



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE
ALIMENTOS**

Raquel Aparecida Loss

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO POR
CONSÓRCIO BACTERIANO FOTOHETEROTRÓFICO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos

Área de concentração: Desenvolvimento de Tecnologias Limpas.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Regina Vasconcellos Antônio

Co-Orientador: Prof^ª Dr^ª Valéria Reginatto

Florianópolis/SC

2011

“Avaliação Da Produção De Hidrogênio por Consórcio Bacteriano Fotoheterotrófico”

Por

Raquel Aparecida Loss

Dissertação julgada para obtenção do Título de **Mestre em Engenharia de Alimentos**, área de Concentração de Desenvolvimento de Tecnologias Limpas, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

Prof^a Dr^a Regina Vasconcellos Antônio
Orientadora

Prof^a Dr^a Alcilene Rodrigues Monteiro Fritz
Coordenadora

Banca Examinadora:

Prof^a Dr^a Regina Vasconcellos Antônio

Dr^a Maria Luiza Schmitz Fontes

Prof^a Dr^a Edna Regina Amante

Prof Dr Willibaldo Schmidell Netto

“No meio da dificuldade encontra-se a oportunidade.”

Albert Einstein (1879-1955)

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida e proteção.

A professora Regina Vasconcellos Antônio pela dedicação, paciência, estímulo, orientação, amizade.

A professora Valéria Reginatto Spiller pela valiosa co-orientação.

Aos professores do Programa de Pós-graduação, que contribuíram para a minha formação.

A minha família por estar presente em todos os momentos da minha vida: meu pai Renato e Terezinha, meu irmão Eduardo, minha cunhada Elisângela e meu avô Otávio.

Aos meus tios Maria Augusta e Moacir e meus primos Gabriel e Eduardo, por ter me acolhido no convívio de seu lar.

Aos meus grandes amigos, irmãos e irmãs do coração que acompanharam minha trajetória durante muitos anos e sempre me fortaleceram com seu carinho e amizade: Júlia, Alessandra, Isolda, Evandro, João e Luciano.

Aos meus afilhados Ana Carolina e Gabriel pelo carinho espontâneo e reconfortante.

Ao pessoal do LBBMM: Karina, Franciele, Léo, Claudimir e Diego pela convivência pacífica e ajuda durante a execução deste projeto.

A pós-doutoranda Maria Luiza Fontes pela ajuda nas análises de biologia molecular.

Aos amigos Marieli, Ana Carolina, Joanna, Silvia, Renata, Karina, Luís Fernando e Luís Carlos pela amizade, pelos momentos de desabafo e descontração, e pela confiança que depositaram em mim.

Aos professores Hugo Soares, Edmundo Grisard, Danilo Wilhelm Filho, Anicleto Poli, Mara Bedin e Carla Tasca pelo empréstimo de reagentes e equipamentos.

A secretária do curso de pós-graduação em Engenharia de Alimentos, Raquel Agostinetti e professora Alcilene Fritz pela atenção e ajuda nos assuntos burocráticos.

Aos membros da banca pela contribuição na melhoria deste trabalho.

A banca examinadora pelas sugestões que contribuíram para a melhoria deste trabalho.

A CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

RESUMO

As necessidades de energia global são, na sua maioria, dependentes de combustíveis fósseis. O gás hidrogênio (H_2) é uma energia limpa alternativa a esses combustíveis. A produção biológica de H_2 é considerada uma tecnologia promissora devido aos baixos impactos ambientais e possibilidade de utilização de resíduos orgânicos como substrato. As bactérias fotoheterotróficas produzem H_2 a partir de ácidos orgânicos por meio de processo anaeróbio dependente de luz. Desta forma, o objetivo deste estudo foi a obtenção de um consórcio bacteriano fotoheterotrófico, isolado a partir de sedimento proveniente da Lagoa da Conceição, localizada na cidade de Florianópolis/SC. Para avaliar a produção de H_2 pelo consórcio utilizou-se diferentes ácidos orgânicos como substrato. O meio de cultivo utilizado foi o meio RCV modificado, contendo glutamato de sódio (2 mmol/L) como fonte de nitrogênio e a fonte de carbono variou conforme o substrato empregado: ácido acético (30 mmol/L), ácido butírico (15 mmol/L) e ácido málico (15 mmol/L). Os ensaios foram conduzidos em tubos de ensaio contendo 10 mL do meio de cultivo e 2 mL de *head space*. Após a inoculação, gás argônio foi borbulhado para obtenção da atmosfera anaeróbia e os tubos foram incubados em estufa a 30 °C sob iluminação constante de lâmpada fluorescente de 15 W (~7000 lux) por um período que variou de 7 a 11 dias, conforme os experimentos. A composição do gás produzido no *head space* foi analisada a cada 24 h por cromatografia gasosa. O consórcio bacteriano fotoheterotrófico demonstrou potencial para consumir todos os ácidos orgânicos testados como substratos, tanto para o crescimento bacteriano quanto para a produção de H_2 , sendo que a produção do gás foi máxima quando ácido acético foi empregado como substrato, onde a produção alcançou uma concentração máxima de 7,28 mmol/L. Para o ácido butírico a produção máxima foi de 6,97 mmol/L.. Assim, foi possível concluir que o consórcio fotoheterotrófico enriquecido, foi capaz de utilizar os ácidos orgânicos, nas condições de estudo, para a produção de H_2 .

Palavras-chave: Hidrogênio. Bactérias fotoheterotróficas. Ácidos orgânicos.

ABSTRACT

The global energy requirements are mostly dependent on fossil fuels. Hydrogen is a clean energy alternative to these fuels. Biological H₂ production is generally considered a promising process due to both its low impact on the environment and the possibility to use organic wastes as substrate for the gas production. Phototrophic bacteria produce H₂ from organic compounds by an anaerobic light-dependent process. Therefore, this study aimed obtaining a photoheterotrophic consortium, isolated from Lagoa da Conceição lake sediment, located in the city of Florianópolis/SC. H₂ production was evaluated by the consortium, used different organic acids as substrate. The culture medium used was RCV modified, and the nitrogen source was the same for all experiments (sodium glutamate - 2 mmol/L) and carbon source varied according to the substrate used: acetic acid (30 mmol/L), butyric acid (15 mmol/L) and malic acid (15 mmol/L). The experiments were conducted in the glass bottles containing 10 mL of culture medium and 2 mL of head space. After inoculation, argon gas was bubbled to obtain anaerobic atmosphere and the bottles were incubated at 30 °C under constant illumination of fluorescent lamp 15 W (~7000 lux) for a period of time ranging from 7 to 11 days, according the experiments. The gas produced in the head space was evaluated every 24 h by gas chromatography. The photoheterotrophic consortium demonstrated the potential to consume all the organic acids tested as substrates, for both: bacterial growth and H₂ production, and the gas production was enhanced when the substrate used was acetic acid, where production reached a concentration of 7.28 mmol/L. For butyric acid production was 6.97 mmol/L. Thus, we conclude that the enriched was able to use organic acids for H₂ production, in the studies conditions.

Keywords: Hydrogen. Photoheterotrophic bactérias. Organic acids.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema de biofotólise direta.....	31
Figura 2 - Esquema de um sistema acoplado de digestão anaeróbia/foto fermentação.	34
Figura 3 - Metabolismo fotoheterotrófico das bactérias púrpuras não-sulfurosas.	43
Figura 4 - Primeiro sistema de fotobiorreatores para a produção de H ₂ : (1 - Fotobiorreator; 2 - Frasco com NaOH; 3 - Frasco de segurança (vazio); 4 - Frasco coletor de NaOH 5 %; 5 - Suporte para lâmpadas).	55
Figura 5 - Representação do segundo sistema de fotobiorreatores para a produção de H ₂ : (1 - Fotobiorreator; 2 - Frasco de segurança (vazio); 3 - Frasco com (Ba(OH) ₂); 4 - Coluna de água).	56
Figura 6 - Sistema utilizado nos ensaios de produção de H ₂	57
Figura 7 - Coluna de Winogradski - Figura menor apresenta a coluna inteira e a figura maior destaca a região da qual foi coletado o consórcio fotoheterotrófico.	64
Figura 8 - Consórcio bacteriano fotoheterotrófico enriquecido.	64
Figura 9 - Espectro de absorção dos pigmentos presentes no consórcio fototrófico.	65
Figura 10 - Fragmentos de DNA amplificados por PCR.....	68
Figura 11 - Bandas de DNA separadas por DGGE, em gel de acrilamida.	68
Figura 12 - Crescimento da biomassa do consórcio fotoheterotrófico empregando ácido málico como substrato nos ensaios de preparação do inóculo.....	71
Figura 13 - Produção de biomassa e de H ₂ pela cultura de referência em função do tempo de cultivo, empregando ácido málico como substrato carbônico.....	72
Figura 14 - Produção de biomassa e de H ₂ pelo consórcio bacteriano fotoheterotrófico em função do tempo de cultivo, na presença de ácido acético como substrato carbônico.....	76
Figura 15 - Produção de biomassa e de H ₂ pelo consórcio fotoheterotrófico em função do tempo de cultivo, empregando ácido butírico como substrato carbônico.	77

Figura 16 - Produção de biomassa e de H ₂ pelo consórcio fotoheterotrófico em função do tempo de cultivo, empregando ácido málico como substrato carbônico.....	78
Figura 17 - Produção de biomassa e de H ₂ pelo consórcio fotoheterotrófico em função do tempo de cultivo empregando o ácido acético como substrato carbônico.....	80
Figura 18 - Produção de biomassa e de H ₂ pelo consórcio fotoheterotrófico em função do tempo de cultivo empregando o ácido butírico como substrato carbônico.....	82
Figura 19 - Comportamento do pH durante a produção de H ₂ empregando os ácidos acético e butírico como substrato carbônico.....	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Poder calorífico de diferentes combustíveis.....	29
Tabela 2 - Diferentes vias metabólicas das bactérias púrpuras não-sulfurosas.....	37
Tabela 3 - Enzimas utilizadas na produção biológica de H ₂	38
Tabela 4 - Composição meio de cultura RCVM utilizado na etapa de enriquecimento.	48
Tabela 5 - Composição da solução de micronutrientes.	48
Tabela 6 - Fontes de carbono empregadas nos ensaios de produção de H ₂	49
Tabela 7 - Iniciadores e suas sequências.	52
Tabela 8 - Condições empregadas na PCR.	53
Tabela 9 - Soluções desnaturantes para DGGE.....	54
Tabela 10 - Equações estequiométricas para a fotofermentação, dos ácidos orgânicos empregados como substratos na produção de H ₂	62
Tabela 11 - Produção de H ₂ , rendimento (R) e eficiência de conversão empregando os ácidos acético e butírico como substrato.....	83

NOMENCLATURAS

APS - perssulfato de amônio
ATP - adenosina trifosfato
BSA - albumina de soro bovino
CAT - ciclo dos ácidos tricarbóxicos
CNTP - condições normais de temperatura e pressão
CT - cultura de trabalho
CO₂ - dióxido de carbono
CO - monóxido de carbono
CR - centro de reação
DGGE - eletroforese em gel de gradiente desnaturante
dNTPs - deoxirribonucleotídeos tri-fosfatados
Fd - ferredoxina
NAD - nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADHdh - nicotinamida adenina dinucleotídeo desidrogenase
nm – nanômetros
NH₄⁺ - íon amônio
PCR - reação em cadeia da polimerase
EF - eficiência fotoquímica
PNS - púrpura não sulfurosa
PS - fotossistema
PHB - poli-hidroxibutirato
qx - velocidade média de produção de biomassa
qp - velocidade média de produção de H₂
rpm – rotação por minuto
SDH - succinato desidrogenase
TEMED - tetrametiletilenodiamina
UQ - ubiquinona
UTO - unidades taxonômicas operacionais
μx - velocidade específica de produção de biomassa
μp - velocidade específica de produção de H₂

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 OBJETIVOS	25
2.1 OBJETIVO GERAL	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	27
3.1 ENERGIAS RENOVÁVEIS NO BRASIL	27
3.2 HIDROGÊNIO COMO FONTE DE ENERGIA	27
3.3 PROCESSOS BIOLÓGICOS DE PRODUÇÃO DE H ₂	30
3.3.1 Biofotólise direta da água.....	30
3.3.2 Fotofermentação	31
3.3.3 Digestão anaeróbia ou fermentação não dependente de luz	32
3.3.4 Processo acoplado digestão anaeróbia/fotofermentação (processo híbrido)	33
3.4 MICRO-ORGANISMOS USADOS NA PRODUÇÃO BIOLÓGICA DE H ₂	36
3.5 ENZIMAS ENVOLVIDAS NA PRODUÇÃO BIOLÓGICA DE H ₂	38
3.6 METABOLISMO FOTOHETEROTRÓFICO DE BACTÉRIAS (PNS)	41
3.7 IDENTIFICAÇÃO DE COMUNIDADE BACTERIANA POR ELETROFORESE EM GEL DE GRADIENTE DESNATURANTE (DGGE).....	44
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	47
4.1 MICRO-ORGANISMOS	47
4.2 MEIOS DE CULTIVO	47
4.2.1 Meio de cultivo para seleção e enriquecimento	47

4.2.2 Meios de cultivo utilizados nos estudos de avaliação de produção de H₂	49
4.3 PREPARO DA COLUNA DE WINOGRADSKI PARA A OBTENÇÃO DO CONSÓRCIO BACTERIANO FOTOHETEROTRÓFICO	49
4.4 ENRIQUECIMENTO DA BIOMASSA DO CONSÓRCIO BACTERIANO FOTOHETEROTRÓFICO	50
4.5 CARACTERIZAÇÃO DO CONSÓRCIO BACTERIANO FOTOHETEROTRÓFICO	51
4.5.1 Análise dos pigmentos produzidos pelo consórcio bacteriano fotoheterotrófico	51
4.5.2 Metodologias moleculares empregadas na caracterização do consórcio	51
4.6 FOTOBIOREACTORES EM BATELADA UTILIZADOS NO ESTUDO.....	55
4.6.1 Fotobiorreator 1	55
4.6.2 Fotobiorreator 2	56
4.6.3 Fotobiorreator 3	57
4.7 ENSAIOS PARA A PRODUÇÃO DE H ₂	57
4.7.1 Preparo do inóculo	57
4.7.2 Ensaios realizados no estudo da produção de H₂ pelos consórcios fotoheterotróficos	58
4.8 DETERMINAÇÃO DE BIOMASSA DO CONSÓRCIO FOTOHETEROTRÓFICO	59
4.9 COMPOSIÇÃO DO GÁS PRODUZIDO	59
4.10 DETERMINAÇÃO DO VOLUME DE H ₂ PRODUZIDO	59
4.11 DETERMINAÇÃO DE GRANDEZAS CINÉTICAS	60
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
5.1 OBTENÇÃO DO CONSÓRCIO BACTERIANO FOTOTRÓFICO.....	63
5.2 CARACTERIZAÇÃO DO CONSÓRCIO BACTERIANO FOTOTRÓFICO.....	65
5.2.1 Análise dos pigmentos do consórcio bacteriano fototrófico	65

5.2.2 Caracterização molecular das espécies presentes no consórcio fototrófico	67
5.3 PRODUÇÃO DE H ₂ - ESCOLHA DO FOTOBIOREATOR..	69
5.4 PREPARO DO INÓCULO	70
5.5 ENSAIOS DE PRODUÇÃO DE H ₂	71
5.5.1 Estudos preliminares de produção de H₂utilizando o consórcio obtido neste estudo.....	75
5.5.2 Ensaios ampliados de crescimento e produção de H₂ utilizando o consórcio obtido neste estudo.....	80
6 CONCLUSÕES	89
7 REFERÊNCIAS	91

1 INTRODUÇÃO

A energia é um elemento fundamental nas interações entre meio ambiente e sociedade, sendo considerada essencial para o desenvolvimento econômico sustentável. Tendo em vista o crescimento da demanda de energia, a redução dos recursos de energia convencionais (derivados de petróleo) e a alta nos preços do petróleo, a aplicação de fontes renováveis de energia tornou-se imperativo. Outro aspecto que deve ser considerado é a poluição do meio ambiente causada pelo uso de fontes convencionais de energia, através da emissão de gases poluentes (HALLENBECK, 2009; JAIN, 2009; KALINCI et al., 2009). A busca de alternativas que visem a sustentabilidade é vista pela maioria dos países como o caminho para a libertação da dependência econômica do petróleo e, conseqüentemente, ao fim da submissão ao aumento progressivo do preço do barril de petróleo (TAVARES, 2009).

Dentro deste contexto, a necessidade de dar início a uma economia baseada em fontes de energia sustentáveis, torna-se cada vez maior para a evolução econômica e ambiental do planeta. A economia baseada no H_2 pode oferecer estabilidade energética, econômica e benefícios ambientais e, se produzido a partir resíduos orgânicos, deixará o Brasil em sintonia com as iniciativas internacionais para redução das emissões atmosféricas e diminuição da dependência dos combustíveis fósseis (MARTIN e GRASMAM, 2009).

Na última década o H_2 tem atraído interesse mundial como uma fonte de energia alternativa. Isto tem gerado diversas pesquisas sobre as tecnologias envolvidas, bem como diferentes tentativas para resolver os problemas de produção, armazenamento e transporte de H_2 (JAIN, 2009). A Academia Nacional de Ciência dos Estados Unidos identificou alguns fatores que mais afetam o custo final do H_2 como combustível, sendo os de maior destaque: (1) matéria prima; (2) alto custo da infraestrutura da planta de produção e cuidados no transporte; (3) nível de preparação tecnológica (MARTIN e GRASMAM, 2009).

Atualmente o H_2 é produzido por processos físico-químicos e eletroquímicos, tais como reforma a vapor de gás natural e eletrólise da água, respectivamente. Estes processos são dispendiosos e, por isso, não são sustentáveis. Entretanto, o H_2 também pode ser produzido através de processos biológicos, sendo estes considerados promissores devido aos baixos impactos ambientais e possibilidade de utilização de resíduos

orgânicos como substrato para a produção de H_2 (BIANCHI et al., 2010). Além disso, a produção biológica de H_2 vem ganhando destaque desde do início da década de noventa, quando se tornou evidente que a poluição atmosférica por combustíveis fósseis não era somente insalubre pontualmente, mas poderia causar significativas alterações climáticas em nível mundial (KOTAY e DAS, 2008). Os principais processos biológicos empregados na produção de H_2 são a digestão anaeróbia ou fermentação não dependente de luz e a fotofermentação, sendo que as duas abordagens têm suas vantagens e desvantagens desafiando limitações técnicas para suas aplicações práticas (HALLENBECK, 2009).

Na digestão anaeróbia, usando carboidratos ou águas residuárias como substrato, os principais produtos formados são o H_2 e ácidos orgânicos. No entanto, o principal impedimento do processo de digestão anaeróbia está no baixo rendimento de H_2 (máximo teórico 4 mol de H_2 /mol de glicose), e portanto não é economicamente viável na sua forma atual (NATH e DAS, 2009).

A fotofermentação pode ser usada como uma alternativa para aumentar o rendimento da produção de H_2 obtido na fermentação não dependente de luz, uma vez que neste processo, os ácidos orgânicos produzidos na fermentação podem ser usados como substrato para a produção de H_2 pelas bactérias fotoheterotróficas, em uma etapa subsequente, em um fotobiorreator. O uso integrado dos dois processos de fermentação pode produzir um máximo teórico de 12 mol de H_2 /mol de glicose (SU et al., 2009; NATH e DAS, 2009). A fotofermentação apresenta-se vantajosa devido aos maiores rendimentos de conversão de substrato em H_2 , sua capacidade de usar um amplo espectro de luz, e a sua versatilidade no uso substratos. Este processo também pode ser impulsionado pelo uso da energia solar (GADHAMSHETTY et al., 2008).

As bactérias fotoheterotróficas púrpura não-sulfurosas podem produzir H_2 sob condições anaeróbias, na presença de luz e em ambientes com limitação de fonte de nitrogênio. A eficiência de conversão da energia luminosa em H_2 , na presença de um substrato adequado e um ótimo crescimento celular, são fatores chaves para a viabilidade econômica da fotofermentação (GADHAMSHETTY et al., 2008). Desta forma o presente trabalho buscou selecionar, a partir de uma amostra de sedimento de uma lagoa, um consórcio bacteriano fotoheterotrófico capaz da produção de H_2 .

O consórcio obtido foi aplicado no estudo do seu potencial para produção de hidrogênio, em condições fotoheterotróficas, utilizando

como substratos os ácidos málico, acético e butírico. Os dois últimos ácidos são potenciais sub-produtos da fermentação não dependente de luz ou digestão anaeróbia da matéria orgânica.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Selecionar e avaliar o potencial de produção de H₂ de um consórcio de bactérias fotoheterotróficas, obtido da Lagoa da Conceição, localizada na cidade de Florianópolis/SC.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Selecionar um consórcio de bactérias fotoheterotróficas a partir de sedimento da Lagoa da Conceição, localizada na cidade de Florianópolis/SC, a partir do estabelecimento de microambiente apropriado, em uma coluna de Winogradiski.

Caracterizar os principais pigmentos fotoativos produzidos pelo consórcio por espectrofotometria UV/visível.

Caracterizar a microbiota selecionada pela metodologia PCR/DGGE.

Avaliar o comportamento cinético de produção de H₂ e de crescimento celular usando ácido málico, acético e butírico, como substrato.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ENERGIAS RENOVÁVEIS NO BRASIL

Desde o início do século XX, o planeta tem sofrido com a exploração de seus recursos naturais e com o aumento da poluição atmosférica. O petróleo, por exemplo, considerado uma fonte tradicional de energia, tem sido tão continuamente extraído que seus poços já começam a se esgotar, pouco menos de 100 anos após o início de sua utilização. O carvão mineral também é considerado esgotável. O uso das fontes tradicionais vem traçando sua trajetória ao declínio, não só pelo seu esgotamento, mas também porque constituem uma ameaça ao meio ambiente (PLANETA ORGANICO, 2010).

As consequências ao meio ambiente provocadas pelo intenso uso de combustíveis fósseis na geração de energia são evidentes. Os gases gerados na combustão destes combustíveis são umas das principais causas do aquecimento global e da chuva ácida, os quais afetam o clima do planeta, a vegetação e o ecossistema aquático. Em decorrência disto, existe um grande interesse no desenvolvimento de fontes de energia renováveis e menos agressivas ao meio ambiente (KHANAL et al., 2004).

As fontes alternativas de energia ganham cada vez mais destaque, pois além de não causar danos à natureza, elas são renováveis. Exemplos de fontes renováveis incluem a energia solar, energia eólica, energia hídrica e a biomassa. O Brasil possui uma matriz energética de aproximadamente 45 % de energia renovável e deve elevar esse patamar a quase 47 %, conforme previsão do Plano Nacional de Energia para 2030. No resto do mundo esse percentual é da ordem de 14 %. O país dispõe de uma matriz diversificada, devido às alternativas que possui para produzir combustíveis de natureza fóssil e renovável, constituindo um ambiente favorável para introdução gradual do H₂ (BRASIL, 2010).

3.2 HIDROGÊNIO COMO FONTE DE ENERGIA

Ao contrário dos combustíveis derivados de petróleo, o H₂ é uma fonte de energia limpa (livre de poluição), uma vez que durante o processo de combustão libera apenas água, em vez dos CO e CO₂

emitidos pela queima dos combustíveis fósseis. Os combustíveis fósseis serão cada vez mais escassos, e uma vez que não são fontes renováveis podem deixar de existir ao passo que o H_2 pode ser obtido a partir de matérias-primas renováveis (obtidas de fontes naturais). O H_2 é considerado por diversos autores como o combustível do futuro, porém um dos maiores problemas na utilização do H_2 em larga escala é a sua indisponibilidade da forma pura na natureza (CHEONG e HANSEN, 2007; HUDSON et al., 2009; ARGUN e KARGI, 2010).

O átomo de hidrogênio (H) é o elemento mais simples e abundante no universo, representando cerca de três quartos de toda a matéria. A atmosfera contém aproximadamente de 0,07 % de H_2 , enquanto que a superfície terrestre contém cerca de 0,14 %. O gás H_2 é mais leve que o ar, como resultado ele sobe para a atmosfera (a massa de 1 L de H_2 é 0,09 g enquanto que a massa de 1 L de ar é 1,2 g). É por isto que o H_2 como gás não é encontrado livre na atmosfera, ele está sempre associado a outros elementos e para ser obtido puro é necessário gastar energia na dissociação de uma fonte primária. Sendo assim, ele não é considerado uma fonte de energia e sim um vetor energético (DAS e VEZIROGLU, 2001; KALINCI et al., 2009; ONCEL e SUKAN, 2009). Para ser usado como energia ele deve estar na forma de gás (H_2).

Existem várias razões para o uso de H_2 como uma fonte de energia alternativa. O H_2 não é tóxico e nem corrosivo, o vazamento durante o seu transporte não causaria uma catástrofe ambiental, como pode-se observar quando ocorrem vazamentos em navios petroleiros ou em plataformas de extração de petróleo, devido ao fato do H_2 ter um elevado coeficiente de difusão, ou seja, pode se dispersar rapidamente pelo ar e raramente ocorre a sua explosão ao ar livre. Em resumo, a utilização de H_2 não provoca danos ao meio ambiente (GOMES NETO, 2005; JAIN, 2009).

O H_2 tem a mais alta energia por unidade de massa quando comparado com qualquer combustível, uma vez que é o elemento mais leve e não tem os átomos do carbono. A energia liberada durante a reação do H_2 é aproximadamente 2,75 vezes o poder de combustão de um hidrocarboneto, conforme mostra a Tabela 1 (MU et al., 2006; SANTOS e SANTOS, 2007; SREETHAWONG et al., 2010).

Tabela 1 - Poder calorífico de diferentes combustíveis.

Combustível	Poder calorífico superior a 25°C e 1 atm (kJ/g)	Poder calorífico inferior 25°C e 1 atm (kJ/g)
Hidrogênio	141,86	119,93
Metano	55,53	50,02
Propano	50,36	45,6
Gasolina	47,5	44,5
Gasóleo	44,8	42,5
Metanol	19,96	18,05

Fonte: Santos e Santos (2007).

A produção mundial de H_2 é de cinquenta milhões de toneladas, com taxa de crescimento de quase 10 % por ano. Baseados nas estimativas do programa nacional de H_2 dos Estados Unidos, a contribuição do mesmo para o mercado total de energia poderá ser de 8 a 10 % para o ano 2025 (ARGUN et al., 2008; OZTEKIN et al., 2008; SEIFERT et al., 2010).

Atualmente 95 % da produção de H_2 produzido a partir do gás natural, em um processo denominado reforma a vapor do gás natural. A gaseificação do carvão e a eletrólise da água são outros métodos industriais de produção de H_2 . No entanto, estas tecnologias convencionais requerem o consumo imediato ou indireto de combustíveis fósseis, resultando em emissão de dióxido de carbono (CO_2). Além disso, estes processos são energeticamente dispendiosos, e por isto não são sustentáveis (ANDRADE, 2007; ARGUN e KARGI, 2010)

Os processos biológicos podem produzir H_2 usando resíduos orgânicos como substratos e operando em temperatura e pressão atmosférica, o que os tornam muito mais atraentes do ponto de vista ambiental (MANISH e BANERJEE, 2008). Porém, a produção biológica de H_2 é muito pequena, representando apenas 1 % da produção total, devido aos baixos rendimentos de produção de gás. No entanto, espera-se que esta apresente um crescimento exponencial, a partir da inovação e desenvolvimento de novas técnicas e processos (NEVES, 2009).

3.3 PROCESSOS BIOLÓGICOS DE PRODUÇÃO DE H₂

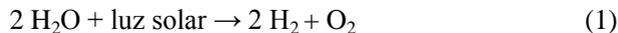
A produção biológica de H₂ por bactérias começou a ser estudada no final de 1920 e segue até os dias atuais (ONCE e SUKAN, 2009). Uma das vantagens deste processo sobre os processos convencionais é a capacidade dos micro-organismos em selecionar o seu substrato, mesmo quando este se encontra em uma mistura de outros compostos. Assim, não há necessidade de isolar e purificar o substrato limitante do processo, o que se traduz em um maior espectro de compostos a utilizar, havendo menor necessidade de tratamentos químicos (NEVES, 2009). Outra vantagem é a utilização de temperaturas e pressões de operação similares à temperatura e pressão atmosféricas, tornando-se um processo com balanço energético favorável (MANISH e BANERJEE, 2008).

O uso de substratos de baixo custo, como águas residuárias com quantidades consideráveis de fração orgânica biodegradável faz com que a produção biológica de H₂ seja um processo sustentável, visto que essas águas são abundantes e seu tratamento é obrigatório (BABU et al., 2009).

Os principais processos biológicos são: a) biofotólise da água, realizada por algas e cianobactérias; b) fotofermentação, realizada por bactérias fotoheterotróficas e c) fermentação, realizada por bactérias fermentativas (BASAK e DAS, 2007; SRIKANTH et al., 2009).

3.3.1 Biofotólise direta da água

Segundo Hallenbeck e Benemann (2002), a produção de H₂ por biofotólise direta da água é realizada por microalgas (procarioto fotossintetizante). Durante a fotossíntese oxigênica microalgas utilizam a energia luminosa para quebrar a molécula de água, com produção de H₂ e O₂, conforme a Equação 1.



Dois sistemas fotossintéticos são responsáveis pelo processo de fotossíntese: (i) o fotossistema I (PSI), produzindo poder redutor para a conversão do CO₂ em matéria orgânica e (ii) do fotossistema II (PSII) o qual quebra a molécula de água, com liberação de O₂. No processo biofotólise, dois elétrons retirados da água podem levar à redução de CO₂ no PSI ou à formação de H₂, por ação da hidrogenase. Nas plantas, devido à falta de hidrogenase, apenas a redução do CO₂ ocorre. Por outro lado, microalgas, tais como algas verdes e cianobactérias (algas

azul-verdes), contêm hidrogenase e, portanto, têm a capacidade de produzir H_2 (DAS e VEZIROGLU, 2001; HALLENBECK e BENEMANN, 2002).

Neste processo, os elétrons gerados no PSII são transferidos para a ferredoxina (Fd). A hidrogenase aceita os elétrons da Fd reduzindo prótons a H_2 , como mostrado na Figura 1. Uma vez que a hidrogenase é sensível ao O_2 , é necessário manter a concentração de O_2 em um nível inferior a 0,1 %, para que a produção de H_2 possa ser sustentada (HALLENBECK e BENEMANN, 2002). A biofotólise pode ser considerada economicamente viável e sustentável uma vez que utiliza a água como substrato e pode levar ao consumo de CO_2 , dado que este é um dos mais abundantes poluentes atmosféricos. Contudo, este processo apresenta algumas limitações como inibição da enzima hidrogenase, em presença do O_2 e o fato de não utilizar resíduos como substrato (SRIKANTH et al., 2009).

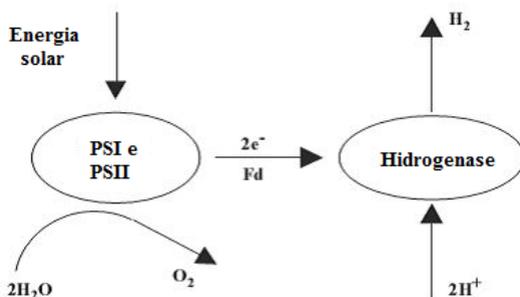


Figura 1 - Esquema de biofotólise direta

Fonte: Hallenbeck e Benemamm, (2002).

3.3.2 Fotofermentação

O processo de fotofermentação é conhecido a quase sessenta anos, e nos últimos anos tem sido proposto como uma alternativa para aumentar o rendimento global do processo biológico de produção de H_2 . Na digestão anaeróbia de açúcares, o ácido acético é um dos produtos finais. A fotofermentação pode ser utilizada como uma segunda etapa em um processo de dois estágios, através do qual o substrato orgânico é convertido em H_2 e de CO_2 (SRIKANTH et al., 2009).

Os micro-organismos empregados nos processo de foto fermentação são as bactérias fotoheterotróficas púrpuras não-sulfurosas (PNS). Estas bactérias produzem H_2 em um processo catalisado pela enzima nitrogenase, sob limitação de nitrogênio, utilizando energia luminosa e compostos reduzidos (ácidos orgânicos) (SEIFERT et al., 2010). A quantidade de H_2 produzido depende do balanço entre a atividade das enzimas nitrogenase e hidrogenase (MATHEWS e WANG, 2009).

A produção de H_2 via fotofermentação apresenta como principal vantagem o fato das bactérias PNS apresentarem elevados rendimentos teóricos de conversão de substrato em H_2 , não produzirem O_2 , que é inibidor da nitrogenase, possuir a capacidade de utilizar amplo espectro luminoso para obtenção de energia e utilizarem vários substratos orgânicos, tanto para o crescimento quanto para a produção de H_2 (MATHEWS e WANG, 2009).

A fotofermentação apresenta como desvantagens a elevada quantidade de adenosina trifosfato (ATP) requerida pela nitrogenase, os custos relacionados à manutenção dos fotobiorreatores e a baixa eficiência dos fotossistemas das bactérias fotoheterotróficas. Embora este processo seja relativamente simples e barato, ainda carece de estudos para a otimização da tecnologia, uma vez que os rendimentos alcançados são insatisfatórios para torná-la competitiva com os métodos tradicionais (MANISH; BANERJEE, 2008).

3.3.3 Digestão anaeróbia ou fermentação não dependente de luz

A produção de H_2 por digestão anaeróbia ou fermentação ocorre porque alguns organismos heterotróficos, anaeróbios facultativos, crescendo sob condições anaeróbias, são capazes da oxidação de compostos orgânicos, dos quais retiram elétrons, transferindo-os para coenzimas oxidadas. Segundo Lehninger et al. (2000) a medida que este processo metabólico ocorre, as coenzimas oxidadas vão se esgotando. Sendo assim, estas células dever dar um destino a estes elétrons sob pena de ter suas reações metabólicas de produção de energia cessadas. Muitos destes organismos são capazes de desviar o excesso de elétrons para a produção de H_2 , através da atividade de hidrogenases.

Os organismos degradam moléculas energéticas como forma de obter energia livre, a qual é transformada em ATP, que é o principal transportador de energia química em todas as células. A produção de H_2 é usada para manter o balanço de elétrons, no qual os prótons atuam

como receptor de elétrons e os equivalentes redutores atuam como doadores de elétrons (DAS e VERIROGLU, 2001).

Na fermentação não dependente de luz, a produção de H_2 é acompanhada pela produção de ácidos orgânicos. E uma vez que as bactérias utilizadas neste processo não são capazes de usar estes ácidos orgânicos como substrato, o acúmulo dos mesmos causam queda no pH, inibindo a continuidade da produção de H_2 . Assim, o efluente resultante do processo de digestão anaeróbia pode ser utilizado como substrato na fotofermentação (BASAK e DAS, 2007; SRIKANTH et al., 2009).

A produção de H_2 por fermentação não dependente de luz não exige a presença de luz, a taxa de produção é constante, diversas fontes de carbono podem ser utilizadas como substrato, o crescimento dos micro-organismos fermentativos é rápido, menor energia é necessária e o processo é tecnicamente mais simples quando comparado com os processos dependentes de luz. A dificuldade deste processo está em selecionar culturas de micro-organismos que não contenham nenhum tipo de bactéria consumidora de H_2 , tais como bactérias metanogênicas ou sulforedutoras (VARDAR-SCHARA et al., 2008).

3.3.4 Processo acoplado digestão anaeróbia/fotofermentação (processo híbrido)

O processo híbrido é um processo que combina os processos de fermentação e fotofermentação, de modo de otimizar a produção de H_2 . A combinação de bactérias fotoheterotróficas e fermentativas pode ser usada para a produção de H_2 a partir de carboidratos. Nestes sistemas as bactérias fermentativas, usando resíduos orgânicos como substrato, produzem H_2 e compostos intermediários, como os ácidos orgânicos. Estes ácidos podem ser convertidos, a H_2 pelas bactérias fotoheterotróficas, em processo subsequente, na presença de luz, sob condições de anaerobiose e alta relação C/N. Devido às dificuldades em manter as melhores condições para ambos os metabolismos em um único reator, os sistemas híbridos normalmente são constituídos de um sistema de duas fases: um biorreator anaeróbio que abastece um fotobiorreator com os subprodutos finais da digestão anaeróbia, conforme mostra a Figura 2 (REDWOOD et al., 2005; KAPDAN e KARGI, 2006; REDWOOD e MACASKIE, 2006, UYAR et al., 2009).

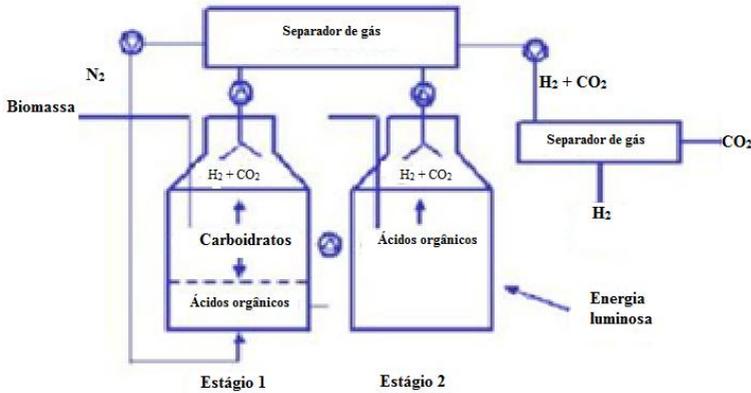


Figura 2 - Esquema de um sistema acoplado de digestão anaeróbia/foto fermentação.

Fonte: Adaptado de REDWOOD et al. (2005).

Açúcares simples, como glicose, sacarose e lactose são prontamente biodegradáveis e preferenciais para a produção de H_2 em sistemas híbridos. Entretanto, essas fontes de carboidrato são matérias-primas caras. Assim, o uso de resíduos sólidos ricos em carboidratos, como amido e celulose, e águas residuárias biodegradáveis e não tóxicas, como os provenientes de indústrias de laticínios, azeitonas, cervejarias, manipueira podem ser usadas como substratos pelas bactérias para a produção de H_2 nesse tipo de sistema (KAPDAN e KARGI, 2006; REDWOOD e MACASKIE, 2006).

Na digestão anaeróbia o rendimento de produção de H_2 é limitado, devido à produção de intermediários como ácidos orgânico e álcoois. As bactérias PNS são capazes de utilizar estes produtos intermediários da digestão anaeróbia como substratos para a produção de H_2 . A utilização de ambos os processos, resulta em rendimentos de produção de H_2 superiores aos alcançados, se fossem utilizados cada um dos processos separadamente (SUN et al., 2010).

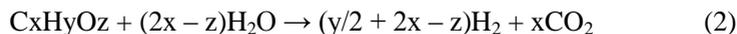
Redwood et al. (2005) estudaram a produção de H_2 em um processo de dois estágios: digestão anaeróbia com *Escherichia coli* HD701, usando glicose como substrato, e fotofermentação usando *Rhodobacter sphaeroides* O.U. 001, sendo que o meio residual da digestão anaeróbia foi usado como substrato. A velocidade de produção de H_2 foi de 124 mL H_2 /L.d. Os resultados encontrados pelos autores mostraram ser possível a utilização de sistemas híbridos para o

tratamento de águas residuárias ricas em açúcares simples como a glicose.

Su et al. (2009) estudaram a produção de H₂ usando um sistema integrado, associando digestão anaeróbia e fotofermentação. Em um primeiro estágio, utilizando *Clostridium butyricum* e glicose como substrato, obteve-se um rendimento de 1,59 mol de H₂/mol de glicose. Em um segundo estágio, o efluente resultante da digestão anaeróbia, contendo principalmente os ácidos acético e butírico, foi inoculado com *Rhodospseudomonas palustris* e reutilizado para a produção de H₂ na fotofermentação, obtendo-se um rendimento de 4,16 mol H₂/mol glicose.

Em um estudo realizado por Liu et al. (2010) *Clostridium butyricum* e *Rhodospseudomonas faecalis* DLD-53 foram empregados para produzir H₂ usando glicose como substrato. O ácido acético e ácido butírico produzido por *C. butyricum* foram os produtos predominantes no final da digestão anaeróbia, e eles mostraram-se substratos eficazes para o processo fotofermentativo. O máximo de produção de H₂ obtido foi 122,4 mL H₂ e a velocidade de produção foi de 0,5 mL/mL.d.

Segundo Andrade (2007) dois critérios são frequentemente usados para avaliar o desempenho da produção biológica de H₂ a partir de um substrato específico. O primeiro refere-se à velocidade de produção de H₂ (quantidade/tempo) com base na concentração de biomassa ou peso seco bacteriano. O segundo refere-se à eficiência de conversão do substrato, ou seja, quanto foi utilizado para produção de H₂ e não para crescimento ou biossíntese. Este último é a razão entre moles reais de H₂ produzidos pela quantidade teórica que teria sido obtida se todo o substrato fosse utilizado para produção de H₂ e CO₂, de acordo com a reação hipotética, descrita pela Equação 2.



Manish e Banerjee (2008) compararam quatro diferentes métodos biológicos de produção de H₂ (digestão anaeróbia, fotofermentação, processo híbridos e eletrólise biocatalisada), com o método de reforma de vapor de metano, em função da quantidade de energia produzida, eficiência energética e emissão de gases de efeito estufa. Os autores verificaram que os processos biológicos são viáveis, quando analisados sob o aspecto da quantidade de energia líquida produzida e da redução da emissão de gases de efeito estufa.

3.4 MICRO-ORGANISMOS USADOS NA PRODUÇÃO BIOLÓGICA DE H₂

Diferentes grupos de micro-organismos, como as microalgas (cianobactérias e algas verdes) bactérias fotoheterotróficas anoxigênicas, e bactérias fermentativas têm sido utilizados na produção biológica de H₂ (KOKU et al., 2002). As microalgas (cianobactérias e algas verdes) são capazes de produzir H₂ através de processos de fotossíntese oxigênica (biofotólise), empregando água como substrato. Porém, nestes sistemas, as enzimas sofrem inibição pelo O₂ produzido durante a fotossíntese, resultando em uma menor produtividade de H₂ (BASAK e DAS, 2007).

As microalgas (algas verdes e cianobactérias) são capazes de produzir H₂, após um período no escuro em condições anaeróbias, durante o qual a hidrogenase é ativada e sintetizada. Neste período de adaptação pequenas quantidades de H₂ são observadas. Quando estas culturas adaptadas, são expostas a luz e em condições anaeróbias, observa-se um aumento na produção de H₂, porém, esta produção é interrompida quanto a fotossíntese é reestabelecida (DAS e VEZIROGLU, 2001).

As bactérias PNS são capazes de produzir H₂ sob iluminação (energia solar ou artificial), sob atmosfera anaeróbia, usando compostos reduzidos como substrato (ácidos orgânicos). O meio de cultivo deve estar sob limitação da fonte de nitrogênio, o que possibilita as bactérias usar o excesso de energia e poder redutor para a produção de H₂ (KOKU et al., 2002).

Estas bactérias constituem um grupo não taxonômico de micro-organismos versáteis que podem crescer como fotoheterotróficos, fotoautotróficos ou quimioheterotróficos, sendo que a escolha de um tipo de metabolismo ou outro depende das condições ambientais, tais como: grau de anaerobiose, disponibilidade da fonte de carbono e luz (BASAK e DAS, 2007). Os representantes fotoheterotróficos produtores de H₂ mais conhecidos são *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodospseudomonas sphaeroides*, *Rhodospirillum rubrum* (DAS e VEZIROGLU, 2001; KOKU et al., 2002).

Embora apresente ampla versatilidade metabólica, a produção de H₂ nas bactérias PNS só ocorre através do metabolismo fotoheterotrófico. Assim, o ajuste das condições de cultivo deverá a favorecer o metabolismo fotoheterotrófico. No entanto, em alguns casos, é possível ocorrer mudanças que favoreçam outras vias metabólicas e este fato deve ser levado em consideração na interpretação dos

resultados experimentais (KOKU et al., 2002). A Tabela 2 apresenta as diferentes vias metabólicas realizadas por bactérias PNS.

Tabela 2 - Diferentes vias metabólicas das bactérias púrpuras não-sulfurosas.

Modo de crescimento	Fonte de carbono	Fonte de energia	Observações
Fotoheterotrófico	Carbono orgânico	Luz	Via metabólica preferida das bactérias PNS, única que resulta em produção de H ₂
Fotoautotrófico	Carbono inorgânico	Luz	Ausência de carbono orgânico. Resulta em consumo de H ₂
Respiração aeróbia	Carbono orgânico	Carbono orgânico	Aerobiose, interrompe a produção de H ₂
Respiração anaeróbia	Carbono orgânico	Carbono orgânico	Anaerobiose, sob baixa disponibilidade de luz
Fermentação	Carbono orgânico	Carbono orgânico	Anaerobiose e na ausência de luz

Fonte: Adaptado de Basak e Das (2007).

As bactérias fermentativas podem produzir H₂ e ácidos graxos através da oxidação de compostos orgânicos, em um processo não dependente de luz (ZHANG et al., 2002; BASAK e DAS, 2007). Dentre as bactérias fermentativas produtoras de H₂, destacam-se *Enterobacter aerogenes*, *E. cloacae*, *Clostridium butyricum*, *C. pasteurianum*, *Desulfovibrio vulgaris*, *Magashaera elsdenii*, *Citrobacter intermedius*, *Escherichia coli* (HAWKES et al., 2002). Além das culturas puras, várias microfloras mistas têm sido exploradas para a produção de H₂ por fermentação não dependente de luz (DAS e VEZIROGLU, 2001; LEVIN et al., 2004).

A grande maioria dos estudos envolvendo a produção de H₂ utilizam culturas puras, porém, é impraticável o uso de cultura pura no tratamento de águas residuárias, e a literatura empregando cultura mista na produção biológica de H₂ é muito escassa (FANG et al., 2005).

3.5 ENZIMAS ENVOLVIDAS NA PRODUÇÃO BIOLÓGICA DE H₂

Os processos biológicos de produção de H₂ são dependentes da presença e/ou atividade das enzimas relacionadas a produção de H₂. Atualmente são conhecidas três enzimas capazes de atuar na produção de H₂ através de processos biológicos: nitrogenase, Fe-hidrogenase e NiFe-hidrogenase. As hidrogenases são utilizadas nos processos de biofotólise e fermentação, não dependente de luz (digestão anaeróbia), enquanto que a nitrogenase é utilizada na fotofermentação, dependente de luz (MANISH e BANERJEE, 2008). A Tabela 3 apresenta as diferentes enzimas utilizadas nos processos biológicos de H₂, bem como a os micro-organismos e doadores de elétrons usados em cada processo.

Tabela 3 - Enzimas utilizadas na produção biológica de H₂.

Enzima	Micro-organismo	Gênero	Doador de elétrons
Hidrogenase	Algas verdes	<i>Chlamydomonas</i>	Água
		<i>Chlorella</i>	Água
	Cianobactérias	<i>Anabaena</i>	Água
		<i>Oscillatoria</i>	Água
Nitrogenase	Bactérias fotoheterotróficas	<i>Rhodobacter</i>	Ácidos orgânicos
		<i>Rhodospseudomonas</i>	Ácidos orgânicos
		<i>Rhodospirillum</i>	Ácidos orgânicos
		<i>Chromatium</i>	Sulfeto
		<i>Thiocapsa</i>	Sulfeto
Hidrogenase	Anaeróbia	<i>Clostridium</i>	Açúcar
	Anaeróbia facultativa	Metanogênicas	Açúcar
		<i>Escherichia</i>	Açúcar
		<i>Enterobacter</i>	Açúcar
Nitrogenase	Aeróbio facultativo	<i>Azotobacter</i>	Açúcar
	Anaeróbio facultativo	<i>klebsiella</i>	Açúcar

Fonte: Adaptado de Basak e Das (2007).

Nas algas verdes e cianobactérias a hidrogenase combina os prótons (H^+) com os elétrons para formar e liberar o H_2 . No entanto, estes micro-organismos realizam fotossíntese oxigênica, sendo que o O_2 é um poderoso inibidor da Fe-hidrogenase, enzima que catalisa o processo de liberação de H_2 . A inativação da enzima ocorre pela reação do O_2 com o ferro localizado no centro catalítico da enzima (DAS e VERIZOGLU, 2001).

Nas bactérias fermentativas o H_2 é produzido pela ação das hidrogenases como uma alternativa para eliminar o excesso de elétrons gerados durante a degradação dos substratos orgânicos. Nestes processos o controle do pH é crucial devido ao seu efeito na atividade da hidrogenase (DARBROCK et al., 1992), nas vias metabólicas e nos microrganismos (LAY, 2000). Se o pH ficar muito baixo, as bactérias irão tentar reduzir a concentração de íon hidrogênio (H^+) e não irão produzir H_2 .

A produção de H_2 em bactérias fotoheterotróficas anoxigênicas é catalisada pela nitrogenase (KOKU et al., 2002). O H_2 é produzido como um subproduto do sistema nitrogenase, que é normalmente utilizado na fixação de nitrogênio molecular (N_2) como amônia (Equação 3). Na ausência de N_2 a amônia não é formada, porém a produção de H_2 continua como mostra a Equação 4. Devido ao alto custo metabólico da síntese e da atividade da nitrogenase, essas são muito bem reguladas pela disponibilidade de oxigênio e nitrogênio presente na célula (REDWOOD et al., 2005).



A eficiência da atividade da nitrogenase requer quantidade elevada de ATP e de poder redutor. O oxigênio atua como um inibidor na atividade desta enzima, causando uma destruição irreversível em sua estrutura. Os sais de amônio, bastante utilizados como fonte de nitrogênio nos meios de cultivo de bactérias também causam inibição na síntese e na atividade da nitrogenase. Porém, neste caso a inibição é reversível. Uma vez que os sais sejam consumidos ou removidos, a nitrogenase recupera sua atividade (KOKU et al., 2002).

O íon amônio (NH_4^+) inibe a síntese de nitrogenase, porque promove a formação de glutamina sintetase, responsável pela assimilação de NH_4^+ , inibindo desta forma a formação de H_2 . Devido a estes inibidores, o cultivo de bactérias PNS, visando a produção de

hidrogênio é realizado em condições anaeróbias, livres de N_2 e sob condições limitantes de nitrogênio (ZHENG et al., 2010).

Segundo Koku et al. (2002) concentrações de amônio presentes no meio de cultivo, tão baixas quanto 20 $\mu\text{mol/L}$, inibiram rapidamente a atividade da nitrogenase em culturas de *Rhodobacter sphaeroides*. Waligórska et al. (2009) estudaram o efeitos de íons NH_4^+ na produção de H_2 por *Rhodobacter sphaeroides* e observaram que o aumento na concentração de 1 para 5 mmol/L de NH_4^+ resultou em um declínio na produção de H_2 , sendo que não foi observado produção do gás quando a concentração de NH_4^+ foi de 10 mmol/L .

Segundo Koku et al. (2002) o efeito inibidor sobre a nitrogenase ocorre mesmo quando na fonte de nitrogênio não é amônio. Foi observado que células de *Rhodobacter capsulatus* crescidas em lactato e glutamato tiveram problemas relacionados à inibição da enzima nitrogenase quando a fonte de carbono foi consumida antes da fonte de nitrogênio, culminando na produção de amônia. Tal fato, explica a recomendação de vários autores para o emprego de altas relações C/N (maiores que 1) durante o cultivo de tais bactérias visando a produção de H_2 , condição esta que evita que a fonte de carbono seja consumida antes do nitrogênio.

A presença de amônia no meio de cultivo usado para crescimento inibe a expressão de genes envolvidos na fixação de N_2 . Por esta razão, o glutamato de sódio é amplamente utilizado como fonte de nitrogênio em meios de cultivo empregados na produção de H_2 . Porém, a concentração de glutamato precisa ser baixa para evitar a formação de amônia (GOLOMYSOVA et al., 2010).

Quando a nitrogenase é inibida, a atividade do ciclo do ácido tricarbóxico (CAT) fica limitada, ocorrendo metabolismo alternativo como, por exemplo, aquele que leva a formação de polissacarídeos e/ou biopolímeros como o poli- β -hidroxibutirato (PHB). Após o esgotamento da fonte de carbono, estes materiais de reserva podem ser degradados e utilizados para a produção de H_2 . (KOKU et al., 2003; GOLOMYSOVA et al., 2010).

Koku et al. (2003) investigaram a produção de H_2 por *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001, usando ácido málico como fonte de carbono. Eles observaram que após 93 h de fermentação, mesmo com a concentração da fonte de carbono praticamente esgotada, a produção de H_2 prosseguiu mais ou menos na mesma velocidade por algum tempo. Este fato pode ser explicado pelo metabolismo endógeno das bactérias, que foi observado por Gest et al. (1962).

As nitrogenases possuem molibdênio em sua composição, e a disponibilidade deste nutriente pode ser crítica para a atividade da enzima. Porém, estas bactérias também são capazes de sintetizar nitrogenases alternativas, como por exemplo, aquelas contendo ferro no lugar de molibdênio, tornando-as tolerantes à deficiência de molibdênio (KOKU et al., 2002).

As hidrogenases, por sua vez, são inibidas por monóxido de carbono (CO) e também por oxigênio, contudo, apresentam maior tolerância ao último em relação às nitrogenases. Além disso, como algumas possuem níquel em sua composição, a limitação deste elemento no meio de cultivo causa a redução da biossíntese desta enzima (FISSLER et al., 1994).

As hidrogenases das bactérias fotoheterotróficas são descritas como tendo metabolismo antagônico as nitrogenases. Tentativas para conseguir organismos mutantes, que não tenham capacidade de sintetizar estas enzimas, tem sido numerosas e resultam em maior produção de H₂. Oshima et al. (1998) estudaram mutantes de *Rhodobacter capsulatus* ST410, e observaram que a produção de H₂ foi mais significativa para esses micro-organismos do que para os micro-organismos selvagens (B100), apresentando eficiência de conversão de 68 % em relação aos 25 % dos selvagens.

Para que a produção do gás seja otimizada, há necessidade de se conhecer as preferências nutricionais da cultura fotoheterotrófica que realiza o processo, bem como estabelecer a relação entre as fontes de carbono e nitrogênio na composição do meio de cultivo, para que não ocorra a fixação de nitrogênio ao invés da produção de H₂ (KOKU et al., 2002).

3.6 METABOLISMO FOTOHETEROTRÓFICO DE BACTÉRIAS (PNS)

As bactérias PNS apresentam capacidade de absorver energia luminosa (fótons) e convertê-la como energia química. O aparato fotossintético das bactérias PNS consiste em apenas um fotossistema (PS), fixado na membrana intracelular, onde a energia luminosa é absorvida pelos pigmentos presentes no fotossistema (carotenóides e bacterioclorofilas). Ao contrário do fotossistema presente nas algas, não apresenta capacidade de usar água como doador de elétrons (AKKERMAN et al., 2002). Desta forma eles necessitam extrair elétrons de substratos alternativos (BABU et al., 2009). O fotossistema é formado por um “complexo de antenas” de dezenas a centenas de

moléculas de pigmentos que absorvem a luz em um centro de reação, que consiste em uma molécula fortemente especializada (P_{680}) que converte a energia luminosa em energia química (AKKERMAN et al., 2002).

A luz é absorvida pelos pigmentos antena, que transferem energia para os pigmentos seguintes. Esta transferência de energia faz com que o centro de reação entre em um estado de excitação, e esta energia é usada para transferir um elétron de um composto (doador) para outro composto (aceptor). A energia química é armazenada pelas células para satisfazer as suas exigências metabólicas, porém esta capacidade das células pode ser explorada para a produção de energia (AKKERMAN et al., 2002).

A síntese do aparato fotossintético é regulada pelo O_2 , pois a biossíntese dos pigmentos (bacterioclorofilas) é reversivelmente interrompida na presença desse gás, recomeçando na ausência do mesmo (KOKU et al., 2002; MADIGAN et al., 2004). A luz é outro fator que pode controlar essa síntese, entretanto, seu efeito não é tão forte como o do oxigênio. Sob condições anaeróbias, o número de vesículas fotossintéticas varia inversamente com a incidência luminosa. A síntese não é totalmente interrompida na ausência de luz, contudo, o cultivo contínuo nessa condição pode cessar a síntese das bacterioclorofilas (MADIGAN et al., 2004).

A Figura 3 apresenta uma visão geral do metabolismo fotoheterotrófico das bactérias PNS. Nesta figura é representado o metabolismo de uma bactéria PNS da espécie *Rhodobacter*, porém devido as semelhanças nos processos metabólicos relacionados com a produção de H_2 , o modelo é facilmente aplicável a outras bactérias PNS. As linhas tracejadas representam o fluxo de prótons, as linhas pretas representam o fluxo metabólico para a multiplicação celular e as setas cinza representam o fluxo metabólico para a produção de H_2 .

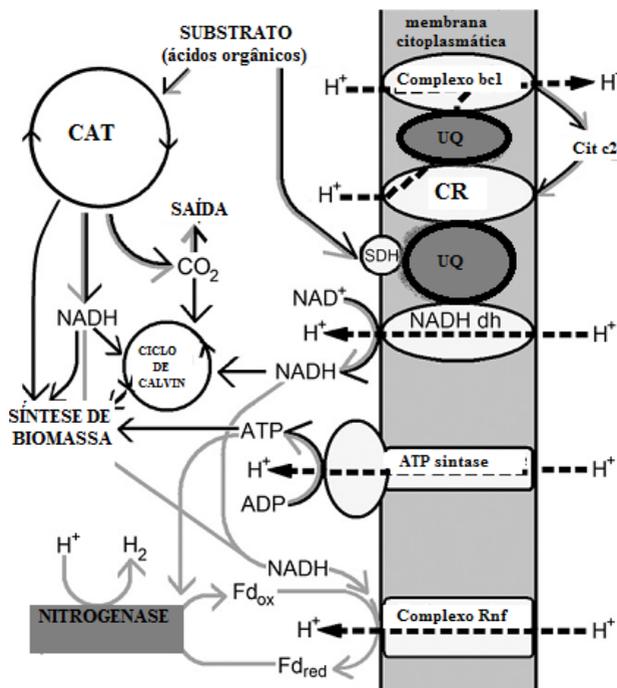


Figura 3 - Metabolismo fotoheterotrófico das bactérias púrpuras não-sulfurosas.

Fonte: Adaptado de Golomysova et al. (2010).

Os elétrons liberados a partir do carbono orgânico (ciclo CAT) são carregados por transportadores de elétrons, gerando um fluxo de elétrons cíclico (centro de reação (CR) e ubiquinona (UQ) – complexo citocromo bc₁ – citocromo c₂ - CR) que produz um gradiente de prótons na membrana. Este gradiente de prótons é utilizado pela ATP sintase para produzir ATP pela atividade reversa da NADH desidrogenase (NADH dh) e pelo complexo de fixação de nitrogênio presente nas bactérias do gênero *Rhodobacter* (complexo Rnf) para reduzir a ferredoxina (Fd). A succinato desidrogenase (SDH) fornece elétrons para o ubiquinol, que funciona como um transportador de elétrons para dentro e para fora da membrana. NADH gerado no CAT é usada para a síntese de biomassa, fixação de CO₂, síntese de material de reserva, e formação de H₂ através do complexo nitrogenase. Os elétrons usados

pelo complexo nitrogenase são fornecidos pela ferredoxina (AKKERMAN et al., 2002; GOLOMYSOVA et al., 2010).

Na presença de N_2 , estes elétrons podem ser usados pela nitrogenase para reduzir nitrogênio a amônia. Na ausência de N_2 , esta enzima pode reduzir os prótons H^+ a H_2 com os elétrons derivados da Ferredoxina. Assim, os elétrons derivados dos ácidos orgânicos podem ser utilizados para a produção de H_2 e CO_2 (AKKERMAN et al., 2002).

3.7 IDENTIFICAÇÃO DE COMUNIDADE BACTERIANA POR ELETROFORESE EM GEL DE GRADIENTE DESNATURANTE (DGGE)

Marcadores moleculares, como o gene 16S rDNA, têm sido amplamente aplicados para detectar, identificar e medir a diversidade microbiana de amostras ambientais. Amplificação pela reação em cadeia da plimerase (PCR), combinada com outros métodos moleculares, como a eletroforese em gel desnaturante (DGGE) do produto da PCR, mostra-se uma ferramenta muito importante no estudo de comunidades bacterianas em amostras ambientais, especialmente quando o isolamento e caracterização de cada componente da amostra ambiental é difícil de ser realizado. O posterior sequenciamento dos genes 16S rDNA, proporciona o conhecimento da composição da microbiota e sua correlação com o ambiente, no qual se encontra (ERCOLINI, 2004). A análises baseadas na sequência do gene 16S rDNA é um dos métodos mais utilizado para o estudo filogenético de procariotos, pois este gene é encontrado em todas os procariotos, ocorre em elevado número de cópias, é muito estável (HEAD et al., 1998; ZWIRGLMAIER, 2005), além de conter regiões muito conservadas (DAIMS et al., 2005; NEUFELD e MOHN, 2006; SANZ e KÖCHLING, 2007) que podem ser utilizadas para sua hibridização com sondas e iniciadores específicos para amplificação por PCR (NEUFELD e MOHN, 2006). Sequências de 16S rDNA podem ser obtidas de qualquer amostra de origem ambiental ou clínica sem necessidade de cultivo prévio (AMMAN e KÜHL, 1998).

A amplificação por PCR do gene 16S rDNA em conjunto com outras técnicas de biologia molecular tais como: eletroforese em em gel de gradiente desnaturante (DGGE), eletroforese em gel em gradiente de temperatura (TGGE), análise de restrição de DNA ribossomal amplificado (ARDRA), polimorfismo de comprimento terminal de fragmentos de restrição (TRFLP), entre outros, têm sido extensamente

utilizada para o estudo de comunidades microbianas em ambientes aquáticos (SANZ e KÖCHLING, 2007).

A PCR é uma metodologia básica através da qual se obtém cópias de segmentos de DNA genômico, que podem ser clonados e sequenciados. A comparação das sequências do segmento de DNA ou gene com banco de dados de domínio público de genes, permite a caracterização e identificação de micro-organismos, ao qual pertença o gene (DIEZ et al., 2001).

O DGGE é uma metodologia que pode ser utilizado para analisar o perfil da diversidade de uma comunidade microbiana quantitativamente e qualitativamente. A se baseia no grau de desnaturação (separação das fitas) de uma fita dupla de DNA, na presença de um ambiente desnaturante, o qual é criado pela combinação uniforme de temperatura (usualmente 60 °C) e um gradiente linear de concentração dos desnaturantes uréia e formamida (MUYZER et al., 1993; HEUER e SMALLA, 1997).

Muyzer et al. (1993) analisaram a diversidade genética de populações microbianas complexas com PCR/DGGE. Os autores analisaram amostras de duas origens: sedimento marinho e biofilme bacteriano proveniente de reatores de tratamento de águas residuárias. O DGGE foi aplicado para analisar os fragmentos derivados da região variável V3 16S rDNA.. Esses fragmentos foram obtidos pela amplificação por PCR dos genes do 16S rDNA provenientes do DNA genômico de cultura mista de bactérias. Os resultados mostraram a presença de dez diferentes fragmentos de rDNA nas comunidades microbianas, de origens diferentes. Entre as espécies identificadas destacaram-se: *Escherichia coli*, *Desulfovibrio desulfuricans*, *Desulfovibrio sapovorans*, *Microcoleus chthonoplastes* e *Thiobacillus thioeparus*.

Murray et al. (1996) avaliaram a diversidade filogenética temporal e espacial do bacterioplâncton de dois estuários na costa central da Califórnia (EUA), por comparação do gene 16S rDNA com a técnica de PCR/DGGE. As amostras foram coletadas na superfície da água nos estuários de San Francisco Bay e Tomales Bay. As culturas bacterianas foram separadas segundo a morfologia, cor, velocidade de crescimento e produção de única banda no PCR/DGGE, com iniciadores GC358F e 517R. Os autores encontraram, em média, 26 e 20 linhagens em cada estuário, respectivamente, e 5 linhagens que eram comuns aos mesmos. As semelhanças das amostras coletadas em estações próximas foram superiores, quando comparadas com aquelas de estações distantes,

o que sugeriu substituição das linhagens ao longo do perfil vertical da água nos estuários.

Ferris et al. (1997) utilizaram a PCR/DGGE para estudos da diversidade, evolução e ecologia das populações microbianas existentes no *Park National Yellowstone* (EUA). A técnica de DGGE permitiu uma rápida avaliação da distribuição das seqüências amplificadas por PCR do 16 S rDNA. Foram avaliados padrões de bandas por DGGE e identificadas populações bacterianas por sequenciamento das bandas individuais. Foram detectadas duas populações de cianobactérias e uma de bactérias verdes não sulfurosas. Também encontraram novas espécies de cianobactérias, bactérias verdes não sulfurosas e bactérias verdes sulfurosas, tais como *Synechococcus* sp. e *Chloroflexus* sp.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Nesta seção, serão apresentados os procedimentos experimentais utilizados no presente estudo. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Micro-organismos (LBBMM) do Departamento de Bioquímica (BQA) do Centro de Ciências Biológicas (CCB) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

4.1 MICRO-ORGANISMOS

Neste estudo, foram utilizados dois consórcios bacterianos: o primeiro consórcio bacteriano fotoheterotrófico foi selecionado de uma coluna de Winogradski, conforme descrito no item 4.3. O segundo consórcio bacteriano foi obtido por Lazaro (2009) e gentilmente fornecido pela Dra. Maria Bernadete Amâncio Varesche da Silva da Escola de Engenharia de São Carlos - Universidade de São Paulo, neste estudo, chamado de cultura de referência.

4.2 MEIOS DE CULTIVO

4.2.1 Meio de cultivo para seleção e enriquecimento

Durante os ensaios para seleção e enriquecimento das bactérias PNS foram utilizados o meio de cultivo RCV, descrito por WEAVER et al., 1975, e modificado pela substituição de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ por glutamato de sódio (FASCETTI et al., 1998; ARGUN e KARGI, 2010), além da adição de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (BIANCHI et al., 2010). A composição do meio RCV modificado (RCVM) está descrita nas Tabelas 4 e 5.

Tabela 4 - Composição meio de cultura RCVM utilizado na etapa de enriquecimento.

Composição	Quantidade/Litro
Ácido málico	4,02 g (30 mmol)
Glutamato de sódio	0,68 g (4 mmol)
KH ₂ PO ₄	0,6 g
K ₂ HPO ₄	0,9 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,12 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,075 g
Na ₂ EDTA.H ₂ O	0,02 g
Solução de FeCl ₃ .6H ₂ O (1g/L)	5 mL
Solução extrato de levedura	1mL
Solução de micronutrientes*	1mL

*composição descrita na Tabela 5.

Tabela 5 - Composição da solução de micronutrientes.

Composição	Quantidade (mg/L)
H ₃ BO ₃	2800
MnSO ₄ .H ₂ O	1592
NaMoO ₄ .2H ₂ O	752
ZnSO ₄ .7H ₂ O	240
CuCl ₂ .2H ₂ O	40

O pH do meio de cultura foi ajustado para 7,0 utilizando NaOH (1 mol/L) e/ou HCl (1 mol/L) esterilizado em autoclave a 121 °C por 20 min. Como o durante a preparação do meio ocorria a formação de um precipitado, optou-se por trabalhar com soluções estoque dos seguintes componentes: MgSO₄.7H₂O (120 g/L), CaCl₂.2H₂O (7,5 g/L), Na₂EDTA.H₂O (20 g/L), extrato de levedura (50 mg/L), glutamato de sódio (85 g/L) e malato (ácido málico neutralizado) (67 g/L), os quais foram esterilizados separadamente e volumes apropriados eram adicionados posteriormente, para a obtenção das concentrações da composição final do meio. O pH das soluções estoque foram ajustados para 7,0 usando-se NaOH (1mol/L) ou HCl (1 mol/L).

4.2.2 Meios de cultivo utilizados nos estudos de avaliação de produção de H₂

Nos ensaios de produção de H₂, alterou-se a concentração de glutamato de sódio do meio RCVM (Tabela 4) de 0,68 g/L para 0,34 g/L.

Neste estudo, além do ácido málico, outros ácidos orgânicos, acético e butírico, foram utilizados como fonte de carbono, para o crescimento e produção de H₂. As suas concentrações e referências nas quais seus empregos foram baseados estão descritos na Tabela 6. Em todos os ensaios, o pH inicial do meio de cultura foi ajustado para 7,0 (EROGLU et al., 1999; BARBOSA et al., 2001).

Tabela 6 - Fontes de carbono empregadas nos ensaios de produção de H₂.

Fonte de carbono	Concentração (g/L)	Referência
Ácido málico	2,01 (15 mmol)	KOKU et al.(2003); JAAPAR et al.(2009)
Acido acético	1,80 (30 mmol)	OOSHIMA et al.(1998)
Ácido butírico	1,32 (15 mmol)	LAZARO, 2009

4.3 PREPARO DA COLUNA DE WINOGRADSKI PARA A OBTENÇÃO DO CONSÓRCIO BACTERIANO FOTOHETEROTRÓFICO

O consórcio fotoheterotrófico constituído por bactérias púrpuras não-sulfurosas (PNS), utilizado neste estudo foi obtido através da seleção de anaeróbios de coloração púrpura crescidos em uma coluna de Winogradski (CARVALHO et al., 2007) preparada usando sedimento proveniente da Lagoa da Conceição, localizada na cidade de Florianópolis/SC.

O sedimento foi coletado em junho/2010 na estação 33, localizada na região central da Lagoa da Conceição, próximo à Ponta das Almas numa profundidade de 6 m. O sedimento era fino (silte), rico em matéria orgânica e enxofre.

Para a preparação da coluna de Winogradski, foram adicionados, em uma proveta de vidro de 1000 mL (40 cm de altura e 6,5 cm de diâmetro): 100 g de sedimento, 4,5 g de Na₂SO₄, 0,2 g de Na₂CO₃, 0,2 g de K₂HPO₄, 0,5 g de (NH₄)₂SO₄ e 0,5 g de fonte de carbono orgânico

(papel de filtro picado). Após a mistura dos constituintes descritos acima ao sedimento, foi adicionado sobre o sedimento um volume de água coletada da mesma Lagoa, até completar 1 L, cuidadosamente, evitando a suspensão do sedimento. A proveta foi coberta com filme (de PVC) e colocada em local iluminado com luz natural, próximo uma janela de vidro fechada (aproximadamente 20 cm de distância entre a coluna e a janela). A coluna, assim montada permaneceu no mesmo local por 3 meses. Durante este período, estabeleceu-se uma distribuição de micro-organismos, ao longo da altura da coluna, dependente do oxigênio dissolvido na coluna de água.

Após o período de 3 meses, com o auxílio de uma pipeta, foi coletada 5 mL de amostra, da região (faixa) da coluna, correspondente à rica em bactérias fotoheterotróficas, de cor púrpura, 2 cm acima do sedimento e aproximadamente 25 cm abaixo da superfície. A amostra foi transferida para frascos de vidro transparente contendo 20 mL de, do meio RCVM. Os frascos foram incubados em estufa a 30 °C durante 3 dias sob iluminação constante utilizando-se lâmpadas fluorescentes de 15 W (~4.000 lux) (TAO et al., 2008). As lâmpadas utilizadas em todas as etapas do estudo emitiam luz nos comprimentos de onda entre 400 a 750 nm (de acordo com especificações do fabricante). Após o desenvolvimento da pigmentação púrpura, enriqueceu-se a biomassa presente no consórcio fotoheterotrófico conforme metodologia descrita no item 4.5 desta seção. O procedimento de enriquecimento foi repetido duas vezes e a cultura obtida ao final desta etapa foi considerada como o consórcio bacteriano fotoheterotrófico e foi utilizado nas etapas subsequentes deste trabalho.

4.4 ENRIQUECIMENTO DA BIOMASSA DO CONSÓRCIO BACTERIANO FOTOHETEROTRÓFICO

Com o objetivo de promover o aumento da biomassa presente no consórcio bacteriano fotoheterotrófico, enriqueceu-se a mesma usando meio de cultivo RCVM (Tabela 4). O meio de cultivo foi preparado nas mesmas condições descritas no item 4.1 desta seção, sendo que as fontes de carbono e nitrogênio empregadas foram ácido málico (30 mmol/L) e glutamato de sódio (4 mmol/L), respectivamente. Nesta etapa, foi usado ácido málico como fonte de carbono, uma vez que este é descrito na literatura como substrato universalmente utilizado por bactérias PNS, e assim não estaria selecionando nenhuma espécie em detrimento de outras (TAYED e MADIGAN, 1987 apud LAZARO, 2009).

Aos frascos contendo 40 mL de meio de cultivo adicionou-se 10 mL de inóculo. Argônio foi borbulhado no meio, para o deslocamento do oxigênio dissolvido e a obtenção da atmosfera anaeróbica. Os frascos foram incubados em estufa a 30 °C durante 3 dias sob iluminação constante, utilizando-se lâmpadas fluorescentes de 15 W (~4.000 lux) (TAO et al., 2008).

4.5 CARACTERIZAÇÃO DO CONSÓRCIO BACTERIANO FOTOHETEROTRÓFICO

4.5.1 Análise dos pigmentos produzidos pelo consórcio bacteriano fotoheterotrófico

A análise dos pigmentos produzidos pelo consórcio foi realizada conforme metodologia proposta por Núñez-Cardona (2003).

Para obter o espectro de absorção *in vivo*, centrifugou-se 10 mL de uma cultura de 72 h pigmentada a 5 000 rpm durante 20 min. Após descarte do sobrenadante, as células foram ressuspendidas em 5 mL de água destilada. Usando água destilada como branco, procedeu-se uma varredura (de 370 a 1000 nm) em espectrofotômetro, visando a obtenção dos comprimentos de onda que apresentassem picos de absorbância. O resultado obtido foi comparado com dados da literatura.

4.5.2 Metodologias moleculares empregadas na caracterização do consórcio

As análises de biologia molecular visaram à caracterização da diversidade microbiana do consórcio bacteriano fotoheterotrófico e compreenderam as seguintes etapas: i) extração do DNA genômico, ii) reação em cadeia polimerase (PCR), e iii) separação dos segmentos amplificados no PCR usando eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE).

4.5.2.1 Extração do DNA genômico

Para a extração do DNA da amostra do consórcio, utilizou-se uma cultura de 72 horas e, procedeu-se então a extração do DNA contido na biomassa utilizando-se um kit de extração comercial (Kit Ultraclean MO BIO). A extração do DNA genômico foi realizada conforme protocolo do fabricante do kit MO BIO.

Para a extração do DNA centrifugou-se 2 mL da cultura a 10.000 rpm, temperatura ambiente por 30 s. O meio de cultivo foi removido e a cultura foi ressuspensa em 300 µL da solução de lise celular (MicroBead). As células ressuspensas foram transferidas para um tubo “microbead” (fornecido pelo kit). Adicionou-se 50 µL da solução MD1 e os tubos foram agitados em vórtex na velocidade máxima por 10 min. Após o agitação em vórtex os tubos foram centrifugados a 10.000 rpm, temperatura ambiente por 30 s e o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo, onde foi adicionado 100 µL da solução MD2 e incubou-se a 4 °C por 5 min. Os tubos foram centrifugados a 10.000 rpm, temperatura ambiente por 1 min. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionou-se 900 µL da solução MD3. Nesta etapa, tem-se um volume aproximado de 1300 µL, sendo que este volume é transferido para tubos “*spin*” (fornecido pelo kit). Como o tubo “*spin*” tem capacidade máxima de 700 µL, esta transferência foi realizada duas vezes. Os tubos “*spin*” foram centrifugados a 10.000 rpm, temperatura ambiente por 30 s. A sobrenadante foi descartado e 300 µL de solução MD4 foram adicionados ao tubo “*spin*”. O sobrenadante foi descartado e o filtro foi transferido para um novo microtubo, no qual adicionou-se 50 µL da solução MD5 e centrifugou-se a 10.000 rpm, temperatura ambiente por 30 s. O DNA genômico extraído encontra-se no filtrado e foi guardado em freezer (-20 °C) até uso. Todas as soluções usadas durante a extração do DNA foram fornecidas pelo kit.

Para avaliar a quantidade e o sucesso do produto de extração do ácido nucléico, foi realizada eletroforese em gel de agarose 1 % (m/v).

4.5.2.2 Reação em cadeia polimerase (PCR)

A partir do DNA genômico extraído da amostra, foi feita amplificação do gene 16S rDNA por PCR, empregando-se iniciadores cujas seqüências são apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7 - Iniciadores e suas seqüências.

Iniciador	Seqüência
GC 358F	5'CGCCCCGCCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCA CGGGGGCCTACGGGAGGCAGCAG3'
517R	5' ATTACCGCGGCTGCTGG 3'

A PCR foi preparada da seguinte maneira: tomou-se 25 µL de PCR mix, 1 µL do iniciador GC 358F (0,2 µmol/L), 1 µL do iniciador 517 R (0,2 µmol/L), 1 µL de DNA molde – extraído conforme descrito em 4.3.6.2 (100 ng) e 22 µL de água ultrapura (prificador Millipore), obtendo-se, assim, um volume total de reação de 50 µL. A composição e concentração utilizada no PCR mix foi: tampão de PCR 2X (Invitrogen), albumina bovina (BSA) 2X, MgCl₂ 3 mmol/L, Taq DNA polimerase 2,5 U (Invitrogen) e dNTPs mix (Invitrogen) 0,4 mmol/L. As condições da reação amplificação encontram-se descritas na Tabela 8. Para avaliar o produto resultante do PCR foi usada a técnica de eletroforese em gel de agarose 2 % (m/v).

Tabela 8 - Condições empregadas na PCR.

Nº de ciclos	Desnaturação inicial	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Extensão final	Resfriamento
35	94 °C 5 min	94 °C 45 s	55 °C 1 min	72 °C 1 min	72 °C 10 min	4 °C

Para avaliar o sucesso e a quantidade do produto resultante da PCR, procedeu-se uma eletroforese em gel de agarose 2 % (m/v). A presença das bandas (produtos da PCR) foi visualizada após coloração em brometo de etídio, através de iluminação em transiluminados sob luz ultravioleta.

4.5.2.3 Eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE)

Após a verificação do produto de PCR em gel de agarose 2 % (m/v), o mesmo foi utilizado para verificação da diversidade de espécies, cujos 16S rDNA foram amplificados a partir da amostra de DNA extraído do consórcio, através da metodologia de DGGE.

Para a técnica de DGGE procedeu-se o preparo do gel de acrilamida/bis acrilamida na concentração de 8 % (usado para separar amostras de DNA contendo de 200 a 400 pares de base). O gradiente utilizado foi de 25 e 55 % de formamida/uréia, e para tanto se preparou soluções estoque de 0 e 100% de formamida/uréia. Estas soluções foram preparadas de acordo com o protocolo do fabricante, nas condições

especificadas para gel acrilamida/bisacrilamida 8 % (m/v) e encontram-se descritas na Tabela 9. As soluções foram esterilizadas por filtração em sistema Millipore e membrana de 0,22 μm , previamente esterilizados em autoclave a 121 $^{\circ}\text{C}$ por 20 min., e armazenadas sob refrigeração em frascos âmbar. A validade das soluções é de 30 dias.

Tabela 9 - Soluções desnaturantes para DGGE.

Reagente	Solução 0 %	Solução 100 %
Acrilamida/bisacrilamida 40 %	20 mL	20 mL
Tampão TAE 50X	2 mL	2 mL
Formamida	-	40 mL
Uréia	-	42 g
Água ultrapurificada	Para 100 mL	Para 100 mL

A partir das soluções estoque, prepararam-se as soluções desnaturantes de 25 e 55 %. Adicionou-se a cada uma das soluções desnaturantes, a concentração de 0,09 % (v/v) de uma solução de persulfato de amônia (APS) 10 % (m/v) e tetrametiletenodiamina (TEMED). Após a solidificação do gel (~1 h), as placas contendo o gel foram colocadas em suporte apropriado e transferido para cuba de DGGE. Nesta cuba foram adicionados 7 L de tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1 X. A temperatura de “corrida” do gel foi constante (60 $^{\circ}\text{C}$), voltagem de 130 volts, com duração de 4 h e 30 min. Após o término da “corrida”, o gel foi retirado da cuba e imerso por 20 min em solução de brometo de etídio (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em tampão TAE 1X) e posteriormente observado em transluminador com lâmpada UV.

4.5.2.4 Eletroforese em gel de agarose

Para verificação do DNA genômico extraído, dos produtos da PCR e das banda do DGGE foram feitas eletrofores em gel de agarose 1 % (m/v) em tampão TAE (Tampão-Tris-Acetato-EDTA). Nas etapas de avaliação dos produtos da PCR e verificação da presença das bandas de DNA, no DGGE. Azul de Bromofenol foi usado como referência para acompanhamento da migração da amostra no gel. Para visualização das bandas de DNA, o gel foi imerso por 20 min. em solução de brometo de etídio (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em tampão TAE 1 X), e posteriormente observado em transluminador com lâmpada UV.

4.6 FOTOBIORREADORES EM BATELADA UTILIZADOS NO ESTUDO

4.6.1 Fotobiorreator 1

Os primeiros fotobiorreatores confeccionados foram baseados nos trabalhos de Lamaison (2009) e Cappelletti (2009) e consistiram de frascos de vidro (tipo soro) com volume útil de 500 mL. A tampa do reator era constituída por rolha de silicone, na qual estavam acopladas duas tubulações: uma para a entrada de gás argônio (para manutenção de condições anaeróbias) e retirada de amostra e outra para saída do gás produzido no sistema. A tubulação de saída de gás foi acoplada a um sistema de medição, constituído de frasco invertido do tipo mariote, contendo solução de hidróxido de sódio 5 % (m/v), e proveta para medida do volume a ser deslocado pelo gás produzido. As conexões entre os tubos foram feitas com mangueiras de silicone. O sistema foi montado no interior de uma estufa, onde a temperatura foi mantida a 30 °C. A energia luminosa foi fornecida por um conjunto de lâmpadas fluorescentes de 15 W acopladas no interior da estufa. A Figura 4 apresenta os primeiros fotobiorreatores confeccionados para a produção de H_2 .

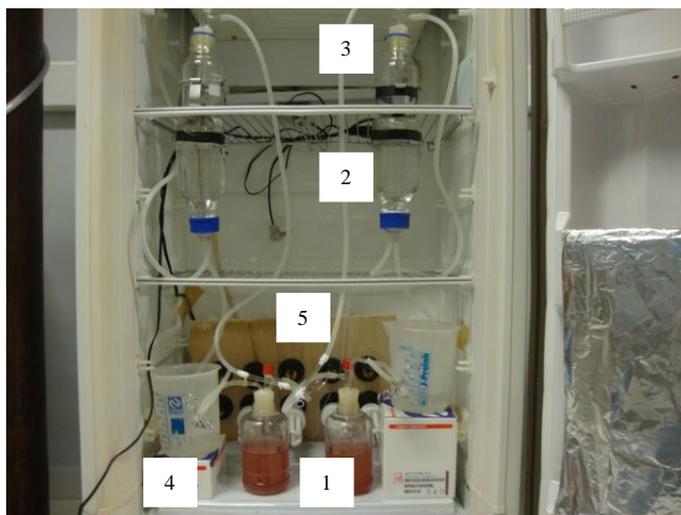


Figura 4 - Primeiro sistema de fotobiorreatores para a produção de H_2 : (1 - Fotobiorreator; 2 - Frasco com NaOH; 3 - Frasco de segurança (vazio); 4 - Frasco coletor de NaOH 5 %; 5 - Suporte para lâmpadas).

4.6.2 Fotobiorreator 2

Com o objetivo de tornar os fotobiorreatores mais adequados para medição do volume de H_2 produzido, confeccionou-se um novo modelo de reator baseado nos trabalhos de Castro (2010). Os reatores confeccionados consistiram de frascos de vidro (tipo soro) com volume útil de 500 mL. A tampa do reator era constituída por rolha de borracha, na qual são acopladas duas tubulações: uma para a entrada de gás argônio e outra para saída do gás produzido no sistema. A tubulação de saída de gás foi acoplada a um sistema de medição de gás, constituído de um frasco de segurança, um frasco contendo hidróxido de bário ($Ba(OH)_2$) na concentração de 3,5 g/L e um dispositivo de medida de volume: O H_2 produzido provoca o deslocamento de uma coluna de água, sendo o deslocamento observado em uma bureta graduada. As conexões entre os tubos foram feitas com vidro para evitar perda de gás. O sistema operacional foi montado no interior de uma estufa, onde a temperatura foi mantida a 30 °C. A energia luminosa foi fornecida por um conjunto de lâmpadas fluorescentes de 15W acopladas no interior da estufa. A Figura 5 apresenta um esquema no qual se baseia o segundo fotobiorreator operacional confeccionado para a produção de H_2 .

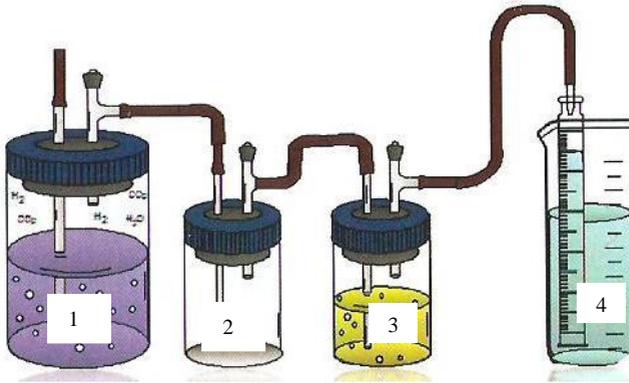


Figura 5 - Representação do segundo sistema de fotobiorreatores para a produção de H_2 : (1 - Fotobiorreator; 2 - Frasco de segurança (vazio); 3 - Frasco com $(Ba(OH)_2$); 4 - Coluna de água).

Fonte: Castro (2010).

4.6.3 Fotobiorreator 3

Com o objetivo de verificar se o consórcio bacteriano fotoheterotrófico obtido a partir da coluna de Winogradski era produtor de H_2 , e uma vez que foram observados diversos problemas que inviabilizaram o uso dos fotobiorreatores anteriormente confeccionados, optou-se por trabalhar com um sistema alternativo. Neste sistema utilizaram-se tubos de ensaios, cujas tampas foram furadas (~5 mm de diâmetro) e colocou-se um septo de borracha de 1 mm de espessura para evitar escape do gás produzido no sistema. A Figura 6 apresenta o sistema utilizado nos ensaios de produção de H_2 . A composição e volume do gás produzido neste sistema foram determinados por cromatografia gasosa e encontra-se descrita nos itens 4.9 e 4.10 desta seção.



Figura 6 - Sistema utilizado nos ensaios de produção de H_2 .

4.7 ENSAIOS PARA A PRODUÇÃO DE H_2

4.7.1 Preparo do inóculo

A partir do consórcio bacteriano fotoheterotrófico enriquecido preparou-se a cultura de trabalho (CT). Para a preparação da CT, adicionou-se 2 mL de inóculo (consórcio bacteriano fotoheterotrófico enriquecido) em tubos de ensaio contendo 8 mL de meio de cultivo nas mesmas condições usadas no enriquecimento da biomassa. Os frascos foram incubados em estufa a 30 °C, sob iluminação constante de uma lâmpada fluorescente de 15 W (~ 4.000 lux) por 3 dias (TAO et al., 2008). Após este período, os frascos foram armazenados sob refrigeração até o momento do uso. Estas CT foram utilizadas para a preparação do inóculo usado nos ensaios de produção de H_2 .

Para a preparação do inóculo, 10 mL da CT foi inoculada em frascos de vidro transparentes contendo 40 mL de meio de cultivo nas mesmas concentrações usadas na etapa de enriquecimento da biomassa e submetidos às mesmas condições de incubação.

4.7.2 Ensaios realizados no estudo da produção de H₂ pelos consórcios fotoheterotróficos

Os ensaios de produção de H₂ foram divididos em três etapas. Na primeira etapa empregou-se um consórcio bacteriano fotoheterotrófico previamente conhecido como produtor de H₂ (LAZARO, 2009). O objetivo do emprego deste consórcio foi verificar se a metodologia aplicada era adequada para produção e quantificar o gás produzido, durante o estudo realizado neste trabalho. Nesta etapa os ensaios foram realizados em duplicata.

A segunda etapa consistiu de um estudo preliminar com o consórcio bacteriano fotoheterotrófico obtido neste estudo, empregando como substrato os ácidos acético, butírico e málico. Nesta etapa, os ensaios não foram realizados em duplicata.

Por fim, na terceira etapa realizou-se a cinética, com o consórcio em estudo empregando os ácidos acético e butírico como substratos, uma vez que os mesmos são, na grande maioria dos casos, os produtos intermediários presentes em maiores concentrações nos efluentes oriundos dos da produção de H₂ por fermentação escura. (CHIN et al., 2003). Nesta etapa, os ensaios foram realizados em duplicata.

Nos ensaios de produção de H₂ utilizou-se o mesmo meio de cultivo descrito na Tabela 4, porém em diferentes concentrações das fontes de carbono e nitrogênio. Para avaliar a produção de H₂, foram utilizadas três diferentes fontes de carbono, cujas concentrações variaram de acordo com dados de literatura. Para o ácido málico usou-se a relação C/N (mmol_{Carbono}/L/mmol_{Nitrogênio}/L) de 15/2 (EROGLU et al., 1999; LÁZARO, 2009), ácido acético 30/2 (LAZARO, 2009) e ácido butírico 15/2 (LAZARO, 2009). O pH inicial foi 7,0 (EROGLU et al., 1999; BARBOSA et al., 2001).

O inóculo foi centrifugado a 5000 rpm por 20 min. e a biomassa sedimentada foi ressuspensa em meio com limitação de nitrogênio, para evitar um possível excesso da fonte de nitrogênio. Nestes ensaios, os fotobiorreatores utilizados foram os sistema de tubos de ensaio, sendo que 9 mL foram preenchidos com meio de cultivo e 1 mL com inóculo. Após inoculação, gás argônio foi borbulhado, usando filtros estéreis, para a obtenção da anaerobiose. Os frascos foram incubados em estufa a

30°C sob iluminação constante de lâmpadas fluorescentes (~7.000 lux) (ARGUN e KARGI, 2010).

As amostras foram retiradas a cada 24 h para as determinações analíticas. A cada retirada de amostra foi descartado o frasco correspondente, bem como sua duplicata.

A intensidade luminosa foi medida através de um luxímetro. Para a realização das medidas o medidor foi colocado na superfície externa dos tubos e esperou-se a estabilização da leitura no visor do equipamento.

4.8 DETERMINAÇÃO DE BIOMASSA DO CONSÓRCIO FOTOHETEROTRÓFICO

A quantificação da massa celular seca (biomassa) foi realizada através do método gravimétrico (CASTRO, 2010). As amostras foram centrifugadas a 5000 rpm por 30 min, o sobrenadante foi descartado e a biomassa decantada foi ressuspensa com água destilada em *Eppendorf* previamente seco. As amostras foram novamente centrifugadas a 10.000 rpm por 20 min. e após descarte do sobrenadante, os tubos foram incubados em estufa a 100 °C por 24 h e pesados. Esta medida foi usada para estimar o crescimento celular ao longo do tempo.

4.9 COMPOSIÇÃO DO GÁS PRODUZIDO

A determinação dos gases produzidos no fotobiorreator foi feita através de cromatografia gasosa (CG). A concentração dos gases produzidos foi avaliada por meio da retirada de 500 µL de amostra do gás pelo septo dos tubos de ensaio, utilizando-se uma seringa do tipo *gastight*. Foi utilizado cromatógrafo gasoso (Shimadzu – 2014) equipado com detector de condutividade térmica (TCD). A coluna utilizada foi uma coluna empacotada, Molesieve 5A, sendo o gás de arraste N₂ sob vazão de 25 mL/min. As temperaturas do injetor, da coluna e do detector foram 80 °C, 60 °C e 160 °C, respectivamente.

4.10 DETERMINAÇÃO DO VOLUME DE H₂ PRODUZIDO

O volume de H₂ produzido foi determinado a partir da aplicação da Equação da Lei dos Gases Perfeitos (Equação 5). Nos cálculos foram empregadas as condições normais de temperatura e pressão (CNTP).

$$pv = nRT \quad (5)$$

Onde:

p = pressão nas CNTP, (101 KPa);

v = volume de H₂ produzido, (mL);

n = número de moles de H₂;

R = constante dos gases perfeitos, (8,314 kJ/mol.K);

T = temperatura nas CNTP (273 K).

A Equação 5 também foi utilizada para calcular o número de moles de H₂ no *head space*. Calculou-se o número de moles de H₂ em um volume de 500 µL de padrão. A temperatura (273 K) e pressão (101 KPa) utilizadas para os cálculos foram as empregadas nas CNTP. Assim, para a área cromatográfica do padrão, considerou-se que a mesma equivalia ao número de moles obtidos na Equação 5 e este valor foi relacionado com as áreas cromatográficas das amostras, obtendo desta maneira, o número de moles de H₂ produzido. O padrão utilizado foi H₂ retirado de um cilindro, cuja pureza era de 99,99 %.

4.11 DETERMINAÇÃO DE GRANDEZAS CINÉTICAS

As velocidade específicas de produção de biomassa (μ_x) e de H₂ (μ_p) foram determinadas segundo as Equações 6 e 7, respectivamente.

$$\mu_x = \frac{dX}{dt} \cdot \frac{1}{X} \quad (6)$$

Onde:

dX/dt = derivada da concentração de biomassa em função do tempo;

X = concentração de biomassa na no tempo *t* (g/L)

$$\mu_p = \frac{dP}{dt} \cdot \frac{1}{X} \quad (7)$$

Onde:

dX/ dt = derivada da concentração de H₂ com o tempo;

X = concentração de biomassa na no tempo *t* (g/L).

As velocidades específicas de produção de biomassa e de H₂ foram calculadas de acordo com as Equações 6 e 7 usando o Software Excel 7.0.

As velocidades médias de produção de biomassa (qx) de H₂ (qp) foram determinadas segundo as Equações 8 e 9.

$$qx = \frac{(X_f - X_i)}{\text{Tempo}} \quad (8)$$

Onde:

X_f = Concentração de biomassa no tempo t (g/L);

X_i = Concentração de biomassa inicial (g/L);

Tempo = Tempo (d).

$$qp = \frac{(P_f - P_i)}{\text{Tempo}} \quad (9)$$

Onde:

P_f = Concentração de H₂ no tempo t (mL/L);

P_i = Concentração de H₂ inicial (mL/L);

Tempo = Tempo de cultivo (d).

As velocidades médias de produção de biomassa e H₂ foram calculadas usando método de linearização, onde os coeficientes angulares das retas representam as velocidades.

O rendimento de H₂ (R) foi obtido dividindo-se a quantidade de moles de H₂ produzido pela quantidade de moles de substrato inicial no meio de cultivo. A eficiência de conversão foi obtida dividindo-se o número de moles de H₂ produzido pela quantidade teórica que poderia ser obtida se todo o substrato fosse utilizado para a produção de H₂. Os cálculos teóricos de produção de H₂ foram baseados nas equações estequiométricas apresentadas na Tabela 10.

Tabela 10 - Equações estequiométricas para a fotofermentação, dos ácidos orgânicos empregados como substratos na produção de H₂.

Substrato	Equação estequiométrica
Ácido acético	$C_2H_4O_2 + 2H_2O \rightarrow 4H_2 + 2CO_2$
Ácido butírico	$C_4H_8O_2 + 6H_2O \rightarrow 10H_2 + 4CO_2$
Ácido málico	$C_4H_6O_5 + 3H_2O \rightarrow 6H_2 + 4CO_2$

Os resultados de produção de H₂ foram avaliados através de análise de variância (ANOVA) ao nível de 5 % de significância com o auxílio do software Statistica 7.0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OBTENÇÃO DO CONSÓRCIO BACTERIANO FOTOTRÓFICO

Visando-se obter bactérias púrpuras não-sulfurosas (PNS), cujas espécies são conhecidas por apresentar metabolismo fotoheterotrófico, montou-se uma coluna de Winogradski. É sabido que na coluna de Winogradski, estabelece-se um gradiente de concentração de O_2 , no qual na superfície há maior oxigenação tendo em vista o contato mais próximo com o ar.

Segundo Carvalho et al. (2007) a coluna de Winogradski é usada para estudar micro-organismos aquáticos e sedimentares, uma vez que ela promove o desenvolvimento de populações bacterianas fototróficas a diferentes profundidades, quando expostas à luz. A altura da coluna permite o desenvolvimento de uma zona aeróbia na superfície e de regiões microaerofílicas e anóxicas nas camadas subsuperficiais. O sedimento é enriquecido com substratos (carbono orgânico, sulfetos e sulfatos) permitindo o desenvolvimento de várias populações fotoheterotróficas e fotoautotróficas, conforme a disponibilidade de O_2 e de nutrientes. A camada de água imediatamente acima do sedimento apresenta concentrações de O_2 reduzidas e recebe também parte do H_2S que é desprendido do sedimento, sendo esta região ideal para o crescimento de bactérias redutoras de sulfeto, cuja coloração típica é o cinza. A porção superior torna-se marrom-avermelhada em decorrência do crescimento de bactérias PNS. Abaixo desta camada pode aparecer uma zona violeta-avermelhada que corresponde às bactérias púrpuras sulfurosas.

Através de uma coluna de Winogradski foi possível obter de um consórcio bacteriano fotoheterotrófico mais específico para a produção de H_2 , uma vez há um menor número de micro-organismos competindo pelo mesmo substrato. Além disso, as condições encontradas na região da coluna de Winogradski que corresponde a das bactérias PNS, são específicas para estas bactérias, o que pode inibir o crescimento de outras espécies.

A Figura 7 apresenta a coluna de Winogradski, após três meses de preparo, da qual obteve-se o consórcio bacteriano fotoheterotrófico. A seta preta representa a região correspondente às bactérias PNS.



Figura 7 - Coluna de Winogradski - Figura menor apresenta a coluna inteira e a figura maior destaca a região da qual foi coletado o consórcio fotoheterotrófico.

O consórcio bacteriano fotoheterotrófico obtido através da coluna de Winogradski apresentou características atribuídas à presença de PNS, como a produção, na presença de luz, de pigmentos de cor púrpura, e crescimento em anerobiose, como podem ser observados na Figura 8.



Figura 8 - Consórcio bacteriano fotoheterotrófico enriquecido.

Na etapa de obtenção do consórcio bacteriano fotoheterotrófico, durante o enriquecimento da biomassa, observou-se que após três dias de incubação, a cultura ficou aderida a parede dos frascos. Esta aderência da biomassa à parede dos frascos também foi observada por Lazaro (2009), que obteve um consórcio bacteriano fototrófico a partir de uma mistura de lodo granular de digestor anaeróbio de fluxo ascendente sob condições fototróficas anoxigênicas.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DO CONSÓRCIO BACTERIANO FOTOTRÓFICO

5.2.1 Análise dos pigmentos do consórcio bacteriano fototrófico

Os pigmentos produzidos pelas espécies presentes no consórcio bacteriano fotoheterotrófico, quando submetidos a análise espectrofotométrica, apresentaram máximos de absorção a 380, 480, 520, 590, 820 e 890 nm, conforme pode ser observado na Figura 9.

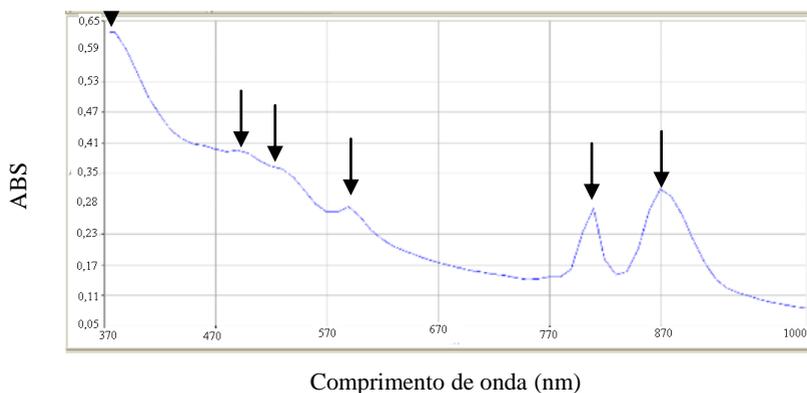


Figura 9 - Espectro de absorção dos pigmentos presentes no consórcio fototrófico.

Estudos realizados com bactérias fotoheterotróficas são encontrados na literatura apresentando pigmentos com picos de absorção entre 370 e 900 nm. Caumette et al. (2007) analisaram os *in vivo* pigmentos fotossintéticos produzidos por uma bactéria PNS isolada do atol Rangiroa localizado na Polinésia e obtiveram picos de absorção a 378, 483, 512, 548, 594, 802, e 909 nm. Segundo os autores os picos de 378, 594, 802 e 909 nm correspondem à bacterioclorofila *a* e os picos

de 483, 512 e 548 nm correspondem aos carotenóides da série espiriloxantina normal, sendo que ambos são pigmentos presentes nas bactérias PNS. Os picos obtidos neste estudo estão de acordo com os encontrados por Caumette et al. (2007), sendo que os picos de 380, 590, 820 e 890 nm correspondem à bacterioclorofila *a* e os picos de 480 e 520 aos carotenóides da série espiriloxantina normal.

Na maioria dos casos, as bactérias que possuem o pigmento bacterioclorofila *a* apresentam as maiores bandas de absorção próximo a região do infravermelho, sendo que os picos característicos ocorrem a 800, 850-860 e 880 a 890 nm (CAUMETTE et al., 2007). Os picos de 820 e 890 nm obtidos neste estudo, podem ser enquadrados dentro desta faixa.

Outros autores também encontraram picos de absorção próximos a esta faixa e atribuíram os mesmos a presença de bacterioclorofila *a*. Ponsano et al. (2002) isolaram 4 culturas de bactérias fotoheterotróficas de água residuária da indústria de frango, sendo que as 4 culturas foram identificadas como *Rhodocyclus gelatinosus*, uma bactéria classificada como PNS. Os autores submetem as culturas isoladas a uma análise *in vivo* de pigmentos e observaram máximos de absorção a 375, 460, 500, 590, 650, 800 e 865 nm. Estes picos foram atribuídos a presença de bacterioclorofila *a* e carotenóides da série espiriloxantina normal. Trüper e Imhoff (1992) apud Ponsano et al. (2002) estudaram os pigmentos de uma linhagem selvagem de *Rhodocyclus gelatinosus* e obtiveram os máximos de absorção em 373-374, 455-460, 476-486, 506-518, 806-810 e 854-865 nm, sendo que estes picos também foram atribuídos a presença de bacterioclorofila *a* e carotenóides da série espiriloxantina normal. Os resultados obtidos neste estudo (380, 480, 520, 590, 820 e 890) estão de acordo com os obtidos por Ponsano et al. (2002) e Trüper e Imhoff (1992).

Tao et al. (2008) isolaram 4 culturas fotoheterotróficas a partir de águas residuárias (ZX-2, ZX-3, ZX-4 e ZX-5) que posteriormente foram identificadas, através de análises de biologia molecular, como *Rhodobacter sphaeroides*, uma bactéria PNS. Estas culturas foram submetidas a análises de pigmentos e obtiveram picos máximos de absorção a 478, 513, 590, 801 e 852 nm, sendo que os autores atribuíram os picos de 478 e 513 nm a presença de carotenóides e os picos de 590, 801 e 852 a presença de bacterioclorofila *a*. Estes resultados também estão de acordo como os obtidos neste estudo.

Núñez-Cardona (2003) analisaram os pigmentos produzidos por diversas amostras de bactérias fototróficas, isoladas de um lago e encontram máximo de absorção a 370-378, 588-591, 796-798 e 800-892

nm. Segundo Pfennig e Trüper (1982) apud Núñez-Cardona (2003), estes picos correspondem à bacterioclorofila *a* (pigmento presente no fotossistema das bactérias PNS). Sendo que os picos encontrados pelo autor são semelhantes aos obtidos neste estudo.

Nakada et al. (1995) estudaram a influência da penetração de luz, no meio de cultura, durante a produção de H₂ usando uma bactéria PNS (*Rhodobacter sphaeroides*) e observaram picos de absorção a 400, 800 e 850 nm, sendo estes picos atribuídos a presença de bacterioclorofilas *a*. Rees et al. (2002) avaliaram *in vivo*, os pigmentos de bactérias fototróficas isoladas a partir de sedimentos de um lago, e obtiveram os picos de absorção a 380, 462, 489, 524, 598, 805 e 875 nm. Segundo os autores os picos de 380, 598, 805 e 875 nm demonstram a presença de bacterioclorofila *a*, e os picos de 462, 489 e 524 nm indicam a presença de carotenóides. O resultados encontrados por estes autores também estão de acordo com os obtidos neste estudo (380, 480, 520, 590, 820 e 890 nm).

Os resultados obtidos na análise dos pigmentos produzidos pelas espécies presentes no consórcio bacteriano fotoheterotrófico, obtido neste estudo, demonstram picos de absorção característicos de pigmentos bacterioclorofila *a*, conforme pode ser descrito na literatura citada acima, sugerindo a presença de bactérias PNS, conforme esperado, uma vez que foi obtido a partir de uma região da coluna de Winogradsky, específica para o desenvolvimento destas bactérias.

5.2.2 Caracterização molecular das espécies presentes no consórcio fototrófico

A análise do DNA genômico extraído do consórcio bacteriano fotoheterotrófico foi possível a partir da obtenção de fragmentos do gene 16 S rDNA através da PCR. A Figura 9 apresenta a eletroforese em gel de agarose dos produtos obtidos na PCR, a partir do DNA genômico. Na primeira coluna encontra-se o marcador ou padrão, sendo que o mesmo está dividido de 100 em 100 pb (pares de base). A Figura 10 mostra que obteve-se, por PCR a amplificação de segmentos de 200 pares de base dos genes 16S rDNA, presentes na amostra de DNA extraído da biomassa do consórcio fotoheterotrófico.

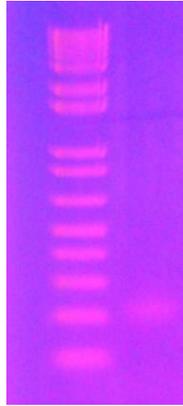


Figura 10 - Fragmentos de DNA amplificados por PCR

O produto da PCR foi submetido á DGGE. Esta metodologia permitiu verificar que na amostra obtida da PCR, quatro diferentes seqüências do gene 16S rDNA foram amplificadas.. Na Figura 11, é apresentada uma fotografia do gel da DGGE realizada, na qual se observa que as quatro bandas apresentam grau de migrações diferentes no gel. É importante salientar que na metodologia DGGE, qualquer diferença na seqüência do gene 16S rDNA, produzirá diferença na migração da amostra. Desde que espécies diferentes apresentam seqüências diferentes no seu 16S rDNA, pode-se afirmar a presença de pelo menos 4 diferentes espécies bacterianas compondo o consórcio.

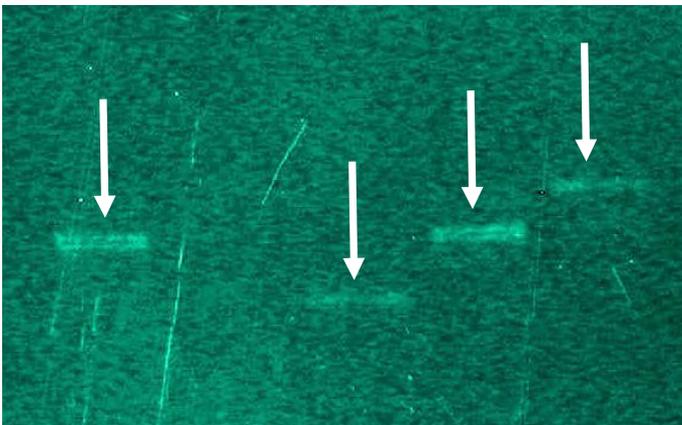


Figura 11 - Bandas de DNA separadas por DGGE, em gel de acrilamida.

Estes resultados diferem dos encontrados por Lazaro (2009) que, por meio de técnicas de moleculares, identificou 17 unidades taxonômicas operacionais (UTO) no consórcio bacteriano, sendo que 35 % das sequências identificadas foram classificadas como alfa-proteobactéria, filo Proteobactéria que compreendem as espécies de bactérias PNS. Outras sequências (7 %) foram relacionadas com beta-proteobactéria, subfilo que também compreende espécies de bactérias fototróficas. Clones semelhantes a epsilon-proteobactéria representaram 28 % e foram semelhantes a *Sulfurospirillum*, é uma espécie que utiliza H_2 como doador de elétrons em seu metabolismo. Quatorze por cento (14 %) das sequências identificadas foram semelhantes à *Clostridium*, bactérias fermentativas, endósporo positivas e produtoras de H_2 . Porém, segundo Lazaro (2009) estas não foram responsáveis pela produção de H_2 , uma vez que as mesmas usam carboidratos como substratos e atuam na faixa de pH 5,0. Nenhuma destas condições estava presente nos experimentos realizados pelo autor.

O fato do consórcio bacteriano fototrófico obtido neste estudo ter apresentado um menor número de espécies em relação ao consórcio obtido por Lazaro (2009) pode ser atribuído ao fato de que, neste estudo, o consórcio bacteriano fotoheterotrófico foi obtido a partir de uma região da coluna de Winogradski específica para bactérias PNS, e embora outros micro-organismos possam estar presentes nesta região, a ausência de condições ótimas para o desenvolvimento dos mesmos pode favorecer a predominância de bactérias PNS, conforme pode ser explicado por Carvalho et al. (2007).

5.3 PRODUÇÃO DE H_2 - ESCOLHA DO FOTOBIOREATOR

Para o acompanhamento do crescimento microbiano e produção de H_2 , na presença de luz, foram confeccionados e testados três fotobiorreatores.

Observou-se que para o primeiro tipo fotobiorreator confeccionado – volume útil de 500 mL, contendo 300 mL de meio, coleta de gás através de frasco invertido e medição do gás produzido através da determinação do volume de NaOH deslocado - o longo percurso entre o fotobiorreator e o sistema de medição de gás pode ter contribuído para a que ocorresse perda de gás no sistema.

Para ao segundo fotobiorreator, adotou-se a medição do gás produzido através do deslocamento de ar do interior do fotobiorreator. Observou-se que talvez por perdas no percurso do gás, o método de deslocamento da coluna de ar, para medir o volume de gás produzido

não foi efetivo. Embora trabalhos prévios realizados por Lamaison (2009), Cappelletti (2009) e Castro (2009), tenham sido bem sucedidos na produção e determinação de H_2 em biorreatores de 500 mL, quando utilizados para a produção de H_2 por fermentação escura, estes não puderam ser utilizados para os ensaios deste trabalho.

Através de cálculos do volume teórico de H_2 (em reatores de 500 mL), usando as equações estequiométricas apresentadas na Tabela 10, observou-se que quando a fonte de carbono utilizada foi ácido acético, o volume máximo teórico seria de 1,34 L de H_2 , para ácido butírico 1,68 L e para ácido málico 1,01 L. Estes valores deveriam ser medidos nos biorreatores confeccionados.

Contudo, a impossibilidade de utilização dos fotobiorreatores confeccionados anteriormente pode ser atribuído às velocidades de produção de H_2 alcançadas na fotofermentação, serem inferiores às da fermentação não dependente de luz. Após uma batelada de experimentos em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura observou-se, neste trabalho, que a velocidade de produção de H_2 na fotofermentação foi de 0,9 mL H_2 /L.h, enquanto Cappelletti (2009) obteve uma velocidade de produção de 13,84 mL/L.h, na fermentação não dependente de luz. Assim, optou-se por utilizar o sistema de tubos de ensaio para os ensaios de produção de H_2 , utilizando frascos de sacrifício, para a coleta de amostras e determinação do volume de H_2 produzido, conforme detalhado no item 4.10.

5.4 PREPARO DO INÓCULO

A Figura12 apresenta o crescimento da biomassa do consórcio fotoheterotrófico, usando como fontes de carbono e nitrogênio, ácido málico (30 mmol/L) e glutamato de sódio (4 mmol/L), respectivamente.

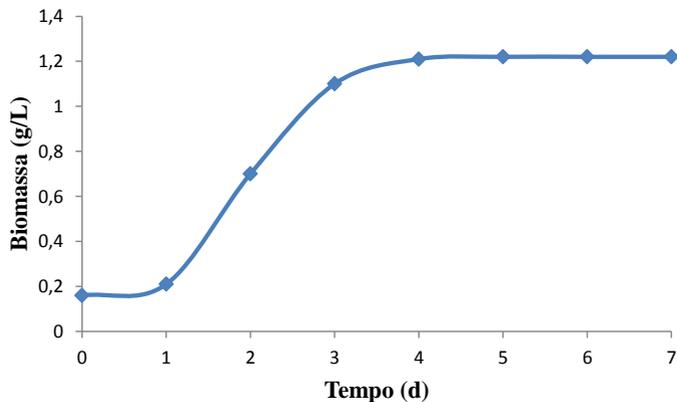


Figura 12 - Crescimento da biomassa do consórcio fotoheterotrófico empregando ácido málico como substrato nos ensaios de preparação do inóculo.

A Figura 12 mostra que ocorre uma fase *lag* com duração aproximada de 1 dia. A fase exponencial de crescimento prosseguiu até o segundo dia, sendo que a partir do terceiro dia estabeleceu-se uma fase estacionária de crescimento bacteriano. Este experimento foi realizado com o objetivo de verificar qual seria o tempo de incubação correspondente ao final da fase exponencial de crescimento. Segundo Sasikala et al. (1991) e Nakada et al. (1999) o período entre o meio e o final da fase exponencial de crescimento bacteriano corresponde a idade ideal para o inóculo, utilizado nos ensaios de produção de H_2 . Assim, na etapa de preparação de inóculo, optou-se por trabalhar com um período de incubação de 3 dias.

5.5 ENSAIOS DE PRODUÇÃO DE H_2

Os ensaios de produção de H_2 foram realizados em três etapas, conforme descrito na seção de material e métodos. Para facilitar a compreensão, os resultados de cada uma destas etapas serão discutidos separadamente nos próximos itens.

A utilização cultura de referência, previamente utilizada por Lazaro (2009) permitiu trabalhar com uma cultura cuja atividade de produção de H_2 já havia sido testada e assim padronizar as condições adequadas tanto para o crescimento, produção de hidrogênio e a sua medição utilizando os fotobiorreatores escolhidos neste trabalho.

Através da utilização da cultura de referência se observou que era possível quantificar a produção de H_2 nos tubos de ensaio, mesmo quando esta foi da ordem de microlitros (μL). Assim, considerou-se esta etapa como uma padronização do sistema

A Figura 13 apresenta a produção de biomassa e de H_2 obtidos com a cultura de referência no ensaio de padronização do sistema utilizado para produção de H_2 .

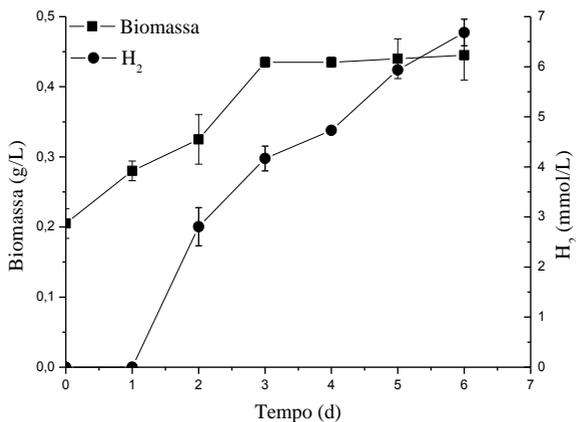


Figura 13 - Produção de biomassa e de H_2 pela cultura de referência em função do tempo de cultivo, empregando ácido málico como substrato carbônico.

Na fase *lag* ou fase de latência, o crescimento celular é nulo devido as adaptações das células (MÜLLER, 2007). Esta fase não foi observada neste trabalho, e isto pode ser devido ao fato do meio de cultura utilizado na produção de H_2 possuir a mesma composição que o meio de cultura utilizado no inóculo e, portanto, a cultura pode já estar adaptada ao meio de crescimento. Através da Figura 13 pode-se observar que o crescimento celular foi linear até o terceiro dia de cultivo, onde a concentração da biomassa variou de $0,21 \pm 0,02$ até $0,44 \pm 0,03$ g/L. Nesta fase linear de crescimento a velocidade foi de $0,07$ g/L.d. Após este período a biomassa manteve-se constante até o sexto dia de cultivo, caracterizando a fase estacionária de crescimento, onde a velocidade de crescimento é nula.

Em relação à produção de H_2 observa-se que esta iniciou-se após o primeiro dia de cultivo e que a velocidade de produção de H_2 foi maior nos dias iniciais (1 a 3 dias) e decresceu ao final do experimento. Contudo, a produção de H_2 não atingiu o estado estacionário em 6 dias cultivo. Um aumento nas concentrações de H_2 produzido durante fase estacionária de crescimento bacteriano era esperado, uma vez que a produção de H_2 , por bactérias PNS é resultante do excesso de elétrons provenientes da oxidação dos ácidos orgânicos é utilizado para a redução de prótons para a produção de H_2 , por atividade da enzima nitrogenase, na ausência de nitrogênio, de acordo com as condições experimentais (GOLOMYSOVA et al., 2010).

Nos ensaios de produção de H_2 espera-se um baixo crescimento bacteriano, uma vez que o meio de cultura apresenta limitação da fonte de nitrogênio. Esta limitação consiste em proporcionar condições para que as bactérias presentes no consórcio bacteriano fotoheterotrófico desviem o seu caminho metabólico, usando o excesso de elétrons proveniente da oxidação do ácido orgânico e o ATP sintetizado a partir da fotossíntese anoxigênica (que foi possibilitada pelo fornecimento de luz) para a produção de H_2 . Porém, é importante que a biomassa bacteriana utilize uma parte do substrato para as suas atividades metabólicas, uma vez que a enzima nitrogenase é de fundamental importância para a geração de H_2 e sofre inibição irreversível na presença de O_2 . Assim, a produção de biomassa no fotobiorreator, onde a atmosfera é anaeróbia, possibilita a síntese de novas nitrogenases, o que pode contribuir para obtenção de melhores rendimentos no processo (Koku et al., 2002).

Lazaro (2009) estudou a produção de H_2 através do consórcio bacteriano fotoheterotrófico utilizado como cultura de referência, neste trabalho, e obteve uma velocidade média de produção de biomassa de 0,18 g/L.d, quando as fontes de carbono e nitrogênio empregadas foram ácido málico (15 mmol/L) e glutamato de sódio (2 mmol/L), respectivamente. Sob as mesmas condições, no presente trabalho, a velocidade média de produção de biomassa para este consórcio foi de 0,04 g/L.d. Porém, Lazaro (2009) trabalhou com uma intensidade luminosa de 10.000 lux, e neste trabalho empregou-se 7 000 lux, e isto pode ter interferido no crescimento bacteriano.e na produção de H_2 .

Neste trabalho, a produção máxima de H_2 foi de $6,68 \pm 0,26$ mmol/L, no 6º dia. Este valor é superior ao encontrado por Lazaro (2009), que obteve 3,5 mmol/L em 20 dias, sendo que o início da produção de H_2 iniciou a partir do terceiro dia de cultivo. Assim, embora o crescimento bacteriano tenha apresentado valores inferiores

aos de Lazaro (2009), a produção de H₂ foi favorecida. Isto pode ser explicado pelas diferentes intensidades luminosas aplicadas nos estudos.

Barbosa et al. (2001) estudaram duas intensidades luminosas diferentes (43 e 680 μmol/m²s) e observaram que o aumento de intensidade luminosa resultou em menores rendimentos na produção de H₂. Segundo os autores, quando se utiliza altas intensidades luminosas, a biomassa tende a crescer mais rapidamente, atingindo concentrações elevadas e, como conseqüência, a penetração da luz pode ser dificultada pelo excesso de biomassa. Assim, a velocidade de produção de H₂ sofre um declínio, mesmo com o substrato disponível. Isto pode explicar os resultados obtidos neste estudo, uma vez que foi empregada uma menor intensidade luminosa e obteve-se uma menor biomassa e uma maior produção de H₂, em comparação com o estudo de Lazaro (2009).

Neste trabalho, a intensidade luminosa não foi uma das variáveis estudadas. Uma vez que os efeitos da intensidade luminosa, sobre a produção de H₂, por bactérias PNS, já estão descritos na literatura (ARGUN e KARGI, 2010), e os resultados são bastante diversos (SASIKALA et al., 1991; ANDRADE, 2007; TAO et al., 2008), pode-se observar que as intensidades luminosas empregadas (4.000 lux para a fase de enriquecimento de biomassa e 7.000 lux nos ensaios de produção de H₂), mostraram-se adequadas, uma vez que foi possível observar um aumento na biomassa bacteriana e a produção de H₂. Além disso, estas intensidades luminosas estão de acordo com os valores encontrados por Basak e Das (2007). Segundo os autores é aconselhável utilizar para o crescimento da biomassa (inóculo) uma intensidade luminosa de 4.000 a 6.000 lux e de 6.000 a 10.000 lux, para produção de H₂ em ambientes anaeróbios.

Sasikala et al. (1991), avaliaram a produção de H₂ em diferentes intensidades luminosas, usando uma cultura de *Rhodobacter sphaeroides* O.U. 001 e observaram que a produção de H₂ aumentou de 26, 67 μL/L para 1.000 μL/L quando a intensidade luminosa aumentou de 1.000 lux para 5.000 lux, após esse valor a produção observada não se alterou para as intensidades testadas de 7.500 e 10.000 lux. Porém, em um estudo Andrade (2007) avaliando o efeito da intensidade luminosa na produção de H₂ por *Rhodospseudomonas palustris* observou-se que a velocidade específica de produção de H₂ aumentou de 1,0 mL H₂/gx.h sob intensidade de 4.000 - 5.000 lux para de 10,6 mL H₂/gx.h na intensidade de 9.000 - 10.000 lux e, na ausência de luz o autor não observou produção de H₂.

Tao et al. (2008) avaliaram o efeito da intensidade luminosa (1.500 a 7.000 lux) na produção de H₂, usando uma cultura

fotoheterotrófica. Os autores observaram que as maiores velocidades de produção foram obtidas na faixa de 4.000 e 5.000 lux (87,04 e 88,94 mL H₂/L.h, respectivamente). Na intensidade de 1.500 lux obtiveram as menores velocidades de produção (38,25 mL H₂/L.h) e na intensidade de 7.000 lux obteve-se uma velocidade de 84,57 mL H₂/L.h, sendo esta menor que a obtida a 5.000 lux. Segundo os autores este aumento de velocidade verificado entre as intensidades de 1.500 lux e 4.000/5.000 lux pode ter ocorrido devido ao fato de que maiores intensidades luminosas fornecem uma maior número de ATP e poder redutor para o sistema fotossintético, condição esta necessária para a produção de H₂. Porém em intensidades luminosas mais elevadas, pode ter ocorrido uma saturação luminosa, devido ao excesso de ATP em relação à capacidade do sistema nitrogenase. A atividade da nitrogenase e conseqüentemente a produção de H₂ sofre um declínio quando ocorre a saturação luminosa. Porém a intensidade luminosa na qual pode ocorrer a saturação luminosa varia muito de uma cultura para outra. Zhu et al. (1999) observaram que a saturação luminosa ocorreu quando foram empregadas intensidades luminosas acima de 14.000 lux em culturas de *Rhodobacter sphaeroides*.

Através da análise de variância (ANOVA) constatou-se que não houve diferença significativa entre as réplicas das medidas de concentração de H₂ ($p > 0,05$), desconsiderando-se a influência do erro experimental sobre os resultados. Porém, o aumento observado da produção de H₂ ao longo do tempo, observado na Figura 13, foi estatisticamente significativo ($p < 0,05$).

5.5.1 Estudos preliminares de produção de H₂ utilizando o consórcio obtido neste estudo

A literatura reporta que as bactérias PNS podem produzir H₂ utilizando ácidos orgânicos como substrato (FANG et al., 2005; CHEN et al., 2008; SUWANSAARD et al., 2009; NATH et al., 2008). Neste trabalho, para verificar se o consórcio bacteriano fotoheterotrófico obtido através da coluna de Winogradski era produtor de H₂, utilizaram-se três diferentes ácidos orgânicos como fonte de carbono (ácidos acético, butírico e málico), sendo possível observar a produção do gás nos três substratos testados, como observa-se nas Figuras 14 a 16. A Figura 14 apresenta a produção de biomassa e de H₂ pelo consórcio bacteriano fotoheterotrófico empregando-se o acético como substrato carbônico.

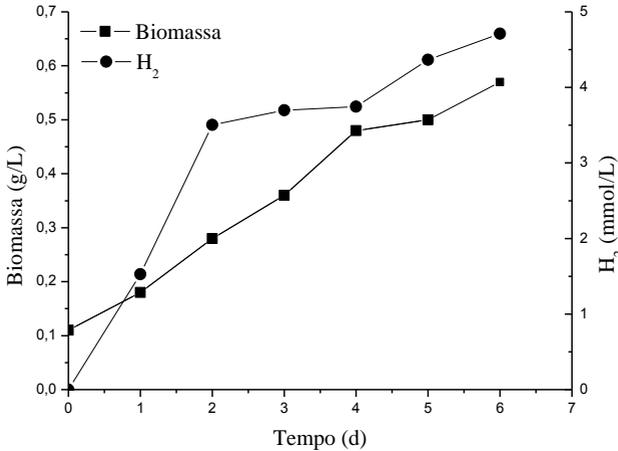


Figura 14 - Produção de biomassa e de H₂ pelo consórcio bacteriano fotoheterotrófico em função do tempo de cultivo, na presença de ácido acético como substrato carbônico.

Analisando a Figura 14 observa-se que a produção de biomassa não apresentou uma fase *lag*, sendo que o crescimento apresentou um crescimento linear até o quarto dia de cultivo, com uma velocidade de 0,092 g/L.d. Após este período, o crescimento continua porém com uma menor velocidade (0,07 g/L.d). Não foi observada uma fase estacionária de crescimento em 6 dias de cultivo. A biomassa variou de 0,11 g/L (inicial) para 0,57 g/L, em 6 dias de cultivo. A produção de H₂ iniciou antes de 24 h de cultivo. Porém, como os pontos experimentais foram coletados a cada 24 h, não é possível determinar exatamente em que tempo a produção de H₂ teve início. Em relação a produção de H₂, observa-se que a mesma ocorreu com maior intensidade no início do cultivo, sendo linear até o segundo dia, com uma velocidade de 1,75 mmol/L.d. Após a segundo dia a velocidade de produção de H₂ sofreu uma redução (0,36 mmol/L.d). A produção máxima foi de 4,71 mmol/L em 6 dias de cultivo. A fase estacionária de produção de H₂ não foi observada em 6 dias de cultivo.

O fato da velocidade de produção de H₂ ter sido maior no início do cultivo, pode ser uma característica do substrato. Hustede et al. (1993), acompanhara a produção de H₂ e PHB por uma cultura fotoheterotrófica e observaram que o ácido acético apresentou-se como um substrato pobre na produção de H₂.

A Figura 15 apresenta a produção de biomassa e de H₂ pelo consórcio bacteriano fotoheterotrófico nos ensaios empregando ácido butírico como substrato carbônico.

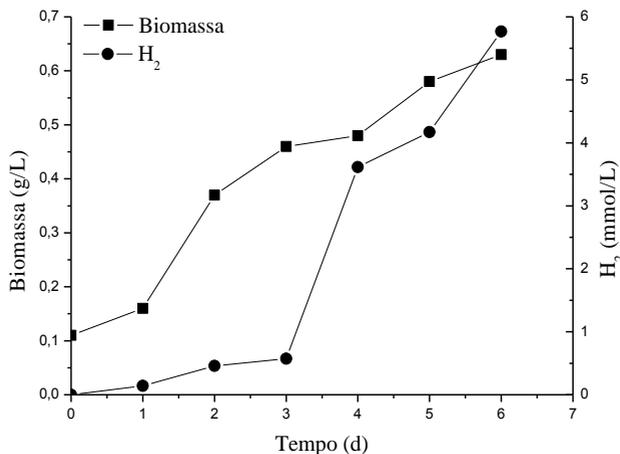


Figura 15 - Produção de biomassa e de H₂ pelo consórcio fotoheterotrófico em função do tempo de cultivo, empregando ácido butírico como substrato carbônico.

A produção de biomassa também não apresentou uma fase *lag* de crescimento quando o substrato utilizado foi o ácido butírico. Porém para ácido butírico observa-se uma fase exponencial até o terceiro dia, onde a velocidade de crescimento na fase exponencial foi de $0,53 \text{ d}^{-1}$. A partir deste período observa-se uma fase linear de crescimento, onde a velocidade foi de $0,075 \text{ g/L.d}$. A biomassa inicial ($0,11 \text{ g/L}$) aumentou para $0,63 \text{ g/L}$, em seis dias de cultivo. A Figura 15 mostra, ainda, que a produção de H₂ se iniciou antes 24 h de cultivo. Porém esta produção foi muito pequena, quando comparada ao obtido no ensaio anterior (presença de ácido acético - Figura 14).

É possível observar que a produção de H₂ durante a fase exponencial de crescimento foi muito pequena, o que estaria de acordo com o esperado. Sasikala et al. (1995) estudaram a produção de H₂ usando *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001 e também observaram que a produção de H₂ foi muito pequena durante a fase exponencial de crescimento, sendo que a mesma aumentou consideravelmente na fase estacionária de crescimento celular. Porém, neste trabalho não foi

observada uma fase estacionária, tanto de crescimento celular quanto de produção de H_2 . O que pode-se observar foi uma produção muito pequena até o terceiro dia (0,20 mmol/L.d), sendo que entre o terceiro dia quarto dia a produção aumentou muito (3,04 mmol/L.d). A partir do quarto dia a velocidade de produção passou a apresentar um comportamento linear, com uma velocidade de 1,08 mmol/L.d. A produção máxima de 5,77 mmol/L, em 6 dias de cultivo.

Na Figura 16 apresenta-se a produção de biomassa e de H_2 pelo consórcio bacteriano fotoheterotrófico em função do tempo de cultivo, nos ensaios empregando-se ácido málico como substrato carbônico.

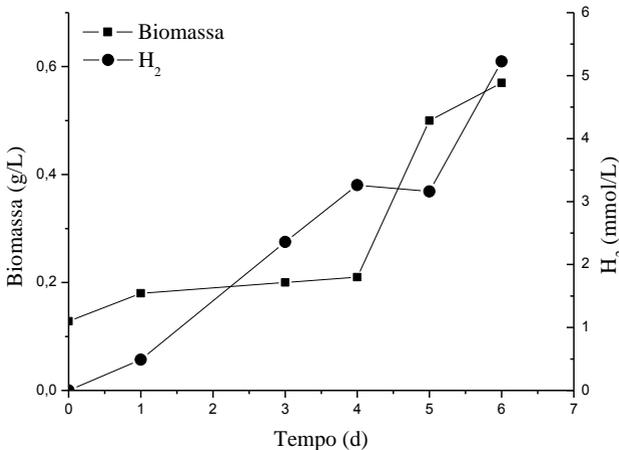


Figura 16 - Produção de biomassa e de H_2 pelo consórcio fotoheterotrófico em função do tempo de cultivo, empregando ácido málico como substrato carbônico.

Quando o ácido málico foi o substrato, observou-se que a biomassa apresentou pouco aumento até o quarto dia de cultivo (0,02 g/L.d) sendo que após este período, houve aumento acentuado da velocidade de crescimento (0,29 g/L.d) entre os dias 4 e 5. Após o quinto dia a velocidade de crescimento sofreu um declínio para 0,07 g/L.d. Desta forma, a curva de produção de biomassa mostra uma fase de adaptação da cultivo ao meio de produção, não observada para os outros substratos. A biomassa inicial (0,11 g/L) atingiu o valor de 0,57 g/L, ao final do experimento (sexto dia).

Conforme se observa na Figura 16, a produção de H_2 , parece ter iniciado antes de 24 h de cultivo, sendo que mesma segue uma fase linear de crescimento até o quarto dia, com uma velocidade de 0,84 mmol/L.d. Entre os dias 4 e 5 ocorre uma estabilização da velocidade, sendo que a mesma volta a aumentar a partir do quinto dia. Não foi observada fase estacionária de crescimento celular nem de produção de H_2 . Quando o ácido málico foi empregado como substrato a máxima produção obtida foi de 5,23 mmol/L em 6 dias de cultivo.

Embora diversos trabalhos relatarem a possibilidade do uso de diferentes substratos para a produção de H_2 via metabolismo fotoheterotrófico, não está definido qual substrato pode ser utilizado por cada espécie e nem qual, dentre todos, e o que proporciona a maior geração de H_2 . Segundo Koku et al. (2002) a eficiência de alguns substratos depende de fatores tais como a atividade do ciclo dos ácidos tricarbóxicos, da relação C/N, estado de redução do substrato e potencial de conversão do substrato em metabólicos alternativos, como o PHB (polihidroxibutirato).

Barbosa et al. (2001) estudaram três diferentes culturas de bactérias fototróficas (*Rhodospseudomonas* sp, *Rhodospseudomonas palustris* e uma outra não identificada) na produção de H_2 , empregando quatro fontes diferentes de carbono (lactato, malato, acetato e butirato). Nas condições do estudo, os autores não observaram produção de H_2 usando ácido butírico, quando a bactéria empregada foi *Rhodospseudomonas palustris*. Desta forma, é importante a utilização de diferentes fontes de carbono nos estudos onde o micro-organismo empregado não é conhecido, como é o caso do consórcio bacteriano fotoheterotrófico utilizado no presente estudo, onde foram empregados os ácidos acético, butírico e málico como substrato, sendo que todos eles mostraram potencial para serem utilizados como substratos na produção de H_2 .

Tao et al. (2008) isolaram de águas residuárias, quatro culturas fotoheterotróficas (ZX-2, ZX-3, ZX-4 e ZX-5) e avaliaram o potencial das mesmas na produção de H_2 , empregando diferentes fontes de carbono : succinato (50 mmol/L), malato (30 mmol/L), acetato (35 mmol/L) e butirato (50 mmol/L). Todas as culturas foram capazes de crescer e produzir H_2 usando succinato e malato. Porém, ZX-2 e ZX-4 não utilizaram acetato para crescer e produzir H_2 , assim como ZX-4 também não usou o butirato, ao contrário do observado nestes estudos, o consórcio bacteriano fotoheterotrófico isolado foi capaz de utilizar tanto o acetato quanto o butirato na produção de H_2 .

5.5.2 Ensaio ampliado de crescimento e produção de H_2 utilizando o consórcio obtido neste estudo

Conforme foi observado nos estudos preliminares, cujos resultados foram apresentados nas Figuras 14 a 16, o estado estacionário de produção de H_2 não foi alcançado. Assim, os ensaios foram repetidos, em duplicata e o tempo de cultivo foi ampliado para 11 dias. Nesta etapa, optou-se por trabalhar apenas com os ácidos acético e butírico como substrato, por serem os de maior interesse para este estudo, uma vez que são sub-produtos de fermentações não dependentes de luz e poderiam ser empregados na fotofermentação em um sistema acoplado de produção de H_2 .

A Figura 17 apresenta a produção de biomassa e de H_2 pelo consórcio fotoheterotrófico em função do tempo de cultivo usando ácido acético como substrato carbônico.

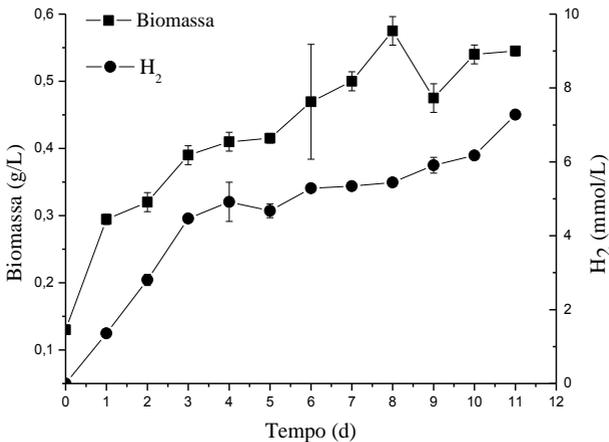


Figura 17 - Produção de biomassa e de H_2 pelo consórcio fotoheterotrófico em função do tempo de cultivo empregando o ácido acético como substrato carbônico.

Através dos resultados apresentados na Figura 17, é possível observar que a velocidade de crescimento é maior no primeiro dia de cultivo e que diminui com o passar do tempo. A ausência de uma fase exponencial de crescimento bacteriano pode ser devido a limitação de nutrientes no meio de cultura, como a fonte de nitrogênio (glutamato de sódio), por exemplo. Quando o ácido acético foi utilizado como

substrato o máximo acúmulo de biomassa foi de 0,50 g/L em 7 dias de cultivo, com uma velocidade média de crescimento bacteriano de 0,05 g/L.d. Em relação a produção de H₂ pode-se observar que a produção de H₂ ocorreu paralelamente com a produção de biomassa, sendo que a produção de H₂ iniciou antes das primeiras 24 h de cultivo. Porém, como pontos experimentais foram coletados a cada 24 h, não é possível afirmar em que tempo esta produção iniciou. A produção de H₂ foi mais acentuada até o terceiro dia de cultivo, onde a velocidade de 1,48 mmol/L.d, após este período a velocidade de produção sofreu um declínio, sendo que a mesma foi constante e igual a 0,31 mmol/L.d., até o final do experimento. A produção máxima de H₂ (7,28 mmol/L) foi observada aos 11 dias de cultivo.

O declínio na velocidades de produção do gás pode estar relacionado ao desvio da rota metabólica para a produção de PHB ou polissacarídeo, devido às mudanças nas condições de cultivo (KOKU et al., 2003). No caso deste estudo, é importante levar em consideração que o mesmo foi realizado utilizando um consórcio bacteriano fotoheterotrófico isolado pelo autor, sendo que não foram realizados estudos anteriores com o mesmo e, portanto, as condições de cultivo retiradas da literatura e usadas neste estudo podem não ter sido as mais adequadas para as espécies que compõem o consórcio. Portanto, para estudos futuros, é importante estudar variáveis que podem influenciar na produção de H₂ por fotofermentação, tais como: pH inicial do meio de cultivo, concentração de inóculo, idade do inóculo, intensidade luminosa e concentração das fontes de carbono e nitrogênio.

A uniformidade da intensidade luminosa fornecida ao sistema é outro fator que pode ter contribuído para o declínio da velocidade de produção de H₂. Segundo Koku et al (2003) um dos maiores desafios na produção fotoheterotrófica de H₂ é a questão da distribuição uniforme da intensidade luminosa e a penetração da luz nos fotobiorreatores. Como neste trabalho optou-se por utilizar tubos de ensaios com frascos de sacrifício diário, os frascos foram remanejados diariamente, o que pode ter resultado em uma variação na intensidade luminosa fornecida. Embora as lâmpadas fluorescentes fornecessem uma intensidade luminosa média de aproximadamente 7.000 lux, esta intensidade variava em diferentes pontos (nas extremidades a intensidade era um pouco menor).

Outro fator que pode ter influenciado na redução das velocidades é a pressão do sistema. Segundo Li et al. (2011) a redução na pressão total do sistema aumenta a diferença de pressão entre as fase líquida e a fase gasosa no *head space* do fotobiorreator, que por sua vez pode

aumentar a remoção do gás da fase líquida para a gasosa. Uma vez iniciada a produção, o gás se desprende mais facilmente da fase líquida para a fase gasosa, o que pode contribuir para o aumento da produção de H_2 . Como o sistema utilizado para a produção de H_2 neste trabalho era um sistema fechado, a pressão do sistema pode ter aumentado ao longo do tempo devido à produção de gases (H_2 e CO_2), e isto pode ter contribuído para a redução das velocidades de produção de biomassa e H_2 .

Segundo Dixon e Kell (1989) apud Li et al. (2011) o CO_2 também pode atuar como um inibidor, levando a inibição do crescimento ou lise celular. Liu et al. (2010) observaram que a separação do CO_2 do sistema de reação pode estimular a produção de H_2 no processo de fotofermentação. Os autores observaram que a separação do CO_2 no sistema aumentou o rendimento de produção de H_2 de 12,80 para 18,85 %. Como o sistema utilizado para a produção de H_2 neste trabalho era um sistema fechado, o CO_2 produzido pode ter atuado como um inibidor na produção de H_2 .

A Figura 18 apresenta o aumento da biomassa do consórcio bacteriano fotoheterotrófico e a produção de H_2 usando ácido butírico como substrato carbônico.

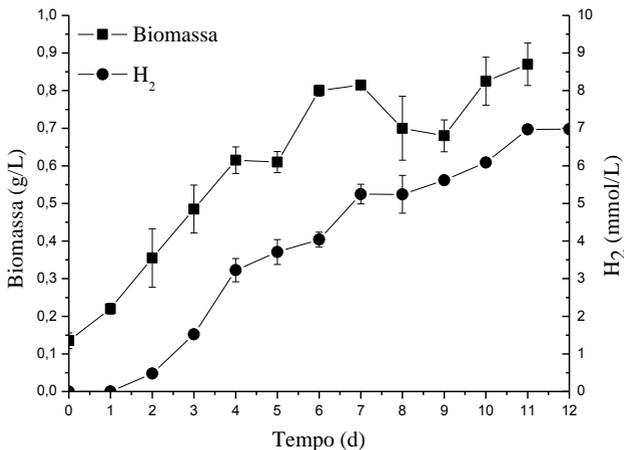


Figura 18 - Produção de biomassa e de H_2 pelo consórcio fotoheterotrófico em função do tempo de cultivo empregando o ácido butírico como substrato carbônico.

Em relação a produção de biomassa, observa-se que assim como ocorreu com o ácido acético, não foi observada uma fase exponencial de crescimento bacteriano. A ausência da fase exponencial de crescimento bacteriano pode ser devido a limitação de nutrientes no meio de cultivo, como a fonte de nitrogênio (glutamato de sódio), por exemplo. O máximo acúmulo máximo de biomassa (0,87 g/L) foi observado em 11 dias de cultivo com uma velocidade média de crescimento bacteriano 0,07 g/L.d, considerando 11 dias de cultivo.

Em relação a produção de H₂ pode-se observar que a produção iniciou entre o período de 24 h a 48 h de cultivo. Porém, como pontos experimentais foram coletados a cada 24 h, não é possível afirmar em que tempo esta produção iniciou. Observa-se que assim, como ocorreu com o ácido acético, a produção de H₂, em ácido butírico, ocorreu paralelamente à produção de biomassa. Porém para o ácido butírico observou-se uma fase *lag* de produção de H₂ de aproximadamente 24 h. Após este período a produção de H₂ passou a ser de 1,37 mmol/L.d até o quarto dia de cultivo, a partir do qual a velocidade sofreu um declínio e foi constante e igual a 0,48 mmol/L.d até o décimo primeiro dia de cultivo. A máxima produção de H₂ (6,97 mmol/L) foi observado aos 11 dias de cultivo.

A Tabela 11 apresenta a produção de H₂, a velocidade de produção de H₂, o rendimento e a eficiência nos ensaios ampliados utilizando ácido acético e butírico como substrato.

Tabela 11 - Produção de H₂, rendimento (R) e eficiência de conversão empregando os ácidos acético e butírico como substrato.

Substrato	H₂* (mmol/L)	R* (molH ₂ /molSubstrato)	Eficiência* (%)
Ácido acético	7,28	0,24	6,06
Ácido butírico	6,97	0,46	4,65

* Valores referentes ao tempo 11 dias de cultivo.

A produção de H₂ foi favorecida quando o substrato foi o ácido acético, conforme apresenta a Tabela 11. Através desta Tabela também é possível observar que o ácido butírico apresentou um maior rendimento, porém a maior eficiência de conversão foi apresentada pelo ácido acético. Segundo Andrade (2007) dois critérios são frequentemente

usados para avaliar o desempenho da produção biológica de H_2 , a partir de um substrato específico. O primeiro refere-se à velocidade de produção de hidrogênio (quantidade/tempo) com base na concentração de biomassa ou peso seco bacteriano e o segundo, refere-se a eficiência de conversão do substrato em H_2 . O ácido acético apresentou uma maior velocidade específica de produção de H_2 (5,96 mL/gx.h) e maior eficiência (6,06 %) que o ácido butírico que apresentou uma velocidade específica de 2,77 mL/gx.h e uma eficiência de 4,65 %.

A fim de determinar se havia diferença estatisticamente significativa entre a produção de H_2 , a partir dos dois ácidos, comparou-se os dados experimentais através da análise de variância, do 11^o dia de fermentação (que correspondem a concentração máxima de H_2 , nas condições de estudo). Os diferentes substratos não geraram resultados com diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$). Assim, pode-se dizer que ambos os substratos mostraram-se estatisticamente iguais, não havendo favorecimento na produção de H_2 para nenhum dos ácidos orgânicos empregados como substratos neste trabalho.

O fato de ambos os ácidos terem apresentados potencial para serem utilizados como substratos na produção de H_2 , torna os resultados ainda mais interessantes, uma vez que ambos são os intermediários presentes em maiores concentrações nos efluentes oriundos de digestão anaeróbia. Além disso, a aplicação de sistemas integrados de produção de H_2 (digestão anaeróbia + fotofermentação) é vista por muitos pesquisadores como uma alternativa promissora no aumento de rendimento nos processos biológicos de produção de H_2 .

Os valores de velocidade específica, rendimento e eficiência de conversão reportados na literatura variam muito de um estudo para outro, conforme a espécie e substrato utilizado. Zürrer e Bachofen (1979) estudaram a produção fotoheterotrófica de H_2 em culturas em *Rhodospirillum rubrum* S-1, com intensidade luminosa de 10.000 lux. Velocidades de produção de 69,64 mmol/L.d foram alcançadas, utilizando glutamato (15 mmol/L) como fonte de nitrogênio e lactato (50 mmol/L) como doador de elétrons. Uyar et al. (2009) acompanharam a produção de H_2 e por *Rhodobacter capsulatus* usando como substrato efluente da digestão anaeróbia por um período de 10 dias. Os autores obtiveram uma produção de 61,17 mmol/L, no final dos 10 dias de cultivo, sendo que velocidade de produção máxima foi de 20,36 mmol/L.h.

Os valores obtidos por Zürrer e Bachofen (1979) e Uyar et al. (2009) são superiores aos obtidos neste estudo, onde obteve-se uma produção máxima de 7,28 mmol/L usando o ácido acético e 6,97

mmol/L com usando o ácido butírico. Embora os valores obtidos sejam inferiores aos autores acima citados, é interessante observar que a utilização de cultura pura é impraticável em termos industriais.

Fang et al. (2005) avaliaram a produção de H_2 por um consórcio bacteriano, utilizando acetato (17 mmol/L) e butirato (9 mmol/L) como substrato. Os experimentos foram conduzidos a 32°C e sob intensidade luminosa de 10 000 lux. Foram obtidos rendimentos de 2,5 mol H_2 /mol acetato, em pH inicial 8,0 e 3,7 mol H_2 /mol butirato em pH inicial 9,0 tratando de butirato. Sendo estes valores superiores aos encontrados neste estudo, que obteve rendimento de 0,24 mol H_2 /mol acetato e 0,46 mol H_2 /mol butirato. Porém nos estudos realizados por Fang et al. (2005), as condições de pH inicial do meio de cultivo e concentração da fonte de carbono foram otimizadas para o consórcio de bactérias em estudo, o que pode ter contribuído para os maiores rendimentos.

Eroglu et al. (2010) estudaram a produção de H_2 usando *Rhodobacter sphaeroides*, usando água residuária da indústria de azeite de oliva e obteve uma velocidade específica de 2,37 mL H_2 /gx.h, sendo esta menor que a obtida neste estudo 5,96 mL H_2 /gx.h, para o ácido acético e 2,77 mL H_2 /gx.h para o ácido butírico. Em relação a este estudo vale apenas ressaltar que mesmo empregando um consórcio bacteriano fototrófico é possível obter valores equivalentes aos obtidos usando cultura pura.

Lazaro (2009) empregando um consórcio bacteriano fototrófico para a produção de H_2 , obteve as concentrações de 3,1 mmol /L para ácido butírico e 1,7 mmol /L para ácido acético, sendo estes valores inferiores aos obtidos neste estudo, que obteve uma produção de $6,97 \pm 0,01$ mmol /L para o ácido butírico e $7,28 \pm 0,05$ mmol/L para o ácido acético. Além disso, neste estudo, o ácido acético foi o substrato que apresentou as maiores concentração de H_2 , o que difere dos resultados obtidos por Lazaro (2009). Porém, estudos realizados por Srikanth et al. (2009) avaliaram a produção de H_2 usando consórcio bacteriano obtido do sedimento de um lago e observaram que o ácido acético apresentou uma maior produtividade em H_2 (3,51 mol/kgDQO.d) quando comparados com o ácido butírico (3,33 mol/kgDQO.d).

Suwansaard et al. (2009) estudando 5 diferentes culturas (SL2, SL3, SL15, SL 24 e TN1) isoladas a partir do lago Songkhla. Todos os ensaios foram realizados empregando ácido acético (20 mmol/L) como substrato e os resultados obtidos variam de uma cultura para outra: a cultura SL24 apresentou a maior velocidade específica (0,05 mL H_2 /gx.h), o menor rendimento (0,09 mol H_2 /mol acetato) e menor

eficiência de conversão (2,23 %). As demais culturas obtiveram velocidades específicas iguais entre si (0,03 mL H₂/gx.h) porém, a cultura TN1 apresentou o maior rendimento (1,85 mol H₂/mol acetato) e a maior eficiência de conversão (46,31 %), seguida pela SL2 (1,37 mol H₂/mol acetato e 34,17 %), SL3 (1,09 mol H₂/mol acetato e 27,34 %) e SL15 (0,56 mol H₂/mol acetato e 13,91 %). O estudo realizado pelos autores mostra de forma clara como cada cultura pode apresentar preferências nutricionais diferentes. A velocidade específica obtida, neste estudo, foi maior que a observada por estes autores, embora o rendimento e eficiência tenham sido superiores somente aos valores obtidos com a cultura SL24. Os autores atribuíram o baixo rendimento e eficiência às alterações bruscas de pH que ocorreram no meio de cultura. Eles observaram que para as culturas onde a elevação do pH foi maior, a eficiência de produção de H₂ foi menor. A cultura SL24 foi a que apresentou a maior variação de pH (7,0 a 9,48). Já a cultura TN1 apresentou uma variação de pH muito pequena (7,0 a 7,05). Segundo os autores, as menores eficiências apresentadas em pH mais elevados se deve ao fato dos mesmos não serem adequados para as nitrogenases, que são as enzimas responsáveis pela produção de H₂ nas bactérias PNS.

Porém estas alterações bruscas de pH não foram observadas neste estudo, embora para o ácido butírico nos dia 4 e 5 de cultivo o pH tenha alcançado valores acima de 8,2, como pode ser observado na Figura 19.

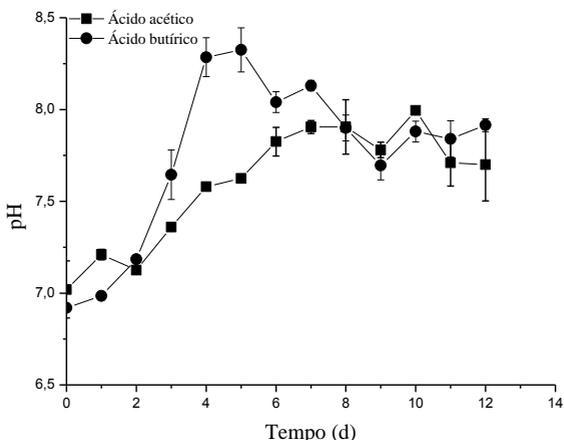


Figura 19 - Comportamento do pH durante a produção de H₂ empregando os ácidos acético e butírico como substrato carbônico.

A variação do pH foi menor nos ensaios empregando o ácido acético como substrato, onde o pH variou de $7,02 \pm 0,16$ até $7,70 \pm 0,19$ e para o ácido butírico esta variação foi de $7,02 \pm 0,16$ para $7,92 \pm 0,035$, porém pode-se observar que entre os dias 4 e 5 o pH apresentou valores de pH acima de 8,0 para o ácido butírico.

Fang et al. (2005), estudando a produção de H_2 por uma consórcio fotoheterotrófico, obtiveram uma variação de pH de 7,0 a 7,3, quando o ácido acético foi empregado como fonte de carbono. Para o ácido butírico o pH variou de 7,0 a 6,5. O comportamento do pH deste estudo não foi o mesmo observado pelos autores acima citados. Ao contrário observou-se uma elevação do pH.

Porém, Tao et al. (2008) acompanharam a produção de H_2 por uma cultura fotoheterotrófica isolada de água residuária e identificada como *Rhodobacter sphaeroides*, durante 72 h e observaram que a variação do pH foi de 7,0 a 7,08, sendo que neste estudo também foi observado o aumento do pH final para ambos os substratos utilizados.

Assim, os resultados obtidos neste trabalho pode contribuir para trabalho futuros, uma vez que foi possível verificar que o consórcio bacteriano fotoheterotrófico foi capaz de utilizar os ácidos acéticos e butírico como substratos na produção de H_2 . O fato de muitos pesquisadores (FASCETTI et al., 1998; ARGUN e KARGI, 2010; LIU et al., 2010) acreditarem que a viabilidade econômica da produção biológica será através de sistemas híbridos (digestão anaeróbia + fotofermentação) agrega ainda mais a importância destes resultados, uma vez que os ácidos empregados neste trabalho são os principais metabólicos secundário da digestão anaeróbia (CHIN et al., 2003).

6 CONCLUSÕES

O consórcio fototrófico obtido a partir da coluna de Winogradski, confeccionada a partir de sedimento retirado na Lagoa da Conceição, localizada na cidade Florianópolis/SC, mostrou ser capaz de produzir H_2 , nas condições estudadas.

A análise dos pigmentos produzidos pelo consórcio bacteriano fotoheterotrófico mostrou a presença de bacterioclorofila *a* e carotenóides da série espiriloxantina, sendo que ambos são descritos na literatura como pigmentos produzidos pelas bactérias púrpuras não-sulfurosas.

A caracterização do consórcio bacteriano fotoheterotrófico através de técnicas de PCR/DGGE mostrou a presença de 4 diferentes espécies que compõem o consórcio.

O consórcio fototrófico obtido demonstrou potencial para consumir ácidos orgânicos como substratos tanto para o crescimento da biomassa quanto para a produção de H_2 .

7 REFERÊNCIAS

AKKERMAN, I.; JANSSEN, M.; ROCHA, J.; WIJFFELS, R.H. Photobiological hydrogen production: photochemical efficiency and bioreactor design. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.27, p. 1195-1208, 2002.

AMANN, R.; KÜHL, M. In situ methods for assessment of microorganisms and their activities. **Current Opinion in Microbiology**, v. 1, p. 352-358, 1998.

ANDRADE, A.C.F.F. **Avaliação da produção de hidrogênio por bactéria fototrófica púrpura não-sulfurosa em reator em batelada**. São Carlos, 2007.p 4. Dissertação (Mestrado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo.

ARGUN, H.; KARGI, F. Photo-fermentative hydrogen gas production from dark fermentation effluent of ground wheat solution: Effects of light source and light intensity. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.35, p. 1595-1603, 2010.

ARGUN, H.; KARGI, F.; KAPDAN, I.K.; OZTEKIN, R. Biohydrogen production by dark fermentation of wheat powder solution: Effects of C/N and C/P ratio on hydrogen yield and formation rate. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.33, p.1813-1819, 2008.

BARBOSA, M.J.; ROCHA, J.M.S.; TRAMPER, J.; WIJFFELS, R.H. Acetate as a carbon source for hydrogen production by photosynthetic bacteria. **Journal of Biotechnology**, v.85, p.25-33, 2001.

BABU, V.L.; MOHAN, S.V.; SARMA, P.N. Influence of reactor configuration on hydrogen production during wastewater treatment. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.34, p. 3305-3312, 2009.

BASAK, N ; DAS, D. The prospect of purple non-sulfur (PNS) photosynthetic bacteria for hydrogen production: the present state of the art. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v.23, p. 31-42, 2007.

BIANCHI, L.; MANELLI, F.; VITI, C.; ADESSI, A.; PHILIPPIS, R. Hydrogen producing purple non-sulfur bacteria isolated from the trophic lake Averno (Naples, Italy). **International Journal of Hydrogen Energy**, v.35, p. 12216-12223, 2010.

CAPPELLETTI, B.M. **Efeito da concentração inicial da água residual do processamento de mandioca na produção de biohidrogênio por *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824.** Florianópolis, 2009 45 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina

CASTRO, J.V. Produção biológica de hidrogênio a partir de glicerol por *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. Florianópolis, 2010 p. 32-33. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina.

CAUMETTE, P.; GUYONEAUD, R.; DURAN, R.; CRAVO-LAUREAU, C.; MATHERON, R. *Rhodobium pfennigii* sp. nov., a phototrophic purple non-sulfur bacterium with unusual bacteriochlorophyll a antennae, isolated from a brackish microbial mat on Rangiroa atoll, French Polynesia. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 57, p. 1250-1255, 2007.

CHEN, C. Y.; YANG, M. H.; YEH, K. L.; LIU, C.H.; CHANG, J.S. Biohydrogen production using sequential two-stage dark and photo fermentation processes. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, p. 4755 -4752, 2008.

CHEONG, D.Y.; HANSEN, C.L. Feasibility of hydrogen production in thermophilic mixed fermentation by natural anaerobes. **Bioresource Technology**, v. 98, 2229-2239, 2007.

CHIN, L.H.; CHEN, Z.S.; CHOU, C.P. Fed-batch Operation Using *Clostridium acetobutylicum* Suspension Culture as Biocatalyst for Enhancing Hydrogen Production. **Biotechnology and Bioprocess**, v. 19, p. 383-388, 2003.

DAS, D.; VEZIROGLU, T.N. Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.26, p.13-28, 2001.

DAIMS, H.; STOECKER, K.; WAGNER, M. Fluorescence in situ hybridization for the detection of prokaryotes. In: OSBORN, A. M.; SMITH, C. J., (Ed). **Molecular Microbial Ecology**. Garland: Routledge Publisher. pp 213-239. 2005.

DARBROCK, B.; BAHL, H.; GOTTSCHALK, G. Parameters affecting solvent production by *Clostridium pasteurianum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, p.1233-1239, 1992.

DÍEZ, B.; PEDRÓS-ALIÓ, C.; MARSH, T. L.; MASSANA, R. Application of Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) To Study the Diversity of Marine Picoeukaryotic Assemblages and Comparison of DGGE with Other Molecular Techniques. **Applied Environmental Microbiology**, v.67, p.2942-2951, 2001.

ERCOLINI, D. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. **Journal of Microbiological Methods**, v. 56, p. 297-314, 2004.

EROGLU, I.; ASLAN, K.A.; GÜDÜZ, U.; YÜCEL, M.; TÜRKER, L. Substrate consumption rates for hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* in a column photobioreactor. **Journal of Biotechnology**, v. 70, p. 103-113, 1999.

EROGLU, E.; GÜDÜZ, U.; YÜCEL, M.; EROGLU, I. Photosynthetic bacterial growth and productivity under continuous illumination or diurnal cycles with olive mill wastewater as feedstock. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.35, p. 5293-5300, 2010.

FANG, H.H.P.; LIU, H.; ZHANG, T. Phototrophic hydrogen production from acetate and butyrate in wastewater. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.30, p. 785-793, 2005.

FASCETTI, E.; D'ADDARIO, E.; TODINI, O.; ROBERTIELLO, A. photosynthetic hydrogen evolution with volatile organic acids derived from the fermentation of source selected municipal solid wastes. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.23, p.753 - 760, 1998.

- FERRIS, M. J.; MUYZER, G.; WARD, D. Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, p.40-346, 1997.
- FISSLER, J.; SCHIRRA, C.; KOHRING, G.W.; GIFFHORN, F. Hydrogen production from aromatic acids by *Rhodopseudomonas palustris*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.41, p.395-399, 1994.
- GADHAMSHETTY, V.; SUKUMARAN, A.; NIRMALAKHANDAN, N.; MYINT, M.T. Photofermentation of malate for biohydrogen production: A modeling approach. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.33, p. 2138-2146, 2008.
- GEST, H.; ORMEROD, J.G.; ORMEROD, K. Photometabolism of *Rhodospirillum rubrum*: light-dependent dissimilation of organic compounds to carbon dioxide and molecular hydrogen by anaerobic citric acid cycle. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.97, p.21-23, 1962.
- GOLOMYSOVA, A.; GOMELSKY, M.; IVANOV, P.S. Flux balance analysis of photoheterotrophic growth of purple nonsulfur bacteria relevant to biohydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, Article in press, p. 1-10, 2010.
- GOMES NETO, E. H. **Hidrogênio, Evoluir sem poluir: a era do hidrogênio, das energias renováveis e das células a combustível**, 2005.
- HALLENBECK, P.C.; BENEMANN, J. R. Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.27, p. 1185-1193, 2002.
- HALLENBECK, P.C. Fermentative hydrogen production: Principles, progress and prognosis. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.34, p. 7379-7389, 2009.
- HEAD, I. M.; SAUNDERS, J. R.; PICKUP, R. W. Microbial evolution, diversity, and ecology: A decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. **Microbial Ecology**, v. 35, p. 1-21, 1998.

HEUER, H.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) for studying soil microbial communities. In: ELSAS, J.D. van; TREVORS, J.T.; WELLINGTON, E.M.H. (Ed.). **Modern Soil Microbiology**, p. 353-373, 1997.

HUDSON, M.S.L.; DUBEY, P.K.; PUKAZHSELVAN, D.; PANDEY, S.K. SINGH, R.K.; RAGHUBANSHI, H.; SHAHI, R.R.; SRIVASTAVA, O.N. Hydrogen energy in changing environmental scenario: Indian context. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.34, p.7358-7367, 2009.

HUSTEDE, E.; STEINBUCHER, A.; SCHLEGEL, H.G.; Relationship between photoproduction of hydrogen and the accumulation of PHB in non-sulphur bacteria. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.39, p.87-93, 1993.

JAAPAR, S.Z.S.; KALIL, M.S.; ANUAR, N. The Effect of Aeration, Agitation and Light on Biohydrogen Production by *Rhodobacter Sphaeroides* NCIMB 8253. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, v.12, p.1253-1259, 2009.

JAIN, I.P. Hydrogen the fuel for 21st century. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.34, p.7368-7378, 2009.

KALINCI, Y.; HEPBASLI, A.; DINCER, I. Biomass-based hydrogen production: A review and analysis. **Journal International of Hydrogen Energy**, v.34, p. 8799-8817, 2009.

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, p.1123-1131, 2004.

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

KOKU, H.; EROGLU, I.; GÜNDÜZ, U.; YÜCEL, M.; TURKER, L. Kinetics of biological hydrogen production by the photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* O.U. 001 **International Journal of Hydrogen Energy**, v.28, p.381-388, 2003.

- KOKU, H.; EROGLU, I.; GÜNDÜZ, U.; YÜCEL, M.; TÜRKER, L. Aspects of the metabolism of hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides*. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.27, p.1315-1329, 2002.
- KOTAY, S.M.; DAS, D. Biohydrogen as a renewable energy resource - Prospects and potentials. . **International Journal of Hydrogen Energy**, v.33, p.253-263, 2008.
- LAMAISON, F.C. **Aplicação da água residuária do processamento da mandioca como substrato para a produção de hidrogênio por processo fermentativo**. Florianópolis, 2009 40 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina
- LAY, J.J. Modeling and optimization of anaerobic digested sludge converting starch to hydrogen. **Biotechnology and Bioengineering**, v.68 p. 269 - 278, 2000.
- LAZARO, C.Z. **Obtenção e caracterização filogenética de consórcio de bactérias fototróficas púrpuras não-sulfurosas consumidoras de ácidos orgânicos visando à produção de hidrogênio em reator anaeróbico em batelada**. São Carlos, 2009 200.p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. Editora: Sarvier, São Paulo, 2000.
- LI, X.; WANG, Y.; ZHANG, S.; CHU, J.; ZHANG, M.; HUANG, M.; ZHUANG, Y. Effects of light/dark cycle, mixing pattern and partial pressure of H₂ on biohydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* ZX-5. **Bioresource Technology**, v.102, p.1142-1148, 2011.
- LIU, B.F.; REN, N.O.; TANG, J.; DING, J.; LIU, W.Z.; XU, J.F.; CAO, G.L.; GUO, W.Q.; XIE, G.J. Bio-hydrogen production by mixed culture of photo and dark fermentation bacteria. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.35, p.2858-2862, 2010.
- MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 10 ed. São Paulo: Prentice Hall, 2004.

MANISH, S; BANERJEE, R. Comparison of biohydrogen production processes. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.33, p.279-286, 2008.

MARTIN, K.B.; GRASMAM, S.E. An assessment of wind-hydrogen systems for light duty vehicles. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.34, p.6581-6588, 2009.

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

MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA. **Balanco Energético Nacional 2008: Resultados preliminares**. Rio de Janeiro: Empresa de Pesquisa energética – EPE, p. 13, 2008.

MULLER, J. L.; PROTTI, K. L.; MACHADO, M. S.; LACERDA, L. L. V.; BRESOLIN, T. M. B.; PODLECH, P. S. Comparação do crescimento de *Saccharomyces boulardii* em zfermentador por batelada tipo *air lift* e *shaker*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, p. 688-693, 2007.

MU, Y.; WANG, G.; YU ,H.Q. Kinetic modeling of batch hydrogen production process by mixed anaerobic cultures. **Bioresource Technology**, v.97, p.1302–1307, 2006.

MUYZER, G.; WAAL, E. C.; UITTERLINDEN, G.. Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding for 16S RNAr. **Applied Environmental Microbiology**, v.59, p.695-700, 1993.

NAKADA, E.; NISHIKATA, S.; ASADA, Y.; MIYAKE, J. Photosynthetic bacterial hydrogen production combined with fuel cell. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.24, p.1053-71057, 1999.

NATH, K.; MUTHUKUMAR, M.; KUMAR, A.; DAS, D. Kinetics of twostage fermentation process for the production of hydrogen. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.33, p.1195-1203, 2008.

- NATH, K.; DAS, D. Effect of light intensity and initial pH during hydrogen production by an integrated dark and photofermentation process. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.34, p.7497-7501, 2009.
- NEUFELD, J. D.; MOHN, W.W. Assessment of microbial phylogenetic diversity based on environmental nucleic acids. In: STACKERBRANDT, E. (Ed.). **Molecular identification, systematics, and population structure of prokaryotes**. Heidelberg: Springer-Verlag, p. 220-259, 2006.
- NEVES, L.M.V. **Produção de biohidrogênio por bactérias a partir de resíduos fermentescíveis**. Lisboa, 2009.p 27. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química e Bioquímica) - Universidade Nova de Lisboa.
- NÚÑES-CARDONA, M.T. Isolation and pigment characterization of purple sulphur bacteria from Tampamachoco lagoon, Veracruz. **Hidrobiológica**, v. 13, p. 171-176, 2003.
- ONCEL, S.; SUKAN, F.V. Photo-bioproduction of hydrogen by *Chlamydomonas reinhardtii* using a semi-continuous process regime. **International Journal of Hydrogen Energy**. v.34, p.7592-7602, 2009.
- OOSHIMA H, TAKAKUWA S, KATSUDA T, OKUDA M, SHIRASAWA T, AZUMA M, Production of hydrogen by a hydrogenase deficient mutant of *Rhodobacter capsulatus*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.85, p. 470-474, 1998.
- OZTEKIN, R. ; KAPDAN, I.K.; KARGI, F.; ARGUN, H. Optimization of media composition for hydrogen gas production from hydrolyzed wheat starch by dark fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.33, p.4083-4090, 2008.
- PLANETA ORGANICO Disponível em: <http://planetaorganico.com/energiasrenov2.htm>. Acesso em novembro de 2010.
- PONSANO, E. H. G.; LACAVA, P. M.; PINTO, M. F. Isolation of *Rhodocyclus gelationosus* from Poultry Slaughterhouse waste water. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 45, p. 445-449, 2002.

REDWOOD, M.D.; MACASKIE, L.E. A two-stage, two-organism process for biohydrogen from glucose **International Journal of Hydrogen Energy**, v.31, p.1514-1521, 2006.

REDWOOD, M.D.; PENFOLD, D.W.; YONG, P.; MACASKIE, L.E. A two-stage process for biohydrogen from glucose. **Proceedings International Hydrogen Energy Congress and Exhibition**, p. 13-15 2005.

REES, G.N.; HARFOOT, C.G.; JANSSEN, P.H.; SCHOENBORN, L.; KUEVER, J.; LÜNSDORF, H. *Thiobaca trueperi* gen. nov., sp. nov., a phototrophic purple sulfur bacterium isolated from freshwater lake sediment. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, p. 671-678, 2002.

SANTOS, F.M.; SANTOS, F.A. O combustível “Hidrogênio”. **Educação Ciência e Tecnologia**, p. 252-270, 2007.

SANZ, J. L.; KÖCHLING, T. Molecular biology techniques used in wastewater treatment: An overview. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 119-133, 2007.

SASIKALA, K.; RAMANA, CH.V.; RAGHUVEER, P.R. Environmental regulation for optimal biomass yield and photoproduction of hydrogen by *Rhodobacter sphaeroides* O.U. 001. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.16, p. 597-601, 1991.

SASIKALA, K.; RAMANA, CH.V.; RAGHUVEER, P.R. Regulation of simultaneous hydrogen photoproduction during growth by pH and glutamate in *Rhodobacter sphaeroides* O.U. 001. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.20, p. 123-126, 1995..

SEIFERT, K.; WALIGORSKA, M.; LANIECKI, M. Brewery wastewaters in photobiological hydrogen generation in presence of *Rhodobacter sphaeroides* O.U. 001. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.35, p.4085-4091, 2010.

SINGH, S. P.; SRIVASTAVA, S. C.; PANDEY, K. D. Hydrogen production by *Rhodospseudomonas* at the expense of vegetable starch, sugarcane juice and whey. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.19, p. 437- 440, 1994.

- SREETHAWONG, T.; CHATSIRIWATANA, S.; RANGSUNVIGIT, P.; CHAVADEJ, S. Hydrogen production from cassava wastewater using anaerobic sequencing batch reactor: Effects of operational parameters, COD:N ratio, and organic acid composition. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.35, p.4092-4102, 2010.
- SRIKANTH, S.; MOHAN, S.V.; DEVI, M.P.; PERI, D.; SARMA, P.N. Acetate and butyrate as substrates for hydrogen production through photo-fermentation: Process optimization and combined performance evaluation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.34, p.7513-7522, 2009.
- SU, H.; CHENG, J.; ZHOU, J.; SONG, W.; CEN, K. Combination of dark and photo fermentation to enhance hydrogen production and energy conversion efficiency. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.34, p.8846-8853, 2009.
- SUN, Q.; XIAO, W.; XI, D.; SHI, J.; YAN, X.; ZHOU, Z. Statistical optimization of biohydrogen production from sucrose by a co-culture of *Clostridium acidisoli* and *Rhodobacter sphaeroides*. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.35, p.4076-4084, 2010.
- SUWANSAARD, M.; CHOORI, W.; ZEILSTRA-RYALLS, J.H.; PRASERTSAN, P. Isolation of anoxygenic photosynthetic bacteria from Songkhla Lake for use in a two-staged biohydrogen production process from palm oil mill effluent. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.34, p.7523-7529, 2009.
- TAVARES, A.C. **Modelagem matemática da degradação da glicose, com produção de hidrogênio em um reator anaeróbico de leito fixo**. São Carlos, 2008. p.16. Dissertação (Mestrado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo.
- TAO, Y.; HE, Y.; WU, Y.; LI, F.; LI, X.; ZONG, W.; ZHOU, Z. Characteristics of a new photosynthetic bacterial strain for hydrogen production and its application in wastewater treatment. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.33, p.963-973, 2008.

UYAR, B.; SCHUMACHER, M.; GEBICKI, J.; MODIGELL, M. Photoproduction of hydrogen by *Rhodobacter capsulatus* from thermophilic fermentation effluent. **Bioprocess Biosystems Engineering**, v. 32, p.603–606, 2009.

WALIGÓRSKA, M.; SEIFERT, K.; GÓRECKI, K.; MORITZ, M.; LANIECKI, M.I. Kinetic model of hydrogen generation by *Rhodobacter sphaeroides* in the presence of NH_4^+ ions. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, p. 1308–1318, 2009.

WEAVER, P.; WALL, J.D.; GEST, H. Characterization of *Rhodospseudomonas capsulta*. **Archives Microbiology**, v.105, p.207-216, 1975.

ZHENG, G.H.; WANG, L.; KANG, Z.H. Feasibility of biohydrogen production from tofu wastewater with glutamine auxotrophic mutant of *Rhodobacter sphaeroides*. **Renewable Energy**, v. 35, p. 2910-2913, 2010.

ZHU, H.; SUZUKI, T.; TSYGANKOV, A.A.; ASADA, Y.; MIYAKE, J. Hydrogen production from tofu wastewater by *Rhodobacter sphaeroides* immobilized in agar gels. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.24, p.305 – 310, 1999.

ZÜRRER, H.; BACHOFEN, R. Hydrogen production by the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.37, p.789–793, 1979.

ZWIRGLMAIER, K. Fluorescence in situ hybridisation (FISH) – the next generation. **FEMS Microbiology letters**, v. 246, p. 151-158, 2005.