ácido láctico foram detectados, além do acético e butírico.

Interessantemente, no presente trabalho, o ácido láctico foi detectado apenas nos ensaios com 5 g/L de galactose. Em contraste, foi um dos principais metabólitos da fermentação de 3,6 g/L de galactose por *Clostridium* sp. PROH2 (MEI *et al.*, 2014).

O etanol foi detectado em 1, 10, 15 e 20 g/L representando 50, 20, 7, e 10 % da galactose consumida, respectivamente. A formação de ácido láctico e etanol está negativamente correlacionada com a produção de H₂ (MEI *et al.*, 2014).

PAN *et al.* (2008) utilizando *C. beijerinckii* para produzir H₂ a partir de glicose a 10 g/L (pH 6,5 e 35 °C), obtiveram concentrações de 7,82 mmol/L de ácido butírico, 12,15 mmol/L de ácido acético, e 5,63 mmol/L de etanol. No caso deste estudo, a fermentação de galactose a 10 g/L (pH 7,0 e 35 °C) obteve-se $8,72 \pm 0,55$ mmol/L de ácido butírico, $4,34 \pm 0,02$ mmol/L de ácido acético, e $3,42 \pm 0,02$ mmol/L de etanol, respectivamente. LIU *et al.* (2011) obteve 8,2, 13,7, 27,4, 1,5, e 1 % de ácido butírico, acético, láctico, fórmico e etanol, respectivamente, a partir de 6 g/L de glicose na fermentação para a produção de H₂ por *C. beijerinckii*. Ao converter os valores dos metabólitos obtidos na concentração inicial de 5 g/L de galactose deste estudo, tem-se 32,1, 35,6, 8,1, e 16,4 % para ácido butírico, acético, láctico e fórmico, respectivamente.

O ácido butírico representou a maior porcentagem, independentemente da concentração de galactose utilizada no ensaio. Nos ensaios com 1, 5, 10, 15, e 20 g/L de galactose, o ácido butírico representou 28,4, 34,8, 48,0, 55,2, e 49,5 % do total de galactose consumida, respectivamente. Os ensaios com maior rendimento de H₂ também apresentaram a mais alta concentração de ácido butírico.

A Tabela 8 compara diferentes estudos da literatura que utilizaram o *C. beijerinckii* para produção de H₂ sob diferentes condições. Todos os trabalhos com *C. beijerinckii* foram realizados entre 35 e 40 °C. A velocidade volumétrica de produção de H₂ a partir de galactose ($124,1 \pm 9,67$ mL de H₂/L.h) por *C. beijerinckii* Br21, neste estudo, foi similar aos valores

reportados na literatura para outros monossacarídeos e para resíduos alimentares (Tabela 8). Substratos como a glicose (10 g/L) e a xilose (10 g/L) apresentaram os maiores valores: 390 e 311,3 mL de H₂/L.h, respectivamente. No entanto, a utilização de galactose como substrato para a produção de H₂ por *C. beijerinckii* não foi relatado ainda.

Na Tabela 8 estão comparados trabalhos da literatura utilizando o *C. beijerinckii* para a produção de H₂ sob diferentes condições.

Tabela 8 - Parâmetros cinéticos da produção de H₂ por cepas de *C. beijerinckii* em ensaios de fermentação em batelada da literatura, com diferentes substratos.

Substrato	Temperatura (°C)	Y _{p/s} (mmol H ₂ /mmol substrato)	Velocidade de produção* (mL H ₂ /L.h)	Referência
Glicose	35	2,52	390	PAN <i>et al.</i> , 2008
Glicose	35	1,96	106	ZHAO <i>et al.</i> , 2011
*Resíduo				
Alimentar (DQO)	40	1,27	108	KIM <i>et al.</i> , 2008
Xilose	40	2,31	311,3	AN <i>et al.</i> , 2014
Galactose	35	2,1	124,1	Este estudo
Glicose	35	3,24	106,9	Este estudo

* calculada a partir dos dados do artigo.

PARK *et al.* (2011), investigaram a viabilidade da produção de hidrogênio a partir de algas vermelhas usando a galactose como principal monossacarídeo destas algas. O rendimento de 2,03 mol H₂/mol galactose, mas usando cultura mista de um reator anaeróbico de uma estação de tratamento de águas residuais.

Os resultados deste trabalho indicam que o *C. beijerinckii* Br21 possui um grande

potencial para produzir hidrogênio a partir de substratos contendo glicose e galactose, tais como hidrolizados de biomassa de algas.

6. CONCLUSÃO

Foi possível isolar um microrganismo produtor de H_2 a partir do lodo anaeróbio coletado de um sistema de tratamento de vinhaça, após o seu pré-tratamento ácido.

O novo isolado identificado como *Clostridium beijerinckii* é capaz de utilizar uma grande variedade de substratos, obtendo maiores produções de H_2 para a glicose seguida da manose e galactose entre os monossacarídeos testados, a sacarose e trealose entre os dissacarídeos e o glicerol entre as fontes complexas.

Dentre as condições testadas, o pH inicial de 7,0 e temperatura de 35 °C foram as melhores condições para a produção de H_2 .

O maior volume e a maior velocidade de produção de H_2 foi alcançada entre 10 a 15 g/L de glicose e de galactose em ensaios de fermentação em batelada. Apresentando inibição na concentração de 20g/L de ambos os substratos, devido a inibição pelo substrato e ao aumento na pressão parcial de H_2 .

As velocidades de produção de H_2 e os rendimentos foram comparáveis aos resultados obtidos da literatura na presença de outros monossacarídeos como substrato.

O microrganismo isolado teve rendimentos satisfatórios sendo, portanto, um excelente candidato para a produção de H_2 a partir de substratos contendo glicose e galactose, como a biomassa de algas.

7. REFERÊNCIAS

ALDERUCCI, V. Potential biomass resources of Sicily for electric-power generation. **Applied Energy**, v. 45(2): 219-240, 1993.

AMORIM, E.L.C. Desempenho de reator anaeróbio de leito fluidificado operado sob condições de aumento progressivo da carga orgânica no tratamento de fenol. **Dissertação de Mestrado - USP, São Carlos**, p. 145, 2007.

AN D, L.I.Q.; WANG, X.; YANG, H.; GUO, L. Characterization on hydrogen production performance of a newly isolated *Clostridium beijerinckii* YA001 using xylose. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39: 19928-19936, 2014.

ANDERSON, V.; VIKLUND, S.B.; HACKL, R.; KARLSSON, M.; BERNTSSON, T. Algae-based biofuel production as part of an industrial cluster. **Biomass and Bioenergy**, v. 7: 1113-1124, 2014.

APHA – AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION: **Standart Methods Examination of Water and Wastewater**, U.S.A, Washington D. C., American Water Works Association, 19 th Edition, 1995.

BAIN, R.L. Biomass Gasification Overview. **National Renewable Energy Laboratory - US DOE United State Departament of Energy**, p. 48, 2004.

BAIN, R. L.; OVEREND, R. P.; CRAIG, K. R. Uso da biomassa para produção de energia na indústria brasileira. **Gaseificação para a geração de calor e eletricidade e a produção de metanol e hidrogênio**, c. 9: 204-216, 2002.

BERGAMASCO, R.; TAVARES, C.R.G. Uso de Reator de Leito Fluidizado Trifásico no Tratamento dos Resíduos de Laticínios. **Unimar**, v. 19 (4): 1087-1097, 1997.

BUENO, F.; MENDES, I.C.; TEIXEIRA, K.R.S; REIS, V.M. Uso de ferramentas moleculares em estudos da diversidade de microrganismos do solo. **Embrapa**, documento 51, 2012.

CAPPELLETTI, B.M. Efeito da concentração inicial da água residual do processamento da mandioca na produção de biohidrogênio por *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. **Dissertação de Mestrado – UFSC, Florianópolis-SC**, p. 85, 2009.

CARVALHO, M.C.G.; SILVA, D.C.G. Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas. **Ciência Rural**, v. 40, 2010.

CHAGANTIA, S.R.; LALMANB, J.Á.; HEATH, D.D. 16S rRNA gene based analysis of the microbial diversity and hydrogen production in three mixed anaerobic cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37 (11): 9002-9017, 2012.

CHEN, C.C.; CHUANG, Y.S.; LIN, C.Y.; LAY, C.H.; SEM, B. Thermophilic dark fermentation of untreated rice straw using mixed cultures for hydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.37: 15540-15546, 2012.

CHEN, C.K.; BLASCHEK, H.P. Examination of Physiological and Molecular Factors Involved in Enhanced Solvent Production by *Clostridium beijerinckii* BA101. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65(5): 2269-2271, 1999.

CHEN, W.; CHEN, S.; KHANAL, S.K.; SUNG, S. Kinetic study of biological hydrogen production by anaerobic fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.31: 2170-2178, 2006.

CHENG, H.U.C.; GIANNIS, A.; CHEN, C.L.; WANG, J.Y. Evaluation of hydrogen producing cultures using pretreated food waste. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39: 19337-19342, 2014.

CHERNICARO, C.A.L. Biorreatores Anaeróbios - Princípios do tratamento biológico de águas residuárias. **Tese de Doutorado – UFMG, Belo Horizonte**, v. 5 (2), 1997.

COLIN, X.; FARINET, J.L.; ROJAS, O.; ALAZARD, D. Anaerobic treatment starch of cassava extraction wastewater using a horizontal flow filter with bamboo as support. **Bioresource Technology**, v. 98 (8):1602-1607, 2007.

COUTINHO, H.L.C.; OLIVEIRA, V.M.; MANFIO, G.P.; ROSADO, A.S. Evaluating the microbial diversity of soil samples: Methodological innovations. **Anais da academia Brasileira de Ciências**, v. 71: 491-503, 1999.

DA CUNHA, P.L.R.; DE PAULA, R.C.M.; FEITOSA J.P.A. Polissacarídeos da biodiversidade brasileira: uma oportunidade de transformar conhecimento em valor econômico. **Química Nova**, v. 32 (3): 649-660, 2009.

DAS, D.; VEZIROGLU, T.N. Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 26(1): 13-28, 2008.

DE SOUZA, A.C.C. Ensinando os princípios básicos da reforma a vapor para a produção de hidrogênio. **Congresso Brasileiro de Ensino de Engenharia – COBENGE**, p. 13, 2004.

DOETSCH, R.N. Determinative methods of light microscopy. Manual of methods for general bacteriology. **American Society for Microbiology**, 21–33, 1981.

DONGA, L.; ZHENHONGA, Y.; YONGMINGA, S.; XIAOYINGA, K.; YU, Z. Hydrogen production characteristics of the organic fraction of municipal solid wastes by anaerobic mixed culture fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 32 (2): 812-820, 2009.

DOS SANTOS, F.M.S.M. Células de Combustível: Uma Tecnologia para a Geração Distribuída. **Dissertação de Mestrado, Universidade de Coimbra**, p. 11, 2003.

DRAPCHO, C.M.; NHUAN, N.P.; WALKER, T.H. Biofuel Engineering Process Technology. **The McGraw Hill Companies**, p. 385, 2008.

ELSHARNOUBY, O.; HAFEZ, H.; NAKHLA, G.M.; EL NAGGAR, H.E. A critical literature review on biohydrogen production by pure cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38: 4945-4966, 2013.

EZEJI, T.; QURESHI, N.; BLASCHEK, H.P. Butanol production from agricultural residues: impact of degradation products on *Clostridium beijerinckii* growth and butanol fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 97(6): 1460–1469, 2007.

FANG, H.H.P. Environmental Anaerobic Technology: applications and new developments, **Imperial College Press: London**, 2010.

FANG, H.H.P.; LIU, H. Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture. **Bioresour Technol**, v. 82(1): 87–93, 2002.

FERNANDES, B. S. Produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fixo. **Tese de Doutorado, USP- São Carlos**, p. 116, 2008.

GINKEL, S.V.; SUNG, S. Biohydrogen production as a function of pH and substrate concentration. **Environmental Science & Technology**, v. 35, 4726-4730, 2001.

GONZALEZ-GIL, G.; KLEEREBEZEM, R.; LETTINGA, G. Assessment of metabolic properties and kinetic parameters of methanogenic sludge by on-line methane production rate measurements. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58(2): 248-254, 2002.

GUAZZARONI, M.E.; HERBST, F.A.; LORES, I.; TAMAMES, J.; PELÁEZ, A.I.; LÓPEZ-CORTÉS, N.; ALCAIDE, M.; DELPOZO, M.V.; VIEITES, J.M.; VONBERGEN, M.; GALLEGRO, J.L.; BARGIELA, R.; LÓPEZ-LÓPEZ, A.; PIEPER, D.H.; ROSSELLÓ-MÓRA, R.; SÁNCHEZ, J.; SEIFERT, J.; FERRER, M.

Metaproteogenomic insights beyond bacterial response to naphthalene exposure and bio-stimulation. **The ISME Journal**, v. 1: 122-36, 2013.

GUO, X.M.; TRABLY, E.; LATRILLE, E.; CARRÈRE, H.; STEYER, J.P. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35 : 10660, 2010.

HAFEZ, H.; NAKHLA, G.; NAGGAR, M.H.; ELBESHBISHY, E.; BAGHCHEHSARAEE, B. Effect of organic loading on a novel hydrogen bioreactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35: 81-92, 2010.

HALLENBECK, P.C. Fundamentals of the fermentative production of hydrogen. **Water Science Technologies**, v. 52 (1-2): 21-29, 2005.

HAWKES, F.R.; DINSDALE, R.; HAWKES, D.L. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 27: 1339, 2002.

HERBERT, R.A. Methods for enumerating microorganisms and determining biomass in natural environments. **Methods in microbiology: techniques in microbial ecology**, 1-40, 1990.

KAN, E. Effects of pretreatments of anaerobic sludge and culture conditions on hydrogen productivity in dark anaerobic fermentation. **Renewable Energy**, v. 49: 227-231, 2013.

KENNEDY, A.C. Bacterial diversity in agroecosystems. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 74: 65-76, 1999.

KHANAL, S.K.; CHEN, W-H.; LI, L.; SUNG, S.; Biological hydrogen production: effects of pH and intermediate products. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 29(11): 1123-1131, 2004.

KIM, J.K.; NHAT, L.; CHUN, Y.N.; KIM, A.S.W. Hydrogen Production Conditions from Food Waste by Dark Fermentation with *Clostridium beijerinckii* KCTC 1785. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 13: 499-504, 2008.

KIM, J.P.; KIM, K.R.; CHOI, S.P.; HAN, S.J.; KIM, M.S.; SIM, S.J. Repeated production of hydrogen by sulfate re-addition in sulfur deprived culture of *Chlamydomonas reinhardtii*. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37: 13387-13391, 2010.

KIRCHER, M.; KELSO, J. High-throughput DNA sequencing-concepts and limitations. **Bioessays**, v. 32: 524-536, 2010.

KONGJAN, P.; ANGELIDAKI, I. Biohydrogen production from xylose at extreme thermophilic temperatures (70°C) by mixed culture fermentation. **Water Research**, v. 43(5): 1414-1424, 2009.

KRAEMER, J.T.; BAGLEY, D.M. Improving the yield from fermentative hydrogen production. **Biotechnology Letters**, v. 29: 685-695, 2007.

LAKANIEMI, A.M.; TUOVINEN, O.H.; PUHAKKA, J.Á. Anaerobic conversion of microalgal biomass to sustainable energy carriers – A review. **Bioresource Technology**, v. 135: 222-231, 2013.

LAMAISSON, F.C. Aplicação da Água Residuária do Processamento da Mandioca como Substrato para a Produção de Hidrogênio por Processo Fermentativo. **Dissertação de Mestrado – UFSC, Florianópolis-SC**, p. 85, 2009.

LAMAISSON, F.C.; ANDRADE, P.A.M.; BIGATON, A.D.; ANDREOTE, F.D.; ANTÔNIO, R.V.; REGINATTO, V. Long-term effect of acid and heat pretreatment of sludge from a sugarcane vinasse treatment plant on the microbial community and on thermophilic biohydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 40: 14124-14133, 2015.

LAY, J.J.; FAN, K.S.; CHANG, I.J.; KU, C.H. Influence of chemical nature of organic wastes on their conversion to hydrogen by heat-shock digested sludge. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 28: 1361, 2003.

LEE, K.M.; MIN, K.; CHOI, O.; KIM, K.Y.; WOO, H.M.; KIM, Y.; HAN, S.O.; UM, Y.; LEE, P.; GUO, Y.; KIM, S.; SUNG, S. Effect of ultrasonic treatment of digestion sludge on bio-hydrogen production from sucrose by anaerobic fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35: 3450-3455, 2010.

LI, C.; FANG, H.H.P. Fermentative hydrogen production from wastewater and solid wastes by mixed cultures. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v.37: 1-39, 2007.

LI, Q.; LIU, C. Co-culture of *Clostridium thermocellum* and *Clostridium thermosaccharolyticum* for enhancing hydrogen production via thermophilic fermentation of cornstalk waste. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37 (14): 10648–10654, 2012.

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

LIN, P.Y.; WHANG, L.M.; WU, Y.R.; REN, W.J., HSIAO, C.J.; LI, S.L. Biological hydrogen production of the genus *Clostridium*: metabolic study and mathematical model simulation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 32(12): 1728–1735, 2007.

LIU, C.; WHANG, L.M.; REN, W.J.; LIN, P.Y. The effect of pH on the production of biohydrogen by *clostridia*: Thermodynamic and metabolic considerations. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36: 439-449, 2011.

MATHEWS, S.G.; WANG, G. Metabolic pathway engineering for enhanced biohydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.34: 7404, 2009.

MASSET, J.; CALUSINSKA, M.; HAMILTON, C.; HILIGSMANN, S.; JORIS, B.; WILMOTTE, A. Fermentative hydrogen production from glucose and starch using pure strains and artificial co-cultures of *Clostridium spp.* **Biotechnology Biofuels**, v. 35: 5, 2012.

MEI N.N.; ZERGANE, N.; POSTEC, A.; ERAUSO, G.; OLLIER, A.; PAYRI, C.; PELLETIER, B.; FARDEAU, M.L.; OLLIVIER, B.; QUEMENEUR, M. Fermentative hydrogen production by a new alkaliphilic *Clostridium sp.* (strain PROH2) isolated from a shallow submarine hydrothermal chimney in Prony Bay, New Caledonia. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39: 19465-19473, 2014.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31: 426-428, 1959.

MIZUNO, O. Characteristics of hydrogen production from bean curd manufacturing waste by anaerobic microflora. **Water Science Technology**, v. 42: 338-345, 2000.

MORAES, B.S.; JUNQUEIRA, T.L.; PAVANELLO, J.; CAVALETTO, O.; MANTELATTO, P.; BONOMI, A.; ZAIAT, M. Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane biorefineries in Brazil from energy, environmental, and economic perspectives: Profit or expense? **Applied Energy**, v. 113: 825–835, 2014.

MUNRO, S.A.; ZINDER, S.H.; WALKER, L.P. The fermentation stoichiometry of *Thermotoga neapolitana* and influence of temperature, oxygen, and pH on hydrogen production. **Biotechnol Progress**, v. 25: 1035–1042, 2009.

NASCIMBENI, F.A. Avaliação da produção biológica de hidrogênio em reator em batelada sob condição termófila. **Monografia, Universidade de São Paulo - São Carlos**, 2013.

NASR, N.; ELBESHBISHY, E.; HAFEZ, H.; NAKHLA, G.; EL NAGGAR M. H. Biohydrogen production from thin stillage using conventional and acclimatized anaerobic digester sludge. **Internacional Journal Hydrogen Energy**, v.36: 12761-1769, 2011.

NICODEMOS, R.M.; LIMA, A.M.; ASSIS, A.M. Produção de hidrogênio a partir da fermentação de compostos orgânicos. **Seminário de Iniciação Científica – UFU, Uberlândia**, p. 12, 2008.

NOIKE, T.; TAKABATAKE, H.; MIZUNO, O.; OHBA, M. Inhibition of hydrogen fermentation of organic wastes by lactic acid bacteria. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 27: 1367-1371, 2002.

NOPARAT, P.; PRASERTSAN, P.; O-THONG, S. Isolation and characterization of high hydrogen-producing strain *Clostridium beijerinckii* PS-3 from fermented oil palm sap. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36: 14086-14092, 2011.

NOPARAT, P.; PRASERTSAN, P.; O-THONG, S. Isolation and characterization of high hydrogen-producing strain *Clostridium beijerinckii* PS-3 from fermented oil palm sap. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36: 14086-14092, 2011.

NTAIKOU, I.; ANTONOPOULOU, G.; LYBERATOS, G. Biohydrogen Production from Biomass and Wastes via Dark Fermentation: a Review. **Waste Biomass Valorization**, v. 1: 21-39, 2010.

OKUBO, K.; HORI, N.; MATOBA, R.; NIIYAMA, T.; FUKUSHIMA, A.; KOJIMA, Y.; MATSUBARA, K. Large scale cDNA sequencing for analysis of quantitative and qualitative aspects of gene expression. **Nature Genet**, v. 2: 173–179, 1992.

O-THONGA, S.; HNIMANB, A.; PRASERTSANB, P.; IMAI, T. Biohydrogen production from cassava starch processing wastewater by thermophilic mixed cultures. **Internacional Journal of Hydrogen Energy**, v. 36 (5): 3409-3416, 2011.

PAN, C.M.; FAN, Y.T.; ZHAO, P.; HOU, H.W. Fermentative hydrogen production by the newly isolated *Clostridium beijerinckii* Fanp3. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33: 5383-5391, 2008.

PARK, A.B.J.H.; YOON, B.J.J.; PARK, A.H.D.; KIM, B.Y.J.; LIM, C.D.J.; KIM, D.S.H. Feasibility of biohydrogen production from *Gelidium amansii*. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36: 13997-14003, 2011.

PARK, J.H.; LEE, S.H.; YOON, J.J.; KIM, S.H.; PARK, H.D. Predominance of cluster I *Clostridium* in hydrogen fermentation of galactose seeded with various heat-treated anaerobic sludges. **Bioresource Technology**, v. 157: 98–106, 2014.

PATEL, S.K.S.; KUMAR, P.; MEHARIYA, S.; PUROHIT, H.J.; LEE, J.K.; KALIA, C.V. Enhancement in hydrogen production by co-cultures of *Bacillus* and *Enterobacter*. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39: 14663-14668, 2014.

PEIXOTO, G. Produção de hidrogênio em reator anaeróbico de leito fixo e fluxo ascendente a partir de água residuária de indústria de refrigerantes. **Dissertação de Mestrado – USP, São Carlos**, p. 123, 2008.

PHOWANA, P.; DANVIRUTAI, P. Hydrogen production from cassava hydrolysate by mixed seed cultures: effects of initial pH, substrate and biomass concentrations. **Biomass and Bioenergy**, v. 64: 1-10, 2014.

PICULELL, L. Gelling carrageenans. **Food polyssaccharides and their applications**, 205-244, 1995.

PIERRA, M.; TRABLY, E.; GODON, J.-J.; BERNET, N. Fermentative hydrogen production under moderate halophilic conditions. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39: 7508–7517, 2014.

QUEMENEUR, M.; HAMELIN, J.; BARAKAT, A.; STEYER, J.P.; CARRERE, H.; TRABLY, E. Inhibition of fermentative hydrogen production by lignocellulose-derived

compounds in mixed cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**, v 37(4): 3150-3159, 2012.

RAMOS, C.; BUITRO'N, G.; ANDRADE, I.M.; CHAMY, R. Effect of the initial total solids concentration and initial pH on the bio-hydrogen production from cafeteria food waste. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37: 13288-13295, 2012.

RAN, C.Q.; ZHANG, F.J.; SUN, H.J.; ZHAO, B.D. Effect of culture medium on hydrogen production by sulfur-deprived marine green algae *Platymonas subcordiformis*. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 14: 835-841, 2009.

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

REGINATTO, V.; ANTÔNIO, R. Fermentative hydrogen production from agroindustrial lignocellulosic substrates. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46 (2): 323-335, 2015.

REN, N.Q.; WANG, A.J.; CAO, G.L.; XU, J.F.; GAO, L.F. Bioconversion of lignocellulosic biomass to hydrogen: potential and challenges. **Biotechnology Advances**, v. 27(6): 1051-1060, 2009.

RIBEIRO, C.G.; PARIZZI, J.B. Produção de hidrogênio via eletrólise da água, gaseificação do carvão e reforma a vapor do gás natural. **Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**, v. 3(2), 2011.

SA, L.R.V.; CAMMAROTA, M.C.; FERREIRA-LEITAO, V.S. Produção de hidrogênio via fermentação anaeróbia – aspectos gerais e possibilidade de utilização de resíduos agroindustriais brasileiros. **Química Nova**, v. 37(5), 2014.

SA, L.R.V.; OLIVEIRA, T.C.; SANTOS, T.F.; MATOS, A.; CAMMAROTA, M.C.; OLIVEIRA, E.M.M.; FERREIRA-LEITÃO, V.S.; **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36: 7543, 2011.

SAIKI, R.K.; SCARF, F.; FALOONA, F.A.; MULLIS, K.B.; HORN, G.T.; ERLICH, H.Á.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of B-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v. 230: 1350-1354, 1985.

SALERNO, M.B.; PARK, W.; ZUO, Y.; LOGAN, B.E. Inhibition of biohydrogen production by ammonia. **Water Research**, v. 40: 1167–1172, 2006.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, p. 999, 1989.

SAMBROOK, J.W.; RUSSEL, D. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 2001.

SAMBUSITI, C.; BELLUCCI, M.; ZABANIOTOU, A.; BENEDUCE, L.; MONLAU, F. Algae as promising feedstocks for fermentative biohydrogen production according to a biorefinery approach: a comprehensive review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 44: 20–36, 2015.

SARAPHIROMA, P.; REUNGSANG, A. Biological hydrogen production from sweet sorghum syrup by mixed cultures using an anaerobic sequencing batch reactor (ASBR). **International Journal of Hydrogen Energy**. V. 36 (14): 8765-8773, 2011.

SARIPANA, A.F.; REUNGSANG, A. Simultaneous saccharification and fermentation of cellulose for bio-hydrogen production by anaerobic mixed cultures in elephant dung. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39 (17): 9028-9035, 2014.

SEELERT, T.; GHOSH, D.; YARGEAU, V. Improving biohydrogen production using *Clostridium beijerinckii* immobilized with magnetite nanoparticles. **Applied Microbiol Biotechnol**, v. 99: 4107–4116, 2015.

SEM, B.; SUTTAR, R.R. Mesophilic fermentative hydrogen production from sago starch-processing wastewater using enriched mixed cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37 (20): 15588-15597, 2012.

SHANMUGAMA, S.R.; CHAGANTIB, S.R.; LALMANA, J.Á.; HEATH, D. Using a statistical approach to model hydrogen production from a steam exploded com stalk hydrolysate fed mixed anaerobic cultures in na ASBR. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 29: 10003-10015, 2014.

SHIN, H.S.; YOUN, J.H.; KIM, S.H.; Hydrogen production from food waste in a philic acidogenesis. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 29 (10): 1355-1363, 2004.

SINGH, L.; WAHID, Z.A. Methods for enhancing bio-hydrogen production from biological process: A review. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 25: 70-80, 2015.

SINHA, P.; PANDEY, A. An evaluative report and challenges for fermentative biohydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36: 7460–7478, 2011.

SIQUEIRA, M.R. Efeito dos produtos de hidrolise de materiais lignocelulósicos sobre a produção de H₂ por fermentação. **Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo – FFCLRP, Ribeirão Preto**. 59 p., 2015.

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

STAHL, D.A. Molecular approaches for the measurement of density, diversity, and phylogeny. **Manual of environmental microbiology**, 102-114, 1997.

STERKY, F.; LUNDEBERG, J. Sequence analysis of genes and genomes. **Journal of Biotechnology**, v. 76: 1-31, 2000.

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

TEMUDO, M.; MUYZER, G.; KLEEREBEZEM, R.; VAN LOODRECHT, M. Diversity of microbial communities in open mixed culture fermentations: impact of the pH and carbon source. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 80, 1121-1130, 2008.

TIEN ANH, N.; TRA HUONG, N.; HA THI VIET, B. Thermophilic fermentative hydrogen production from xylose by *Thermotoga neapolitana* DSM 4359. **Renewable Energy**, v.37: 174–179, 2012.

VAZQUEZ V.I., VARALDO P.H.M. Hydrogen production by fermentative consortia. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 13: 1000-1013, 2009.

VIJAYARAGHAVAN, K.; AHMAD, D.; Biohydrogen generation from palm oil mill effluent using anaerobic contact filter. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 31 (10): 1284-1291, 2006.

VRIJE, T.; MARS, A.E.; BUDDE, M.A.W.; LAI, M.H.; DIJKEMA, C.; DE WAARD, P.; CLAASSEN, P.A.M. Glycolytic pathway and hydrogen yield studies of the extreme thermophile *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74: 1358–1367, 2007.

WANG, J.; WAN, W. Kinetic models for fermentative hydrogen production: A review. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34: 3313-3323, 2009.

WANG, J.; WAN, W. Kinetic models for fermentative hydrogen production: A review. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34: 3313-3323, 2009.

WEBER, M. I. Estudo da eficiência da remoção de matéria orgânica e produção de biogás em reator anaeróbio de leito fluidizado para o tratamento de efluentes de indústrias de refrigerantes. **Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Paraná, Curitiba**, p.200, 2006.

WEI, N.; QUARTERMAN, J.; JIN, Y.-S. Marine macroalgae: an untapped resource

WIEGEL, J.; TANNER, R.; RAINEY, F.A. Prokaryotes. **New York Springer**, v. 3: 654-678, 2006.

XIA, A.; CHENG, J.; DING, L.; LIN, R.; SONG, W.; SU, H.; ZHOU, J.; CEN, K. Substrate consumption and hydrogen production via co-fermentation of monomers derived from carbohydrates and proteins in biomass wastes. **Applied Energy**, v. 139, 9–16, 2015.

YE, X.; MORGENROTH, E.; ZHANG, X.; FINNERAN, K.T. Anthrahydroquinone-2,6,-disulfonate (AH₂QDS) increases hydrogen molar yield and xylose utilization in growing cultures of *Clostridium beijerinckii*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 92: 855–864, 2011.

YOSSAN, S.; O-THONG, S.; PRASERTSAN, P. Effect of initial pH, nutrients and temperature on hydrogen production from palm oil mill effluent using thermotolerant consortia and corresponding microbial communities. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37: 13806-13814, 2012.

ZHAO, X.; XING, D.; FU, N.; LIU B, REN N. Hydrogen production by the newly isolated *Clostridium beijerinckii* RZF-1108. **Bioresource Technology**, v.102: 8432–8436, 2011.

ZHU, D.; WANG, G.; QIAO, H.; CAI, J. Fermentative hydrogen production by the new marine *Pantoea agglomerans* isolated from the mangrove sludge. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33: 6116-6123, 2008.

ZHU, L.; JIN, H.; GAO, K.; XU, X. Succession of microbial community and enhanced mechanism of a ZVI-based anaerobic granular sludge process treating chloronitrobenzenes wastewater. **Journal of Hazardous Materials**, v. 285 (21): 157-166, 2015.