



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

**MÉTODOS DE ENRIQUECIMENTO DE CULTURA MISTA**  
**UTILIZADA NO TRATAMENTO DE VINHAÇA PARA A**  
**PRODUÇÃO BIOLÓGICA DE HIDROGÊNIO**

**FRANCIELE LAMAISSON FOSSALUZA**  
**Engenheira de Alimentos**

**FLORIANÓPOLIS – SC**  
**2014**



**FRANCIELE LAMAISON FOSSALUZA**

**MÉTODOS DE ENRIQUECIMENTO DE CULTURA MISTA  
UTILIZADA NO TRATAMENTO DE VINHAÇA PARA A  
PRODUÇÃO BIOLÓGICA DE HIDROGÊNIO**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de doutor em Engenharia de Alimentos.

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos na Indústria de Alimentos.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>.Dr<sup>ª</sup> Regina Vasconcelos Antônio

Coorientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Valéria Reginatto Spiller

**Florianópolis – SC**

**2014**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Fossaluzza, Franciele Lamaison

Métodos de Enriquecimento de Cultura mista Utilizada no Tratamento de Vinhaça para a Produção Biológica de Hidrogênio ; Franciele Lamaison Fossaluzza ; orientadora, Regina Vasconcelos Antônio – Florianópolis, SC, 2015.

150 p.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos.

Inclui Referências

Engenharia de alimentos. 2. hidrogênio. 3. pré-tratamentos. 4. vinhaça. Antônio, Regina Vasconcelos. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. III. Título.

**“MÉTODOS DE ENRIQUECIMENTO DE CULTURA MISTA  
UTILIZADA NO TRATAMENTO DE VINHAÇA PARA A  
PRODUÇÃO BIOLÓGICA DE HIDROGÊNIO”**

Por

Franciele Lamaison Fossaluzza

Tese julgada para obtenção do título de Doutor em Engenharia Alimentos, área de Concentração de Desenvolvimento de Processos da Indústria de Alimentos, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

---

Profa. Dra. Regina Vasconcellos Antonio  
Orientadora

---

Profa. Dra. Valeria Reginatto Spiller  
Coorientadora

---

Prof. Dr. Marco Di Luccio  
Coordenador  
Banca Examinadora:

---

Profa. Dra. Valeria Reginatto  
Spiller

---

Profa. Dra. Sandra Imaculada  
Maintinguer

---

Prof. Dr. Armando Cavalcante  
Franco Dias

---

Prof. Dr. Marcelo Hemkemeier

---

Prof. Dr. Agenor Furigo Junior

---

Prof. Dr. Márcio José Rossi

Florianópolis, 2 de dezembro de 2014.



## RESUMO

O processo biológico de produção de  $H_2$  via fermentação é tido como promissor, pois possibilita produzir  $H_2$  a partir de águas residuárias domésticas ou industriais. O objetivo deste trabalho foi estudar métodos de pré-tratamento de uma cultura mista anaeróbia, utilizada no tratamento de vinhaça, visando a seleção e o enriquecimento em microrganismos produtores de  $H_2$ , avaliando o efeito dos pré-tratamentos sobre a comunidade microbiana. Foram realizados os seguintes pré-tratamentos: 1) Tratamento térmico a  $100^\circ\text{C}$  por 15 min; 2) Tratamento térmico a  $100^\circ\text{C}$  por 60 min; 3) Tratamento térmico a  $80^\circ\text{C}$  por 15 min; 4) Tratamento térmico a  $80^\circ\text{C}$  por 60 min; 5) Tratamento ácido (pH 3/24 h); 6) Tratamento combinado (pH 3 e fervura por 30 min); 7 e 8) Lavagem seletiva do lodo em biorreator contínuo, operado a  $50^\circ\text{C}$  com TRH de 12 h e 6 h. A produção de hidrogênio pelos lodos pré-tratados foi verificada em ensaios em batelada a  $50^\circ\text{C}$  durante, aproximadamente, 24 h. Os tratamentos produziram 109, 71, 154, 139, 117, 72, 0,6 e 0,75 mL, respectivamente e o controle (sem tratamento) 31 mL de hidrogênio. Analisou-se a comunidade microbiana dos lodos pré-tratados através de análise de DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) e sequenciamento (*Ion Torrent personal genome machine*). Os pré-tratamentos térmico a  $80^\circ\text{C}$  por 15 min e o ácido pH 3 por 24 h foram considerados os mais apropriados para o enriquecimento do lodo proveniente de um sistema de tratamento de vinhaça rica em bactérias produtoras de  $H_2$ . Então, foi feito um estudo para encontrar a melhor relação  $S_0/X_0$  para produção de  $H_2$  desses dois tratamentos. A melhor relação  $S_0/X_0$  encontrada foi 2,0. Os lodos tratados térmicamente e tratado com ácido foram utilizados como inóculo de biorreatores operados em batelada alimentada por 36 dias e com  $S_0/X_0$  de 2,0, para verificar o comportamento da produção de  $H_2$  em longo prazo. Nos 36 dias de operação foi analisada a produção de  $H_2$  e a comunidade microbiana inicial e final dos biorreatores através de análise de DGGE e sequenciamento. O tratamento com ácido foi o tratamento que teve melhor resultado na produção de hidrogênio em 36 dias. E o gênero mais frequente encontrado no lodo tratado com ácido foi o *Thermoanaerobacterium spp.*, conhecida na literatura como produtora de hidrogênio.

**Palavras-chave:** hidrogênio, pré-tratamentos, vinhaça.



## ABSTRACT

The biological process of H<sub>2</sub> production via fermentation is seen as promising because it enables to produce H<sub>2</sub> from domestic or industrial wastewater. The objective of this work was to study methods of pre-treatment of mixed anaerobic culture used in the treatment of vinasse in order to select and enrich for microorganisms that produce H<sub>2</sub>, evaluating the effect of pre-treatments on the microbial community. The following pretreatments were carried out: 1) Heat treatment at 100 °C for 15 min 2) Heat treatment at 100 °C for 60 min; 3) Heat treatment at 80 °C for 15 min; 4) Heat treatment at 80 °C for 60 min; 5) acid treatment (pH 3/24 h); 6) Combined treatment (pH 3, and boiling for 30 min); 7 and 8) Dry selective sludge bioreactor continuously operated at 50 °C with HRT of 6 h and 12 h. Hydrogen production by pre-treated sludge was observed in batch tests at 50 °C for approximately 24 h. The treatment produced 109, 71, 154, 139, 117, 72, 0.6 and 0.75 mL, respectively and control (untreated) 31 mL of hydrogen. We analyzed the microbial community of the pretreated sludge through analysis of DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) and sequencing (*Ion Torrent Personal Genome Machine*). The thermal pre-treatment at 80 °C for 15 min and the acid pH 3 for 24 h were considered the most appropriate for the enrichment of the sludge from a treatment system for producing bacteria vinasse rich H<sub>2</sub>. So a study was done to find the best S<sub>0</sub>/X<sub>0</sub> ratio for H<sub>2</sub> production of these two treatments. The best S<sub>0</sub>/X<sub>0</sub> ratio found was 2.0. The heat treated sludge and treated with acid was used as inoculum bioreactor operated in batch fed for 36 days with S<sub>0</sub>/X<sub>0</sub> 2.0, to verify the behavior of H<sub>2</sub> production in the long term. In the 36 days of operation was analyzed to produce H<sub>2</sub> and the initial end of bioreactors and microbial community analysis using DGGE and sequencing. The acid treatment was the treatment I had better result in hydrogen production in 36 days. And the most common genus found in sludge treated with acid was *Thermoanaerobacterium sp.* Known as the iteratura hydrogen producer.

**Keywords:** biohydrogen, pre-treatments, vinasse.



## LISTA DE TABELAS

Tabela 01	Poder calorífico de diferentes combustíveis.....	27
Tabela 02	Reações da degradação anaeróbia de glicose, consumidoras de H <sub>2</sub> e produtoras de H <sub>2</sub> , com suas respectivas energia livre padrão de Gibbs.....	34
Tabela 03	Composição da suplementação de nutrientes adicionada ao meio de cultura.....	49
Tabela 04	Concentração de glicose, vazão e cargas orgânicas volumétricas aplicadas ao biorreator contínuo de mistura completa de 1 L, para a lavagem do lodo em diferentes TRHs, a 50 °C e pH inicial de 6,0....	52
Tabela 05	Condições empregadas na PCR.....	61
Tabela 06	Relações S <sub>0</sub> /X <sub>0</sub> calculadas a partir das concentrações de SV e glicose equivalente, utilizadas nos ensaios de produção de H <sub>2</sub> em batelada.....	65
Tabela 07	Valores de pH e SV do início e final do experimento com diferentes relações S <sub>0</sub> /X <sub>0</sub> .....	67
Tabela 08	Consumo de glicose equivalente, rendimento e eficiência dos experimentos de produção de H <sub>2</sub> com diferentes relações S <sub>0</sub> /X <sub>0</sub> .....	68
Tabela 09	Parâmetros cinéticos para a produção de H <sub>2</sub> nos ensaios com relação S <sub>0</sub> /X <sub>0</sub> de 1,0 e 5,2 g glicose/ g SV.....	70
Tabela 10	Valores de pH, SV, glicose, ácidos orgânicos e etanol (mmol/L) no início e final dos experimentos (diferença) com a relação S <sub>0</sub> /X <sub>0</sub> 1,0 e 5,2 g glicose/ g SV.....	71
Tabela 11	Correspondência dos fragmentos do gel de DGGE dos ensaios com S <sub>0</sub> /X <sub>0</sub> de 1,0 determinados pelas suas sequências de 16S rDNA, com sequências do GenBank.....	75
Tabela 12	Correspondências dos fragmentos do gel de DGGE dos ensaios com S <sub>0</sub> /X <sub>0</sub> 5,2 determinados pelas suas	

	seqüências de 16S rDNA, com seqüências do GenBank.....	76
Tabela 13	Parâmetros cinéticos de produção de H <sub>2</sub> para os ensaios com os lodos submetidos aos pré-tratamentos e o controle. (1- Térmico 100 °C/15 min; 2- Térmico 100 °C/60 min; 3- Térmico 80 °C/15 min; 4- Térmico 80 °C/60 min; 5-Ácido pH 3/24h; 6- Ácido pH 3/24h e fervura/30 min; 7- Lavagem TRH 12h; 8-Lavagem TRH 6h). A relação S <sub>0</sub> /X <sub>0</sub> utilizada nos ensaios foi de 5,5 g glicose/ g SV.....	83
Tabela 14	Concentrações de glicose no início e final do experimento, rendimento e eficiência dos ensaios em batelada com os lodos pré-tratados. (1- Térmico 100 °C/15 min; 2- Térmico 100 °C/60 min; 3- Térmico 80 °C/15 min; 4- Térmico 80 °C/60 min; 5-Ácido pH 3/24h; 6- Ácido pH 3/24h e fervura/30 min; 7-Lavagem TRH 12h; 8- Lavagem TRH 6h). A relação S <sub>0</sub> /X <sub>0</sub> utilizada nos ensaios foi de 5,5 g glicose/ g SV.....	86
Tabela 15	Concentração dos ácidos orgânicos no início (0 h) e ao final (24 h) dos ensaios em batelada para a produção de H <sub>2</sub> com os lodos pré-tratados e o controle. (1- Térmico 100°C/15 min; 2- Térmico 100 °C/15 min; 3- Térmico 80 °C/15 min; 4- Térmico 80 °C/30 min; 5-Ácido pH 3/24 h; 6- Ácido pH 3/24 h e Térmico 100 °C/30 min; 7- Lavagem TRH 12 h; 8-Lavagem TRH 6 h).....	89
Tabela 16	Valores de glicose, conversão, eficiência, pH e concentração de SV dos ensaios em batelada do início e final, com as diferentes relações S <sub>0</sub> /X <sub>0</sub> , para o lodo tratado termicamente (80 °C por 15 min).....	103
Tabela 17	Parâmetros cinéticos para a produção de H <sub>2</sub> nos ensaios em batelada, com as diferentes relações S <sub>0</sub> /X <sub>0</sub> , com lodo tratado termicamente (80 °C por 15 min).....	104
Tabela 18	Concentração dos ácidos orgânicos (g/L) no início	

	(0 h) e ao final (24 h) dos ensaios em batelada para a produção de H <sub>2</sub> com as diferentes relações S <sub>0</sub> /X <sub>0</sub> , com o lodo tratado termicamente (80 °C por 15 min).....	105
Tabela 19	Valores de glicose, hidrogênio, fator de conversão, eficiência, pH e concentração de SV dos ensaios em batelada do início e final, com as diferentes relações S <sub>0</sub> /X <sub>0</sub> , com lodo tratado com ácido (pH3/HCl).....	107
Tabela 20	Parâmetros cinéticos para a produção de H <sub>2</sub> nos ensaios em batelada, com as diferentes relações S <sub>0</sub> /X <sub>0</sub> , com lodo tratado com ácido (pH3/HCl).....	108
Tabela 21	Concentração dos ácidos orgânicos no início (0 h) e ao final (24 h) dos ensaios em batelada para a produção de H <sub>2</sub> com as diferentes relações S <sub>0</sub> /X <sub>0</sub> , com lodo tratado com ácido (pH3/HCl).....	109



## LISTA DE FIGURAS

Figura 01	Etapas da digestão anaeróbia de carboidratos e de produção de H <sub>2</sub> por cultura mista. Fonte: adaptado de VALDEZ-VAZQUEZ; POGGI-VARALDO, (2009).....	31
Figura 02	Vias bioquímicas utilizadas pelo <i>Clostridium</i> para conversão de carboidratos em H <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub> , ácidos orgânicos e solventes. Fonte: adaptado de SINHA; PANDEY, (2011).....	37
Figura 03	Vias bioquímicas utilizadas pela <i>Enterobacter spp.</i> para produção de hidrogênio Fonte: adaptado de Hallenbeck; Ghosh, (2012).....	38
Figura 04	Biorreatores em batelada para a produção biológica de hidrogênio por fermentação: 1) biorreatores; 2) ponto de borbulhamento de gás inerte e coleta de amostra; 3) frasco de segurança; 4) frasco Mariotte contendo NaOH 5 % (m/v); 5) proveta graduada para coleta da solução de NaOH deslocada; 6) ponto de amostragem do gás do <i>headspace</i> . Adaptado de García-Morales et al. (2001).....	55
Figura 05	Volume de hidrogênio acumulado (mL) ao longo do tempo, nos ensaios cinéticos com diferentes relações S <sub>0</sub> /X <sub>0</sub> .....	66
Figura 06	Volume de hidrogênio acumuladonos ensaios cinéticos com a relação S <sub>0</sub> /X <sub>0</sub> 1,0 e 5,2 g glicose/ g SV durante 14 horas de experimento.....	69
Figura 07	Gel de DGGE com as amostras de lodo dos ensaios com S <sub>0</sub> /X <sub>0</sub> 5,2 g glicose/ g SV e com S <sub>0</sub> /X <sub>0</sub> 1 g glicose/ g SV.....	74
Figura 08	Concentração de SV durante o período de lavagem do lodo em um CSTR, operado com TRH de 12h (D = 0,083 h <sup>-1</sup> ).....	79

Figura 09	Concentração de SV durante o período de lavagem no CSTR, operado com TRH de 6 h ( $D=0,166 \text{ h}^{-1}$ ).	80
Figura 10	Volume acumulado de $\text{H}_2$ em função do tempo produzido pelos lodos. Controle (sem pré-tratamento); 1- Térmico $100^\circ\text{C}/15 \text{ min}$ ; 2- Térmico $100^\circ\text{C}/60 \text{ min}$ ; 3- Térmico $80^\circ\text{C}/15 \text{ min}$ ; 4- Térmico $80^\circ\text{C}/60 \text{ min}$ ; 5-Ácido pH 3/24h; 6-Ácido pH 3/24h e fervura/30 min; 7-Lavagem TRH 12h; 8-Lavagem TRH 6h. A relação $S_0/X_0$ utilizada nos ensaios foi de 5,5 g glicose/ g SV.....	82
Figura 11	Gel de DGGE com as amostras dos lodos controle (sem tratamento) e dos lodos pré-tratados. As linhas correspondem a: c- controle, 1- trat. 1, 2- trat. 2, 3- trat. 3, 4- trat. 4, 5- trat. 5, 6 -trat. 6, 7- trat. 7 e 8- trat. 8. 1- Térmico $100^\circ\text{C}/15 \text{ min}$ ; 2- Térmico $100^\circ\text{C}/15 \text{ min}$ ; 3- Térmico $80^\circ\text{C}/15 \text{ min}$ ; 4- Térmico $80^\circ\text{C}/30 \text{ min}$ ; 5-Ácido pH 3/24 h; 6-Ácido pH 3/24 h e Térmico $100^\circ\text{C}/30 \text{ min}$ ; 7- Lavagem TRH 12 h; 8-Lavagem TRH 6 h.....	94
Figura 12	Valores de diversidade, indicados pelo índice de Shannon dos diferentes pré-tratamentos dos lodos. 1- Térmico $100^\circ\text{C}/15 \text{ min}$ ; 2- Térmico $100^\circ\text{C}/15 \text{ min}$ ; 3- Térmico $80^\circ\text{C}/15 \text{ min}$ ; 4- Térmico $80^\circ\text{C}/30 \text{ min}$ ; 5-Ácido pH 3/24 h; 6- Ácido pH 3/24 h e Térmico $100^\circ\text{C}/30 \text{ min}$ ; 7-Lavagem TRH 12 h; 8-Lavagem TRH 6 h.....	95
Figura 13	Dendrograma do DGGE mostrando a similaridade das amostras dos lodos controlee com tratamentos:1- Térmico $100^\circ\text{C}/15 \text{ min}$ ; 2- Térmico $100^\circ\text{C}/15 \text{ min}$ ; 3- Térmico $80^\circ\text{C}/15 \text{ min}$ ; 4- Térmico $80^\circ\text{C}/30 \text{ min}$ ; 5-Ácido pH 3/24 h; 6-Ácido pH 3/24 h e Térmico $100^\circ\text{C}/30 \text{ min}$ ; 7- Lavagem TRH 12 h; 8-Lavagem TRH 6 h.....	97
Figura 14	Classificação das sequências divididas por famílias com abundância relativa maior do que 1%, nas amostras dos lodos pré-tratados. 3- Térmico $80^\circ\text{C}/15 \text{ min}$ ; 5-Ácido pH 3/24 h; 8-Lavagem TRH 6 h	98

Figura 15	Volume de hidrogênio acumulado em função do tempo pelo lodo pré-tratado a 80 °C por 15 min, nas relações $S_0/X_0$ 1,7 , 5,2 e 7,1 g glicose/g SV...	102
Figura 16	Volumede hidrogênio acumulado em função do tempo pelo lodo pré-tratado com ácido (pH3/HCl) nas relações $S_0/X_0$ 1,7, 5,3 e 7,2 g glicose/g SV.....	106
Figura 17	: Velocidades de produção de hidrogênio e de consumo de glicose nos biorreatores inoculados com os lodos pré-tratados por ácido (A), térmico (T) e sem pré-tratamento (controle -C), durante o período de 36 dias.....	112
Figura 18	Concentração dos ácidos orgânicos (mmol/L) nos biorreatores pelo período de 36 dias.A) inoculado com o lodo sem tratamento (controle); B) inoculado com o lodo tratado termicamente e C) inoculado com o lodo tratado com ácido.....	114
Figura 19	Gel de DGGE com as amostras dos lodos durante o acompanhamento do biorreatores em batelada alimentada inoculados com os lodos sem tratamento (controle) e os pré-tratados, em 0, 12, 23 e 36 dias.....	118
Figura 20	Valores de diversidade, indicados pelo índice de Shannon do acompanhamento de biorreatores em batelada alimentada inoculados com os lodos sem tratamento (controle) e os pré-tratados em 0, 12, 23 e 36 dias.....	119
Figura 21	Dendograma do DGGE mostrando a similaridade entre as amostras do acompanhamento de biorreatores em batelada alimentada inoculados com os lodos sem tratamento (controle) e os pré-tratados em 0, 12, 23 e 36 dias.....	120
Figura 22	Classificação das sequências dividas por famílias com abundância relativa maior do que 1%, no acompanhamento dos biorreatores em batelada alimentada inoculados com os lodos sem tratamento (controle)e os pré-tratados em 0 e 36 dias.	122



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>23</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVO.....</b>	<b>25</b>
2.1	Objetivo Geral.....	25
2.2	Objetivo Específico.....	25
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>27</b>
3.1	O Hidrogênio.....	27
3.2	Produção de H <sub>2</sub> por fermentação.....	29
3.2.1	Vias bioquímica de produção de H <sub>2</sub> por fermentação...	35
3.3	Pré-tratamentos de culturas mistas para a produção biológica de H <sub>2</sub> .....	38
3.4	Produção biológica de H <sub>2</sub> por cultura mista.....	41
3.5	Análise da diversidade dos microrganismos baseadas em biologia molecular.....	45
3.5.1	Análise de DGGE.....	45
3.5.2	Sequenciamento de genes para o estudo de comunidades microbianas.....	46
3.5.3	Diversidade.....	47
3.5.4	Medidas de diversidade.....	47
3.5.5	Análise de agrupamento.....	47
	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>49</b>
3.6	Inóculo.....	49
3.7	Meio de cultura.....	49
3.8	Estudo da relação S <sub>0</sub> /X <sub>0</sub> para a produção de H <sub>2</sub> com o lodo sem pré-tratamento.....	50
3.9	Pré-tratamentos do inóculo.....	50
3.10	Ensaio cinético em batelada para o	

	acompanhamento da produção de H <sub>2</sub> por fermentação.	53
3.11	Cinética para produção de H <sub>2</sub> .....	55
3.12	Produção de H <sub>2</sub> em biorreatores operados em batelada sequenciais repetidas.....	56
3.13	Métodos Analíticos.....	56
3.13.1	Determinação dos Sólidos Totais e Sólidos Voláteis (ST e SV).....	56
3.13.2	Determinação do pH.....	57
3.13.3	Determinação de Carbono Orgânico Total e inorgânico (COT).....	57
3.13.4	Análise da composição do gás nos biorreatores.....	57
3.13.5	Análise de ácidos orgânicos voláteis e etanol por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	58
3.14	Acompanhamento da microbiota por técnicas de biologia molecular.....	58
3.14.1	Extração do DNA genômico.....	59
3.14.2	Amplificação do 16S rDNA.....	59
3.14.3	Eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE).....	62
3.14.4	Identificação da comunidade bacteriana por meio de sequenciamento.....	62
3.14.5	Índice de Shannon.....	63
3.14.6	Análise de agrupamento.....	63
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>65</b>
4.1	Efeitos da relação inicial substrato/microrganismo (S <sub>0</sub> /X <sub>0</sub> ) sobre a produção de hidrogênio por fermentação.....	65
4.1.1	Análise das comunidades microbianas presentes nos ensaios com relações S <sub>0</sub> /X <sub>0</sub> 1,0 e 5,2 g glicose/ g SV...	73
4.2	Pré-tratamentos do inóculo e acompanhamento da produção de H <sub>2</sub> .....	77

4.2.1	Produção de metabólitos solúveis nos ensaios.....	88
4.2.2	Análise das comunidades microbianas nos lodos pré-tratados.....	93
4.3	Estudo da relação $S_0/X_0$ com os lodos pré-tratados.....	100
4.3.1	Estudo da relação $S_0/X_0$ usando o lodo do Tratamento 3 (80 °C por 15 min).....	101
4.3.2	Estudo da relação $S_0/X_0$ usando o lodo do Tratamento 5 com ácido (pH3/HCl).....	106
4.4	Acompanhamento de biorreatores em batelada sequenciais repetidas inoculados com os lodos pré-tratados.....	110
4.4.1	Concentrações dos ácidos orgânicos e pHs nos biorreatores.....	113
4.4.2	Análise das comunidades microbianas durante o acompanhamento dos biorreatores em batelada alimentada inoculados com os lodos pré-tratado.....	117
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>125</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>127</b>
<b>7</b>	<b>APÊNDICE.....</b>	<b>149</b>



# 1 INTRODUÇÃO

Os combustíveis fósseis, como petróleo, carvão e gás natural, além de serem fontes esgotáveis de energia, geram poluentes em sua combustão, tais como o monóxido e o dióxido de carbono, um dos principais responsáveis pelo aquecimento global. Neste contexto, o  $H_2$  tem sido considerado a energia limpa do futuro, pois a sua combustão resulta somente em água (WANG; WAN, 2009).

O  $H_2$  é obtido termocataliticamente a partir do carvão, naftalina, óleos pesados e eletroquimicamente a partir da água (CHAUBEY et al., 2013). Entretanto, a maioria desses métodos consomem combustíveis fósseis como matéria-prima, não sendo ecologicamente sustentáveis. Já a produção de  $H_2$  por microrganismos demanda menos energia e abre caminho para a obtenção do combustível a partir de recursos renováveis. A produção de  $H_2$  por processos biológicos é uma alternativa de degradação de compostos poluentes, concomitante com a obtenção de  $H_2$ . Existem, principalmente, dois sistemas biológicos para a produção de  $H_2$ : os processos dependentes e independentes da luz, também conhecidos como claros e escuros. O primeiro consiste em produzir  $H_2$  através de microrganismos fotossintéticos, tais como algas e bactérias fotossintéticas dependentes da luz. Já os processos fermentativos consistem no uso de microrganismos produtores de  $H_2$  anaeróbios facultativos e obrigatórios que não necessitam de luz.

O processo biológico via fermentação é tido como promissor, pois possibilita produzir  $H_2$  a partir de água residuária doméstica ou industrial. Nesse processo são utilizadas como inóculo culturas puras ou mistas de microrganismos. Preferencialmente têm sido utilizadas culturas mistas provenientes de biorreatores anaeróbios para o tratamento de efluentes, pois a produção do hidrogênio por fermentação compartilha diversos pontos em comum com a digestão anaeróbia da matéria orgânica.

O uso de culturas mistas apresenta vantagens sobre as culturas puras, quais sejam: 1) favorecer a condução do processo contínuo; 2) a grande diversidade microbiana das culturas mistas possibilita a utilização de uma grande gama de substratos; e 3) os efeitos das oscilações das condições do processo são minimizados, também pela grande diversidade microbiana.

Porém, o sucesso da produção de  $H_2$  por cultura mista requer a inibição dos microrganismos consumidores de  $H_2$ , no decorrer das reações mediadas pelos microrganismos que compõem o lodo anaeróbio. Pré-tratamentos de culturas mistas têm sido utilizados para a seleção e enriquecimento de grupos específicos de bactérias produtoras de  $H_2$  e para a inibição das consumidoras (DAS;VERZIROGLU, 2008). Diferenças fisiológicas entre os grupos de bactérias obtém-senos pré-tratamentos utilizados no preparo de inóculos produtores de  $H_2$ . Vários tipos de pré-tratamento de cultura mista são descritos na literatura para aumentar a produção de  $H_2$  como, por exemplo, aeração intensa, adição de compostos químicos inibidores (CHANG et al., 2011), infravermelho (SONG et al., 2012), processo contínuo com diferentes TRHs (LUO et al., 2010<sup>c</sup>). Entretanto, dentre os métodos descritos na literatura para essa finalidade, o tratamento térmico é, sem dúvida, o mais largamente aplicado (PRAKASHAM et al., 2012; CHEN et al., 2012;KAN, 2013).

Há um consenso na literatura sobre a necessidade do pré-tratamento de culturas mistas a fim de enriquecer o inóculo em bactérias produtoras de  $H_2$ . Porém, cada método de pré-tratamento tem a sua eficácia associada à natureza do inóculo, ao substrato e a forma de operação do biorreatores. Portanto, o efeito do pré-tratamento do inóculo na produção de hidrogênio deve ser estudado para cada combinação de cultura mista e substrato, bem como as condições de operação dos biorreatores.

Nesse sentido, esse trabalho estudou métodos de enriquecimento de uma cultura mista (lodo) termofílica, utilizada no tratamento anaeróbio de vinhaça, para a produção de hidrogênio. Não há relatos na literatura sobre a produção de  $H_2$  com uma cultura mista desta natureza. Para esse propósito, o lodo foi submetido a diferentes pré-tratamentos, sendo a estrutura da comunidade microbiana avaliada por análises moleculares baseadas em biologia molecular e correlacionada à produção de  $H_2$  por fermentação.

## **2 OBJETIVO**

### **2.1 Objetivo Geral**

Estudar métodos de pré-tratamento de uma cultura mista anaeróbia, utilizada no tratamento de vinhaça, visando a seleção e o enriquecimento de microrganismos produtores de  $H_2$ , avaliando o efeito sobre a comunidade microbiana.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Avaliar a melhor relação inicial substrato/ microrganismo ( $S_0/X_0$ ) para produção de  $H_2$  pela cultura mista estudada;
- Promover a seleção e o enriquecimento de bactérias produtoras de  $H_2$  no lodo anaeróbio, quais sejam: tratamento térmico, tratamento ácido e lavagens seletivas do lodo em biorreator contínuo, aplicando diferentes tempos de retenção hidráulica (TRH);
- Estudar a relação  $S_0/X_0$  mais adequada para a produção de  $H_2$  pelos lodos após os pré-tratamentos;
- Estimar os parâmetros cinéticos de produção de  $H_2$ , por meio de modelagem, utilizando como substrato a glicose;
- Correlacionar os metabólitos solúveis do processo, tais como ácidos orgânicos e etanol com a produção de  $H_2$ ;
- Verificar a eficácia dos métodos de enriquecimento a longo prazo, operando reatores em bateladas sequenciais.
- Caracterizar a comunidade microbiana do inóculo e da selecionada pelos pré-tratamentos por ferramenta molecular baseada em biologia molecular e correlacioná-las com a produção de  $H_2$ ;



### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 O Hidrogênio

O hidrogênio compõe 75% da massa do Universo e no planeta terra, compõe aproximadamente 70% da superfície terrestre. Sua principal ocorrência, cerca de 90%, está na água e em proteínas presentes nos seres vivos. É o elemento químico mais simples que existe. Formado por apenas um próton e um elétron. Seu número atômico é 1, sua massa molar é igual a 1,008 g e seu símbolo químico é H. Encontra-se frequentemente na forma molecular compondo o gás H<sub>2</sub>. O H<sub>2</sub> possui densidade de 0,0899 kg/m<sup>3</sup> (a 0°C e 0,1013 MPa), ponto de ebulição: -252,8°C (na pressão de 0,1013 MPa), inflamável entre as concentrações 4,0% a 75% (v/v), coeficiente de difusão: 0,61 cm<sup>2</sup>/s, 1 g de H<sub>2</sub>, ocupa o espaço de aproximadamente 11 litros sob pressão atmosférica. A energia contida em 1 kg de H<sub>2</sub> equivale a 2,75 kg de gasolina. No seu estado natural e sob condições ambientes de temperatura e pressão, o hidrogênio é um gás incolor, inodoro, insípido e muito mais leve que o ar. O hidrogênio pode estar no estado líquido, ocupando um espaço 700 vezes menor do que em forma de gás. O hidrogênio líquido deve ser armazenado à temperatura de -253°C. Acima desta temperatura, o hidrogênio não pode ser liquefeito, mas pode ser armazenado em forma de gás comprimido em cilindros de alta pressão (GOMES NETO, 2005). Santos e Santos (2007), apontam a vantagem do H<sub>2</sub> comparando o poder calorífico desse sobre outros combustíveis, conforme os dados apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Poder calorífico de diferentes combustíveis.

Combustível	Poder Calorífico (a 25°C e 1 atm)
Hidrogênio	119,93 kJ/g a 141,86 kJ/g
Metano	50,02 kJ/g a 55,53 kJ/g
Propano	45,56 kJ/g a 50,36 kJ/g
Gasolina	44,5 kJ/g a 47,5 kJ/g
Gasóleo	42,5 kJ/g a 44,8 kJ/g
Etanol	27,9 kJ/g a 29,4 kJ/g

Fonte: Santos e Santos (2007).

Além de suas características combustíveis, o  $H_2$  não é tóxico e nem corrosivo, e o vazamento durante o seu transporte não causaria um problema ambiental, como ocorre toda vez que há vazamento de óleo em navios petroleiros (GOMES NETO, 2005).

O  $H_2$  é considerado a energia limpa do futuro, pois gera somente água durante sua combustão, apresenta elevada conversão de energia por unidade de massa e pode ser convertido em energia elétrica, energia mecânica ou calor (KONDO et al., 2002).

Os vários processos de obtenção de  $H_2$  incluem eletrólise da água, reforma termocatalítica de compostos orgânicos ricos em hidrogênio e processos biológicos. Entretanto, quase 95% do  $H_2$  produzido provêm de reações do gás natural ou frações de óleo com vapor a elevadas temperaturas (reforma a vapor), ou seja, a tecnologia convencional de produção industrial de  $H_2$  requer consumo imediato ou indireto de combustíveis fósseis, resultando em emissão de dióxido de carbono ( $CO_2$ ) e exaustão de combustíveis (LEVIN; PITT; LOVE, 2004).

Pesquisas têm sido conduzidas no desenvolvimento de tecnologia de produção limpa de  $H_2$ , que dispensa a necessidade de combustíveis fósseis. Logo, o sistema de produção global de  $H_2$ , inicialmente baseado em combustíveis fósseis, está mudando progressivamente em direção as fontes renováveis. Os pesquisadores exploram o uso de fontes como luz solar e biomassa para produzir  $H_2$ . Há diversos estudos sobre a aplicação de  $H_2$  na indústria automobilística na forma de células combustíveis, dispositivos que convertem diretamente  $H_2$  em eletricidade, assim como a geração de energia elétrica em residências e indústrias (MOMIRLAN; VEZIROGLU, 2005).

Atualmente, a maior parte do hidrogênio produzido no mundo é utilizado como matéria-prima na fabricação de produtos como os fertilizantes, na conversão de óleos em margarina, no processo de fabricação de plásticos e no resfriamento de geradores e motores. As pesquisas recentes sobre  $H_2$  estão concentradas na geração de energia elétrica, térmica e de água pura através das células a combustível (CHAUBEY et al., 2013).

A contribuição do  $H_2$  no consumo de energia global poderá aumentar ao final do século 21, devido ao desenvolvimento de eficientes tecnologias de uso final, tornando o hidrogênio o principal abastecedor

de energia. Entretanto, para este fim, será necessário que o hidrogênio seja produzido de maneira renovável e em larga escala (HE et al., 2006).

### 3.2 Produção de H<sub>2</sub> por fermentação

Sabe-se que 95% da produção atual do hidrogênio ocorre a partir de combustíveis fósseis, o que libera gases de efeito estufa para o ambiente. Além da dependência do petróleo e de outras fontes não renováveis. Nesse contexto, a produção biológica é considerada muito promissora, visto que demanda menos energia, pois é realizada a temperatura e pressão ambientes. Esta pode ser realizada por três processos distintos: o fotoquímico (biofotólise e fotodecomposição de compostos orgânicos), a fermentação escura e o processo híbrido ou misto (DAS; VEZIROGLU, 2008). Os processos fotoquímicos necessitam da presença de luz (energia) e de atmosfera pobre em oxigênio, pois esse inibe as enzimas hidrogenase e nitrogenase, responsáveis pela produção de hidrogênio.

A produção biológica de H<sub>2</sub> por fermentação, também conhecida como fermentação escura, apresenta algumas vantagens sobre os demais processos biológicos, quais sejam: não necessita da presença constante de luz, pode ser conduzida a pressão e temperatura ambientes e permite a utilização de resíduos agroindustriais ricos em carboidratos como substrato. Desse modo, a fermentação escura é considerada o método biológico mais promissor para a produção de H<sub>2</sub> (LEVIN; PITT; LOVE, 2006).

As principais bactérias produtoras de H<sub>2</sub>, descritas na literatura, são as dos gêneros *Enterobacter*, *Clostridium*, *Desulfovibrio*, *Megasphaera*, *Citrobacter* e *Escherichia* (DAS; VEZIROGLU, 2001). Entretanto, o uso de culturas puras na produção de H<sub>2</sub>, pressupõe a condução de todo o processo biológico de forma estéril, o que seria inviável do ponto de vista econômico para processos que visam à produção de combustível (XU et al., 2010). Dessa forma, a maior parte dos processos para a produção de H<sub>2</sub> utilizam culturas mistas, mais especificamente lodos anaeróbios de sistemas de tratamento de resíduos (HAFEZ et al., 2010; CHEN et al., 2012; KAN, 2013; NASR et al., 2011).

A degradação anaeróbia de materiais orgânicos por culturas mistas (biodigestão ou digestão anaeróbia) e a produção de H<sub>2</sub> por fermentação possuem várias etapas em comum, portanto é necessário

entender as etapas que compõe a degradação anaeróbia de materiais orgânicos, para situar a produção de  $H_2$  nesse contexto.

A digestão anaeróbia é desenvolvida por uma sequência de reações realizadas por diferentes grupos de microrganismos. Pode-se distinguir três ou quatro fases distintas e subsequentes catalisadas por esses grupos de microrganismos, quais sejam: a hidrólise, a acidogênese, a acetogênese e a metanogênese (CHERNICARO, 1997), conforme pode ser observado na Figura 1. Tem-se, então, uma cadeia sucessiva de reações bioquímicas, onde inicialmente acontece a hidrólise ou quebra das moléculas de proteínas, lipídios e carboidratos até a formação dos produtos finais, essencialmente, gás metano e dióxido de carbono (VAN HAANDEL; LETTINGA, 1994).

O processo anaeróbio de degradação da matéria orgânica inicia-se com a hidrólise de compostos orgânicos complexos a compostos mais simples, que possam ser assimilados pelos microrganismos. Os compostos solúveis gerados no processo de hidrólise são consumidos pelas bactérias acidogênicas e excretados como substâncias orgânicas simples, tais como ácidos graxos voláteis (AGV), álcoois, ácido láctico e compostos como o  $CO_2$ ,  $H_2$ ,  $NH_3$ ,  $H_2S$ , etc. A fermentação acidogênica é realizada por um grupo diversificado de bactérias, das quais a maioria é anaeróbia obrigatória. Entretanto, algumas espécies são facultativas e podem metabolizar o material orgânico pela via oxidativa (VAN HAANDEL; LETTINGA, 1994). A fermentação da glicose, realizada pelas bactérias acidogênicas, geram o ácido acético, butírico e propiônico, de acordo com as reações representadas nas Equações 1, 2 e 3.

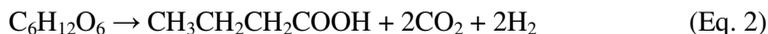
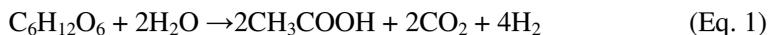
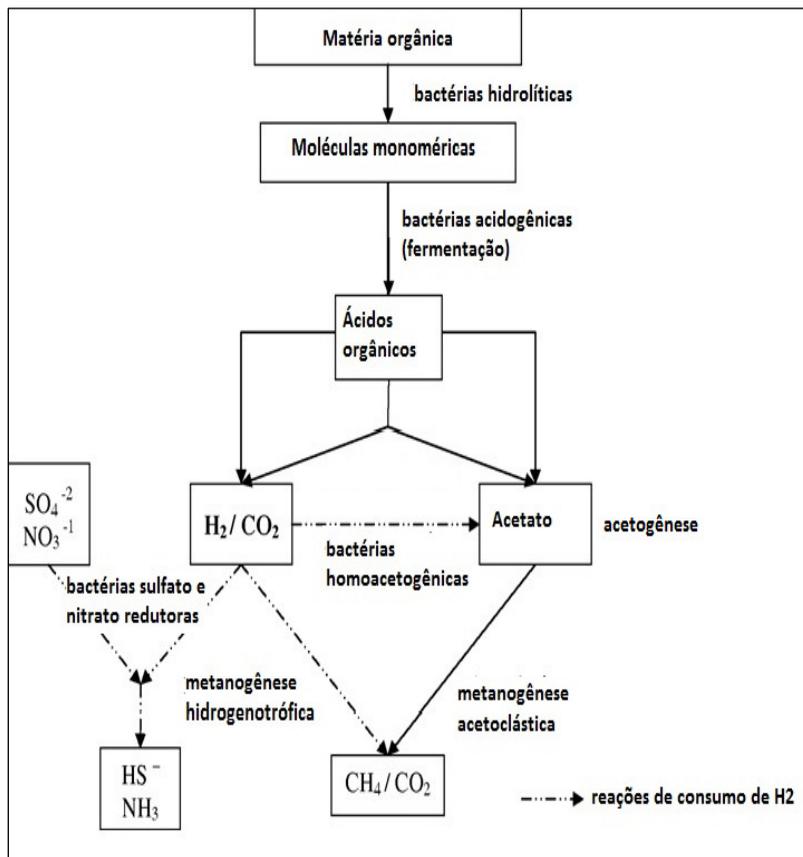


Figura 1: Etapas da digestão anaeróbia de carboidratos e de produção de  $H_2$  por cultura mista. Fonte: adaptado de VALDEZ-VAZQUEZ; POGGI-VARALDO, (2009).



De todos os produtos formados na etapa acidogênica somente o acetato, o  $CO_2$  e o  $H_2$  podem ser assimilados pelas metanogênicas. Dessa forma, os ácidos butírico e propiônico produzidos da etapa de acidogênese são convertidos em ácido acético (acetogênese) por meio das bactérias acetogênicas, de acordo com as Equações 4 e 5.



De acordo com as pesquisas realizadas por Breure (1984), a distribuição dos ácidos orgânicos voláteis dependerá principalmente da natureza do substrato e das condições a que os microrganismos estão sendo expostos.

O processo de degradação do substrato é finalizado na etapa de metanogênese, que consiste na transformação dos produtos formados anteriormente em metano e dióxido de carbono. A formação do metano é executada por dois mecanismos distintos. O primeiro consiste na sua formação a partir do  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2$ , pelo grupo de bactérias hidrogenotróficas, de acordo com a Equação 6. O segundo mecanismo consiste da produção do metano a partir do acetato, realizada pelo grupo de metanogênicas acetoclásticas, também conhecida como metanogênese acetoclástica (SPEECE, 1995), de acordo com a Equação 7.



Como pode ser observado na Figura 1, a produção biológica de  $\text{H}_2$  e a degradação anaeróbia de materiais orgânicos, compartilham as primeiras etapas: a hidrólise, acidogênese e a acetogênese.

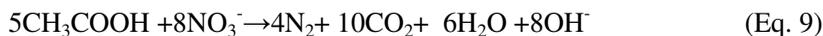
Observa-se, pelas Equações 1, 2 e 5 que os ácidos acético e butírico são subprodutos da produção biológica de  $\text{H}_2$ . Nota-se ainda que, quando o subproduto da reação é o ácido acético (Eq 1), 4 moles de  $\text{H}_2$  são produzidos a partir de 1 mol de glicose, ao passo que, quando o ácido butírico é produzido, apenas 2 moles de  $\text{H}_2$  são produzidos (Eq. 2 e 5).

Pode-se observar na Figura 1 também, que o sucesso da produção de  $\text{H}_2$  via biológica por culturas mistas requer a supressão da atividade de microrganismos que catalizam reações que consomem  $\text{H}_2$ ,

tais como a homoacetogênese (Eq. 8) e a metanogênese hidrogenotrófica (Eq. 6).



Além destas reações, o  $\text{H}_2$  ou o material orgânico podem ser usados como doadores de elétrons para a redução de nitratos/nitritos e sulfatos, por bactérias redutoras de nitrato/nitrito e sulfato redutoras, gerando nitrogênio gasoso ou amônia e sulfetos, respectivamente (VALDEZ-VAZQUEZ; POGGI-VARALDO, 2009). A reação de desnitrificação com o acetato como doador de elétrons está representada na Equação 9.



Na Tabela 2 estão resumidas as reações da degradação anaeróbia de glicose com ênfase nas reações produtoras de  $\text{H}_2$  e consumidoras de  $\text{H}_2$ , com suas respectivas energia livre padrão de Gibbs.

Tabela 2: Reações da degradação anaeróbia de glicose, consumidoras de H<sub>2</sub> e produtoras de H<sub>2</sub>, com suas respectivas energia livre padrão de Gibbs.

<b>Tipo de reação</b>	<b>Reações</b>	<b>Δ°G<sup>(a)</sup> (Kj/reação)</b>
Fermentação	$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \Leftrightarrow 2H_2 + \text{butirato} + 2HCO_3^- + 3H^+$	-135
Fermentação	$C_6H_{12}O_6 + 4H_2O \Leftrightarrow 4H_2 + 2 \text{acetato} + 2HCO_3^- + 4H^+$	-207
Oxidação anaeróbica (sintotrófica)	$\text{Butirato} + 2H_2O \Leftrightarrow 2H_2 + 2\text{acetato} + H^+$	+48,2
Oxidação anaeróbica (sintotrófica)	$\text{Propionato} + 3H_2O \Leftrightarrow 3H_2 + \text{acetato} + HCO_3^- + H^+$	+76,2
Metanogênese hidrogenotrófica	$4H_2 + HCO_3^- + H^+ \Leftrightarrow CH_4 + 3H_2O$	-136
Acetogênese de CO <sub>2</sub> e H <sub>2</sub>	$4H_2 + 2HCO_3^- + H^+ \Leftrightarrow \text{acetato} + 4H_2O$	-105

(a)Condições padrões. Adaptado (VALDEZ-VAZQUEZ; POGGI-VARALDO, 2009).

A análise do equilíbrio químico das reações que ocorrem nos sistemas anaeróbios pode ser efetuada pela variação da energia livre padrão ( $\Delta G^\circ$ ), a qual deve apresentar valores negativos para que a reação seja favorável no sentido de formação dos produtos. Nas reações apresentadas na Tabela 2 vale destacar a importância que o hidrogênio assume no equilíbrio químico, ou seja, dependendo do valor de sua pressão parcial, as reações podem ter seus equilíbrios deslocados para geração dos produtos ou dos reagentes. Dessa forma, a estabilidade e a eficiência dos processos anaeróbios estão relacionadas com os aspectos termodinâmicos dessas reações, as quais interagem entre si (CAMPOS, 1999).

A acetogênese, etapa essencial da conversão de compostos intermediários a acetato e  $H_2$ , é termodinamicamente pouco favorável, sob condições padrões, portanto é importante que essas espécies químicas sejam removidas do meio, deslocando o equilíbrio da reação no sentido da formação desses produtos (CAMPOS, 1999). Os cálculos termodinâmicos associados às reações acetogênicas permitem determinar que essas reações são termodinamicamente favoráveis quando a pressão parcial de  $H_2$  é muito baixa ( $10^{-4}$  atm para a conversão de propionato e  $10^{-3}$  para butirato) (ANGENENT et al., 2004).

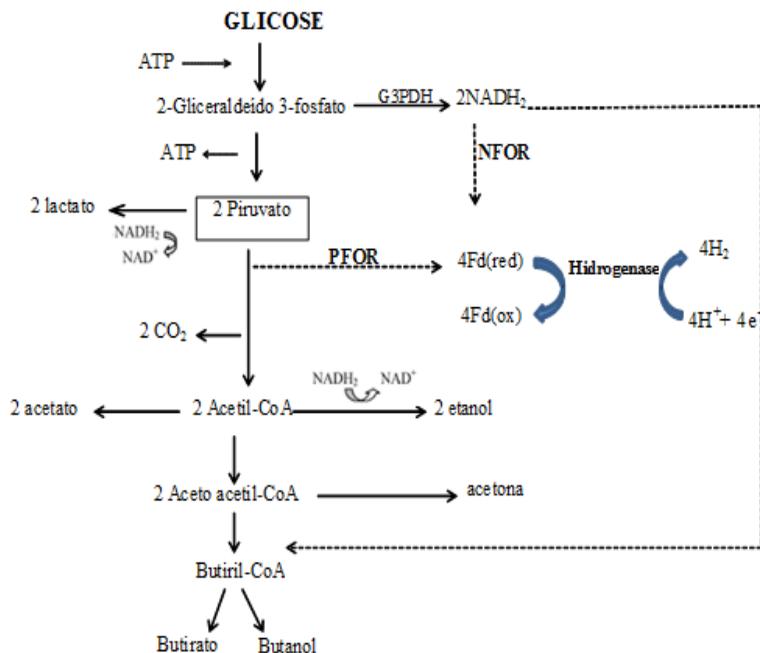
### 3.2.1 Vias bioquímica de produção de $H_2$ por fermentação

A produção biológica de  $H_2$  por fermentação ocorre a partir da oxidação de materiais orgânicos, sob condições anaeróbias, realizada por microrganismos heterotróficos, anaeróbios facultativos ou anaeróbios estritos. Esse processo de degradação da matéria orgânica gera elétrons e a formação de  $H_2$  ocorre como forma de dissipar o excesso de elétrons produzidos pelo metabolismo fermentativo, para a manutenção do equilíbrio redox intracelular (SINHA; PANDEY, 2011)

Como pode ser observado na Figura 2, em microrganismos estritamente anaeróbios, como do gênero *Clostridium*., o piruvato, produto da glicólise, é convertido a acetyl-CoA e  $CO_2$ , pela enzima piruvato ferredoxina oxidoreductase (PFOR). A oxidação do piruvato necessita da ferredoxina para transferir seus elétrons aos prótons ( $H^+$ ) e formar o  $H_2$ . A transferência dos elétrons da ferredoxina reduzida aos prótons é catalisada pela enzima hidrogenase. Esse processo resulta em um rendimento máximo de 2 moles de  $H_2$  por mol de glicose (SINHA;

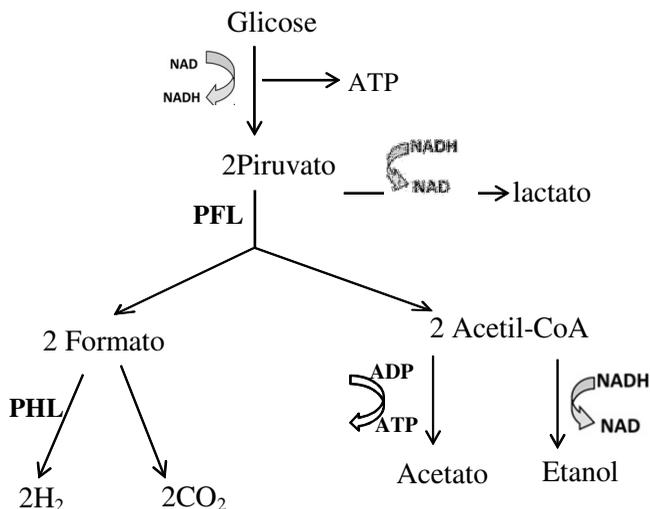
PANDEY, 2011). Outros 2 moles de  $H_2$  podem ser formados a partir da oxidação do NADH produzido durante a glicólise. O NADH também transfere seus elétrons à ferredoxina por intermédio da enzima NADH: ferredoxina oxidoreductase (NFOR). A oxidação da ferredoxina reduzida pela hidrogenase gera mais 2 moles de  $H_2$ . Assim, em microrganismos estritamente anaeróbios, o rendimento máximo de  $H_2$  é de 4 moles por mol de glicose, com a formação de 2 moles de ácido acético, conforme mostrado anteriormente na Equação 1. Entretanto, na prática rendimentos bem menores são alcançados, pois a oxidação de NADH pela NFOR, apenas ocorre sob baixas pressões parciais de  $H_2$  (VALDEZ-VAZQUEZ; POGGI-VARALDO, 2009; SINHA; PANDEY, 2011). Se a NFOR é inibida por elevadas pressões parciais de  $H_2$ , o NADH será reoxidado em outras vias do metabolismo com a formação de butirato, lactato ou etanol. Portanto, o rendimento teórico de  $H_2$  depende dos metabólitos formados, tais como o acetato, butirato, acetona, lactato e etanol. Os maiores rendimentos de  $H_2$  são alcançados quando o produto gerado é o acetato (4 moles de  $H_2$ ) e o butirato com rendimento teórico máximo de 2 moles de  $H_2$ , conforme Equações 1 e 2, descritas anteriormente. Quando álcoois são os produtos da fermentação, um rendimento ainda menor de  $H_2$  é obtido, pois esses ainda contêm átomos de hidrogênio que não podem ser usados na produção de  $H_2$ . A presença de lactato, como subproduto da fermentação, também representa uma diminuição do rendimento de  $H_2$ , pois é uma forma de reoxidação do NADH, sem a formação de  $H_2$  (SINHA; PANDEY, 2011).

Figura 2: Vias bioquímicas utilizadas pelo *Clostridium* para conversão de carboidratos em  $H_2$ ,  $CO_2$ , ácidos orgânicos e solventes. Fonte: adaptado de SINHA; PANDEY, (2011).



Quando o hidrogênio é produzido por bactérias anaeróbias facultativas, a via bioquímica difere das anaeróbias estritas. A via envolve outras enzimas, a piruvato-formato-liase (PFL) e a formato-hidrogênio-liase (PHL), cujas reações que catalizam estão apresentadas na Figura 3 (HALLENBECK; GHOSH, 2012). O piruvato, proveniente da glicólise, é convertido primeiramente em formato e acetilCoA, pela ação da enzima PFL. O formato, por sua vez, é transformado em dióxido de carbono e hidrogênio, pela enzima PHL. Os principais microrganismos anaeróbios facultativos capazes de produzir o  $H_2$  são : *Escherichia coli*, *Klebsiellae* *Enterobacterspp.* (ELSHARNOUBY et al., 2013), *Bacilluspp.* e *Pseudomonas spp.* (KHANNA et al., 2012), entre outras.

Figura 3: Vias bioquímicas utilizadas pela *Enterobacter spp.* para produção de hidrogênio. Fonte: adaptado de Hallenbeck; Ghosh, (2012).



### 3.3 Pré-tratamentos de culturas mistas para a produção biológica de H<sub>2</sub>

Um dos maiores desafios para o desenvolvimento da tecnologia de produção biológica de H<sub>2</sub> é a preparação de grandes quantidades de fontes naturais de inóculos estáveis e ativos. Para aumentar a velocidade de produção de H<sub>2</sub> é importante desenvolver métodos que inibam a atividade dos microrganismos consumidores de H<sub>2</sub>, tais como as metanogênicas que exclusivamente favoreçam o enriquecimento das bactérias produtoras de H<sub>2</sub>, tais como as dos gêneros *Clostridium* e *Enterobacter* (HAWKES et al., 2002).

Mohan (2009), em revisão da literatura aponta para a necessidade do pré-tratamento de culturas mistas a fim de enriquecer o inóculo em bactérias produtoras de H<sub>2</sub>, e revelar elevadas diferenças de rendimentos entre lodos pré-tratados e não tratados. Muitos são os métodos de pré-tratamento de culturas mistas descritos na literatura para

o enriquecimento de bactérias produtoras de  $H_2$ . Dentre estes tratamentos, destacam-se o térmico (LAY et al., 2012; LIN; ZHENG; JUAN, 2012), o químico (GUO et al., 2010; CHANG et al., 2011; NING et al., 2012; OZKAN et al., 2012; YANG et al., 2013) e a lavagem seletiva (NASR et al., 2011; BADIEI et al., 2011; MARIKAKIS et al., 2011).

A maioria dos artigos sobre a produção biológica de  $H_2$  utiliza lodos anaeróbios pré-tratados pelo calor (LAY et al., 2012; LIN; ZHENG; JUAN, 2012; KANG; KIM; LEE, 2012). O tratamento térmico do lodo cria condições adversas aos microrganismos não esporulantes. Portanto, é o comumente utilizado para o enriquecimento em bactérias formadoras de esporos, como o *Clostridium*, principal gênero produtor de  $H_2$  (LAY et al., 1999). O tempo e a temperatura utilizados para o tratamento térmico também diferem bastante entre os trabalhos, sendo que 100°C entre 15 e 30 min é a combinação mais comum (PRAKASHAM et al., 2012; CHEN et al., 2012). Muitos estudos têm utilizado diversas razões de tempo e temperatura para o pré-tratamento do lodo. De acordo com Li e Fang (2009), não há condições ótimas de temperatura de aquecimento e duração do tratamento térmico.

Lin et al. (2012) submeteram uma cultura acidogênica a um tratamento térmico com quatro temperaturas diferentes. O tratamento térmico a 50 e 60°C não foi eficiente para aumentar o desempenho da cultura mista na produção de  $H_2$ . Porém, o tratamento térmico a 70 e 80°C aumentou significativamente o conteúdo de  $H_2$  no biogás. Segundo os autores, o tratamento térmico a 70 e 80 °C foi efetivo na eliminação de bactérias não produtoras de  $H_2$  e possibilitou um rápido reestabelecimento das populações acidogênicas.

Sano et al. (2006) trataram termicamente um lodo metanogênico variando a temperatura entre 60 a 90°C, o tempo de aquecimento de 0 a 60 min e o pH durante o choque térmico, entre 3,3 e 9,6 para avaliar os efeitos dessas condições sobre a produção de  $H_2$ . Após o pré-tratamento, os experimentos foram conduzidos em batelada a 35°C usando glicose como substato. Foi encontrado um rendimento máximo de  $H_2$  no lodo pré-tratado a 70°C por 30 min e pH 6. Acima dessa temperatura, as bactérias acidogênicas foram danificadas.

Os tratamentos químicos também têm sido bastante utilizados no preparo de inóculos de culturas mistas produtoras de  $H_2$ . Dentre os métodos químicos mais utilizados, destacam-se, principalmente, o uso de 2-bromoetanossulfonato-BES (inibidor específico das metanogênicas),

tratamento ácido (pH 3) e alcalino (pH > 10). Chang et al. (2011) avaliaram diferentes pré-tratamentos em lodo ativado para aumentar a produção de H<sub>2</sub>. Os pré-tratamentos utilizados pelos autores foram ácido, básico, choque térmico, aeração, clorofórmio e BES. Nesse estudo o lodo ativado foi enriquecido em ordem decrescente de produção de H<sub>2</sub>: ácido > base > térmico > aeração > clorofórmio > controle > BES. Portanto, a maior quantidade de H<sub>2</sub> produzida foi obtida pelo tratamento ácido. Porém, a produção de H<sub>2</sub> no lodo tratado com BES foi ainda menor que o controle. Cada tratamento resultou em diferentes tipos de fermentação. Fermentação do tipo ácido-butírico foi alcançada pelos tratamentos ácido e básico, fermentação do tipo ácido-misto foi alcançada pelos tratamentos térmicos e pelo uso de clorofórmio, fermentação do tipo etanólica foi observada usando aeração, BES e no controle.

Condições ácidas ou básicas são recomendadas para tratar lodos e aumentar a produção de hidrogênio (ASSWAMONGKHLISIRI et al., 2013; ELBESHBYSHY et al., 2010; CHANG; LIU, 2011; YIN et al., 2014). Alavagem seletiva do lodo é uma estratégia utilizada com a finalidade de selecionar, em biorreatores contínuos, os microrganismos mais especializados e ativos nas condições de operação do biorreator. Essa estratégia tem como fundamento a utilização de TRHs mais baixos, ou D mais elevados do que a velocidade específica de crescimento das bactérias que se pretende lavar, de forma a tornar o lodo mais rico nas bactérias de interesse (KIELING et al., 2007). Portanto, aplicando-se um valor de D maior do que a velocidade específica de crescimento do microrganismo ( $D > \mu_{max}$ ) promove-se a lavagem desse microrganismo em um biorreator operado em modo contínuo (LUO et al., 2010<sup>c</sup>). Chen e Lin (2004) operaram um biorreator alimentado com sacarose para produzir hidrogênio, sem adaptação do inóculo, portanto com a presença de microrganismos consumidores de hidrogênio. No entanto, com a diminuição do TRH de 20 d para 2,5 d e chegando a 6 h, os autores conseguiram selecionar uma cultura enriquecida em *Clostridium pasteurianum*, notadamente uma espécie produtora de H<sub>2</sub>.

A combinação de diferentes pré-tratamentos de lodos também foi relatada como benéfica para a produção de hidrogênio (CUI; SHEN, 2012). Mohan et al. (2008) demonstraram que a integração dos métodos ácidos e por outros compostos químicos promoveu um aumento na produção de H<sub>2</sub> de 16 vezes em relação ao controle. Já o tratamento térmico associado ao ácido promoveu um aumento de 11,5 vezes em relação ao controle, assim como o ácido, seguido do térmico aumentou

em 6 vezes a produção de hidrogênio comparado ao lodo sem tratamento.

Outros pré-tratamentos, como a aeração e o uso de irradiação são menos frequentes, mas também são reportados na literatura, a fim de enriquecer inóculos em bactérias produtoras de  $H_2$ . Song et al. (2012) estudaram os efeitos de quatro pré-tratamentos em dejetos de bovino e a respectiva comunidade microbiana em fermentação escura. Os métodos usados foram A (infravermelho por 2 h), B (adição de água numa proporção sólido/líquido 1:4 e fervura por 30min), C (aeração forçada por 72 h a temperatura ambiente) e D (mistura numa proporção sólido/líquido 1:4, seguida da adição de açúcar, 5 g/L, aerado continuamente, por 72 h). Os efeitos dos pré-tratamentos em relação ao rendimento de  $H_2$  foram classificados  $A > B > D > C$ . O método A foi o mais eficaz, pois obteve a maior produção de  $H_2$  (290,8 mL/L) os gêneros preponderantes foram *Clostridium*, *Enterobacter*, *Lactobacillus* e *Streptococcus*.

Entretanto, Luo et al. (2010<sup>b</sup>) alertam para os riscos em se extrapolar o aumento da produção de  $H_2$  por cultura mista pré-tratada, observado em testes em batelada, para o processo contínuo, operado por longos períodos. Os autores aplicaram diferentes pré-tratamentos em lodo anaeróbio, verificando em seguida o mais eficiente na produção de gás hidrogênio a 60°C. Após a primeira etapa realizada em batelada, os biorreatores foram operados em modo contínuo (CSTR) com TRH (Tempo de Retenção Hidráulica) de 3 dias. Durante o estado estacionário de operação desses biorreatores foi observado que o lodo anaeróbio, sem qualquer tipo de pré-tratamento, exibiu a maior produção de  $H_2$ , contradizendo relatos anteriores de que pré-tratamentos do inóculo melhoram significativamente a produção de  $H_2$ .

Portanto, cada método de pré-tratamento tem a sua eficácia associada à natureza do inóculo, ao substrato e a forma de operação do biorreator. Nesse sentido, o efeito do tratamento do inóculo na produção de hidrogênio deve ser estudado para cada combinação de cultura mista e substrato.

### **3.4 Produção biológica de $H_2$ por cultura mista**

O pré-tratamento do lodo não pode ser utilizado como estratégia única na seleção e enriquecimento de bactérias produtoras de

H<sub>2</sub>. Os fatores ambientais estão estreitamente relacionados com os métodos de enriquecimento de lodos em bactérias produtoras de H<sub>2</sub>. As condições ambientais de operação do biorreator devem favorecer o crescimento das bactérias produtoras de H<sub>2</sub> e desfavorecer o crescimento de microrganismos que catalisam reações de consumo de H<sub>2</sub>. Caso contrário corre-se o risco de, ao longo da operação dos biorreatores, o pré-tratamento do inóculo não ser mais suficiente na seleção das bactérias produtoras de H<sub>2</sub>. Portanto, é importante estabelecer condições ótimas para a operação do biorreator. Variáveis de grande importância na produção de hidrogênio por fermentação são a temperatura, pressão parcial de H<sub>2</sub>, pH e a carga orgânica (do inglês, *organic loading rate* – OLR).

A produção de H<sub>2</sub> por fermentação pode ser operada sob condições mesofílicas (30-40°C) e termofílicas (50-60°C). No entanto, a condição termofílica é considerada uma condição mais favorável para a produção de H<sub>2</sub>. Foi relatado que o crescimento de microrganismos não produtores de H<sub>2</sub> pode ser minimizado e as vias metabólicas para a produção de H<sub>2</sub> serem favorecidas sob condições termofílicas (VALDEZ; VAZQUEZ, 2005). Zhang e Shen (2005) observaram que na faixa de 25 a 40°C ocorrem as maiores eficiências do processo. A máxima porcentagem de H<sub>2</sub> verificada no biogás foi 42,9% no biorreator em batelada operado a 40°C. Segundo Rilling et al. (2000) a atividade acidogênica aumenta entre as temperaturas de 50-60°C, enquanto a atividade metanogênica é favorecida entre as temperaturas 30-37°C. Portanto, a temperatura entre 50-60°C é favorável à produção de H<sub>2</sub>.

O aumento da temperatura também promove a diminuição da solubilidade do H<sub>2</sub>, diminuindo o efeito inibitório causado pela pressão parcial de H<sub>2</sub> (WEILAND, 2010). A pressão parcial de H<sub>2</sub> é fator de grande importância durante a operação de biorreatores para a produção de H<sub>2</sub>. O aumento da concentração de H<sub>2</sub> no *headspace* do biorreator resulta numa diminuição do potencial redox H<sup>+</sup>/H<sub>2</sub> e o fluxo de elétrons da ferredoxina reduzida para a formação do H<sub>2</sub> molecular via hidrogenase é inibido. Os elétrons são, então, desviados para a geração de NADH, resultando num aumento de outros metabólitos, tais como o etanol, butanol e ácido láctico (VALDEZ-VAZQUEZ; POGGI-VARALDO, 2009). Para minimizar o efeito do aumento da pressão parcial de H<sub>2</sub> no *headspace*, foi proposto por alguns autores a aspersão contínua de gases inerte no *headspace* do biorreator (VALDEZ-

VAZQUEZ et al., 2006), ou o uso de membranas específicas para a adsorção de  $H_2$  (LIANG et al., 2002).

O pH é um parâmetro importante na produção de  $H_2$ , pois influencia nas atividades enzimáticas e conseqüentemente nos caminhos metabólicos do processo de fermentação. A formação de ácidos orgânicos de cadeia curta, durante o processo de biodigestão, provoca a queda no pH do meio, quando a alcalinidade do sistema não é suficientemente elevada. A redução do pH a valores inferiores a 6,5 favorece o desenvolvimento das bactérias acidogênicas (cujo pH ótimo é de 5,5 a 6,0), prejudicando o desenvolvimento das metanogênicas (cujo pH ótimo é entre 6,7 a 7,2) (VALDEZ-VAZQUEZ; POGGI-VARALDO, 2009). A maioria dos trabalhos sobre produção biológica de  $H_2$  por cultura mista relata que o pH ótimo para a produção de  $H_2$  é em torno de 4,5 a 6,5 (MOHAN, 2009; CHEONG; HANSEN, 2006).

Entretanto, esses valores variam muito entre os estudos. Mu et al. (2006) estudaram a produção de  $H_2$  em um biorreator anaeróbio de manta de lodo, variando o pH de 3,4 para 6,3. Os autores verificaram que o pH mais favorável para a produção de hidrogênio foi em torno de 4,2. Antonopoulou et al. (2010) estudaram a influência do pH na produção de  $H_2$  por fermentação com extrato de sorgo doce. Os autores operaram um biorreator anaeróbio contínuo de mistura completa, com volume de trabalho de 0,5 L, aplicando TRH 12 h e a 35 °C. Os valores de pHs estudados foram 6,5, 6,2, 5,3, 5,1, 4,7, 4,6 e 3,5. A produção máxima de  $H_2$  e o maior rendimento foram observados em pH 5,3, sendo que 1752 mL de  $H_2$ /d foi produzido e o rendimento chegou a 0,93 mol de  $H_2$ /mol de glicose consumida. A produção de  $H_2$  cessou apenas quando o pH decresceu para 3,5. Os autores relataram que o rendimento de hidrogênio foi correlacionado com a produção de butirato, pois o alto rendimento de hidrogênio foi alcançado quando o butirato foi o principal produto metabólico. Chen et al. (2012) estudaram o pH de produção de  $H_2$  a partir de casca de arroz usando cultura mista em condições termofílicas. Concluíram que o melhor pH para produzir  $H_2$  a partir deste substrato é 6,5 à temperatura de 55°C. Não existe uma relação clara entre a carga orgânica aplicada e o rendimento de  $H_2$ , pois alguns estudos relatam que excesso reduz a produção de  $H_2$  (GINKEL; LOGAN, 2005; KIAZZE et al., 2006) e outros que o excesso aumenta o rendimento de  $H_2$  (ZHANG et al., 2004; WU et al., 2006). Hafez et al. (2010) estudaram o efeito da carga orgânica sobre o desempenho do biorreator IBRCS (do inglês, *integrated biohydrogenreactor clarifier system*). O estudo mostrou que a melhor relação

Substrato/Microrganismo encontrada para biorreatores foi de 4,4-6,4 g de DQO/g SVTd.

Nasr et al. (2011) estudaram a produção de  $H_2$  a partir de vinhaça, comparando dois tipos de lodos ADS (lodo de digestor anaeróbio) e AADS (lodo de digestor anaeróbio aclimatado). Os autores relataram que a razão substrato/biomassa experimental ótima de foi de 1-2 gDQO/gSSV, usando o ADS, e 3-6 g DQO/gSSV, usando o AADS. A velocidade de produção de  $H_2$  na segunda condição (AADS) foi 3,5 vezes maior que a primeira condição (ADS). Ozmihci et al. (2011) investigaram os efeitos da concentração de microrganismos e de substrato na produção de  $H_2$  por hidrolisado ácido de resíduo de trigo em condições termofílicas ( $55^{\circ}C$ ) em batelada. Para investigar os efeitos de concentração de biomassa e da concentração de açúcares totais, este último permaneceu constante em 20 g/L e a concentração de biomassa variou entre 0,52 e 2,58 g/L de sólidos totais. A máxima produção de  $H_2$  foi de 582 mL e a maior velocidade de produção de  $H_2$  de 5,43 mL/h com concentração de biomassa de 1,32 g/L. No entanto, o maior rendimento de  $H_2$  de 2,7 mol de  $H_2$ / mol de glicose foi com 0,52 g/L de célula. Antonopoulou et al. (2011) operaram um biorreator contínuo com TRH de 12 horas variando a concentração de substrato de 9,89 g/L para 20,99 g/L de glicose presente em extrato de sorgo doce. A maior produção de  $H_2$  foi obtida com a concentração de 17,50 g/L de glicose e o rendimento foi de 0,74 mol de  $H_2$ /mol de glicose consumida

Também é importante observar a fonte de carbono utilizada na fermentação para produzir hidrogênio, pois cada fonte de carbono resulta em caminhos metabólicos e rendimento em  $H_2$  diferentes. A preferência pela glicose tem sido observada em muitos estudos. Kim e Kim (2012) estudaram várias fontes de carbono, incluindo xilose, glicose, galactose, sacarose, celobiose e o amido para produção de hidrogênio por fermentação escura, sob condições termofílicas ( $60^{\circ}C$ ). Os autores concluíram que os rendimentos de  $H_2$  em ordem crescente foram: sacarose (3,17) > galactose (3,07) > glicose (3,01) > celobiose (2,45) > amido (2,08) > xilose (1,77 mol  $H_2$ /mol de hexose equivalente). Através do controle do pH (pH 5,5), o desempenho na fermentação foi melhor em todas as fontes de carbono. O rendimento de  $H_2$  de celobiose aumentou 1,9 vezes e a remoção de substrato subiu para 93,8%. Embora os ácidos acético e butírico foram os metabólitos principais, o ácido láctico foi detectado na fermentação da xilose, celobiose e amido, que tiveram baixa produção de  $H_2$ . Os autores concluíram que as fontes de carbono podem conduzir a diferentes

vias metabólicas, resultando em diferentes quantidades de ácidos orgânicos e, portanto, diferentes rendimentos de  $H_2$ .

### **3.5 Análise da diversidade dos microrganismos baseadas em biologia molecular**

#### **3.5.1 Análise de DGGE**

Existem muitas técnicas baseadas no DNA utilizadas atualmente para o estudo de comunidades microbianas. O método de DGGE envolve inicialmente a coleta de amostras ambientais, seguida de lise das células microbianas, extração dos ácidos nucleicos, amplificação de sequências específicas por PCR, geralmente todo ou parte do 16S rRNA. A análise dos fragmentos de DNA é feita em géis de eletroforese, que fornecem informação sobre o perfil de bandas amplificadas que podem posteriormente serem isoladas e sequenciadas.

Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE), posterior a reação em cadeia da polimerase (PCR) conhecida como PCR-DGGE é uma técnica molecular que permite o estudo das interações entre microrganismos e entre microrganismos e seu ambiente. PCR-DGGE tem a vantagem de não necessitar de conhecimento prévio sobre as comunidades microbianas sob estudo. Essa técnica é uma abordagem que pode gerar um padrão de diversidade genética em ecossistemas microbianos complexos, como o trato gastrointestinal, solos, sedimentos, águas profundas, rios, fontes termais e biofilmes (MUYZER; UITTERLINDEN, 1993; MUYZER; KORNELIA, 1998). Uma grande vantagem deste método é a possibilidade de visualizar e monitorar alterações no perfil de várias comunidades microbianas que sejam submetidos a diferentes tratamentos ou ambientes. É uma técnica rápida e eficiente de separação das sequências de DNA de mesmos comprimentos de um determinado gene amplificado por PCR, ainda que esse gene se diferencie de outros por apenas um par de base, (MUYZER; UITTERLINDEN, 1993; MUYZER; KORNELIA, 1998; SHEFFIELD et al., 1989).

Para a separação pelo DGGE, fragmentos específicos do gene que codifica o 16S rRNA têm de ser amplificados por PCR. Produtos de PCR obtidos com um conjunto de primer que se anexam a regiões conservadas do gene para 16S rRNA e abrangem uma, ou até três

regiões variáveis tem sido utilizados. Se um conjunto de primers universais forem utilizados, o padrão de bandas obtido (“fingerprint”) representa fragmentos amplificados a partir de cópias das regiões conservadas do gene que codifica o 16S rRNA dos organismos mais dominantes nessas comunidades. O “fingerprint” por DGGE, associado aos sequenciamento das bandas e análise filogenética, é uma das técnicas que tem sido mais empregada nos estudos da diversidade estrutural de comunidades microbianas (MUYZER et al., 1993; TESKE et al., 1996 apud: MORAIS, 2008).

O DGGE é utilizado quando se deseja somente comparar a composição da comunidade microbiana por “fingerprints” entre várias amostras. Se o requerido é a identificação das espécies da amostra, tem-se a possibilidade de sequenciamento de bandas, é um processo mais rápido e barato que a clonagem.

### 3.5.2 Sequenciamento de genes para o estudo de comunidades microbianas

O sequenciamento tem como principal vantagem a relativa facilidade de processar e comparar um elevado número de amostras. A aplicação de primers universais para amplificação direta de sequências do rRNA 16S, através de PCR do DNA total de uma comunidade microbiana para sequenciamento têm gerado uma vasta quantidade de dados sobre a diversidade de procaríotos. O sequenciamento do gene rRNA 16S permite a identificação de células, mesmo em pequenas quantidades. Com isso, obtemos importantes informações sobre a composição taxonômica da comunidade microbiana. Dessa maneira, a construção de bibliotecas genômicas de rRNA 16S representa uma poderosa ferramenta para a análise da diversidade molecular de comunidades de microrganismos (RODRIGUES, 2011).

Zhang et al. (2011) estudaram a diversidade microbiana de solos produtores de hidrogênio. Os autores utilizaram a técnica de DGGE e sequenciamento, mas o sequenciamento foi feito a partir do gel de DGGE. Os autores Chen et al. (2012), Kim e Kim (2012), Monlau et al. (2013) e Santos et al. (2014), utilizaram a técnica DGGE e sequenciamento para estudar a comunidade microbiana. Já neste trabalho, utilizou o DGGE para comparar as amostras e sequenciou-se o DNA inicial das amostras (Kavamura et al., 2013).

### 3.5.3 Diversidade

A diversidade dentro de um habitat não deve ser confundida com a diversidade de uma região que contém vários habitats. Portanto, de acordo com a escala utilizada, pode-se distinguir três tipos de diversidade: alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ) e gama ( $\gamma$ ). A diversidade  $\alpha$ , ou local, corresponde à diversidade dentro de um habitat ou comunidade, e é bastante sensível à área e intensidade da amostragem. A diversidade  $\gamma$ , ou regional, corresponde à diversidade de uma grande área, bioma, continente, ilha, etc. A diversidade  $\beta$  corresponde à diversidade entre habitats ou outra variação ambiental qualquer, isto é, mede o quanto a composição de espécies varia de um lugar para outro (BARROS, 2007).

Alguns modelos descrevem a diversidade de maneira mais completa. Os índices baseados nas abundâncias (frequência) das espécies são as medidas de diversidade mais utilizadas. Esses índices levam em conta a equitabilidade (uniformidade) e a riqueza de espécies. A dificuldade de se definir diversidade reside no fato de saber definir dois fatores, a variedade de espécies e abundância relativa das espécies (MAGURRAN, 2004).

### 3.5.4 Medidas de diversidade

A variação de espécies existentes entre comunidades pode ser representada e quantificada de diversas maneiras: a mais comum delas é por meio dos índices de diversidade. Os índices de diversidade mais comumente utilizados são: Shannon e Simpson (MAGURRAN, 2004).

### 3.5.5 Análise de agrupamento

A análise de agrupamento é utilizada para verificar a formação de grupos de espécies dentro de uma comunidade ou entre comunidades microbianas. A análise é apresentada por uma forma gráfica denominada dendrograma. Quando há comunidades sendo comparadas simultaneamente uma boa representação da diversidade microbiana pode ser obtida através das análises de agrupamento (*cluster analysis*). A análise de agrupamento é obtida através de uma matriz, as amostras são combinadas por similaridade para formar um grupo único. As

análises procedem até o último grupo ser combinado, originando um dendrograma.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.6 Inóculo

Foi utilizada cultura mista, ou seja, lodo coletado de um biorreator anaeróbio de fluxo ascendente, operado sob condições termofílicas (45-50°C), utilizado no tratamento de águas residuárias de uma usina de açúcar e etanol (vinhaça), localizada na região de Ribeirão Preto – SP. O inóculo foi mantido no laboratório a temperatura ambiente em frascos de 5 L, alimentado diariamente pela retirada de 1 L de sobrenadante e adição de 1 L de meio de cultura contendo 10 g/L de glicose e nutrientes. O pH foi ajustado diariamente para 6,0 ( $\pm 0,2$ ).

#### 3.7 Meio de cultura

A fonte de carbono utilizada em todos os experimentos deste trabalho foi glicose (Diprolab, Brasil) e as concentrações dependeram do ensaio realizado. A suplementação de nutrientes utilizada no meio de cultura foi a sugerida por Del Nery (1987), conforme Tabela 3.

Tabela 3: Composição da suplementação de nutrientes adicionada ao meio de cultura.

Componente	Quantidade (mg/L)
NiSO <sub>4</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,50
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2,50
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,25
CoCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,04
CaCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	2,06
SeO <sub>2</sub>	0,042
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5,36
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,30
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,76
Uréia	20

Fonte: Del Nery (1987),

### **3.8 Estudo da relação $S_0/X_0$ para a produção de $H_2$ com o lodo sem pré-tratamento**

Foram realizados ensaios em batelada para o estudo da produção de  $H_2$  por fermentação com diferentes relações iniciais de substrato/microrganismo ( $S_0/X_0$ ). O meio de cultura (item 4.2) adicionado ao inóculo continha seis diferentes concentrações de glicose. Após adição do meio ao lodo foi retirada uma amostra para a determinação da concentração de carbono orgânico total (COT) e dos Sólidos Voláteis (SV), perfazendo as diferentes relações  $S_0/X_0$ , que variaram entre 1,1 e 6,3 g de glicose/g de SV. Os ensaios cinéticos de fermentação foram realizados conforme item 4.5.

### **3.9 Pré-tratamentos do inóculo**

Foram realizados oito pré-tratamentos do inóculo, conforme descritos nos itens abaixo. Após os pré-tratamentos, o lodo foi colocado em biorreatores para a realização dos ensaios cinéticos de fermentação (conforme descrito no item 4.5) a fim de acompanhar a produção de  $H_2$ .

#### **1) Tratamento térmico a 100°C por 15 min;**

O tratamento térmico do inóculo foi realizado em um biorreator de vidro com volume útil de 1,5 L ao qual foi adicionado 1 L do lodo no biorreator. As condições de tempo e temperatura do tratamento térmico foram as sugeridas por Kan (2013), 100°C por 15 minutos, seguido por resfriamento rápido. O biorreator foi colocado em um banho-maria com temperatura de 100°C, permanecendo nesta temperatura por 15 min. Após este período o biorreator foi resfriado em banho de gelo.

#### **2) Tratamento térmico a 100°C por 60 min;**

Este tratamento foi realizado da mesma maneira do descrito anteriormente, mas as condições de tempo e temperatura do tratamento térmico foram as sugeridas por Zhang et al. (2011) de 100°C por 60 minutos.

### **3) Tratamento térmico a 80°C por 15 min;**

Este tratamento térmico foi realizado conforme descrito nos itens anteriores e as condições de tempo e temperatura utilizadas foram as sugeridas por Whang et al. (2011) de 80°C por 15 min

### **4) Tratamento térmico a 80°C por 60 min;**

Este tratamento também foi realizado conforme descrito nos itens anteriores e seguiu-se as condições de tempo e temperatura sugeridas por Whang et al. (2011) de 80°C por 60 min.

### **5) Tratamento ácido (pH 3 com HCl);**

O tratamento ácido do inóculo foi realizado em um biorreator com volume útil de 1,5 L ao qual foi adicionado 1 L do lodo no biorreator. O lodo foi acidificado até pH 3,0 com HCl 1mol/L, permanecendo por 24 h a temperatura ambiente (CHANG et al., 2011).

### **6) Tratamento combinado (pH 3 e fervura por 30 min);**

O tratamento ácido do inóculo foi realizado em um biorreator com volume útil de 1,5 L ao qual foi adicionado 1 L do lodo no biorreator. Esse lodo foi acidificado até pH 3,0 com HCl 4% ( deixado em repouso por 24h) e fervido por 30 minutos, de acordo com Cui e Shen(2012).

### **7 e 8) Lavagem seletiva do lodo em reator de tanque agitado contínuo (chamado de CSTR do inglês continuous stirred-tank reactor) , operado a 50°C com TRH de 12h e 6 h;**

Para a lavagem do lodo foi utilizado um biorreator de vidro de volume de 1,5 L, sendo externamente envolvido por um cilindro de vidro com uma diferença de 2 cm no diâmetro em relação ao biorreatores. A diferença entre o diâmetro dos cilindros, externo e interno, constituiu uma camisa de troca térmica, permitindo a circulação de água a 50°C (temperatura de realização das lavagens).

O biorreator foi inoculado com um volume de 1 L de lodo, sendo esse o volume útil do biorreator. A concentração de sólidos voláteis inicial foi determinada e em seguida iniciou-se a alimentação contínua do biorreator que foi operado como um CSTR, de forma que parte do lodo era retirada do biorreator, juntamente com o líquido, de acordo com o TRH aplicado. A alimentação foi feita com meio contendo glicose e nutrientes e o pH inicial do meio de alimentação foi

ajustado em 6,0. A concentração de glicose, vazões e cargas orgânicas volumétricas aplicadas ao biorreator quando os Tempos de Retenção Hidráulica (TRH) foram aplicados estão resumidos na Tabela 4.

A carga orgânica volumétrica ( $CO_v$ ), o TRH e a vazão específica de alimentação (D) foram calculados de acordo com as Equações 12, 13:

$$CO_v = \frac{Q \cdot S_0}{V} \quad (\text{Eq. 10})$$

$$TRH = \frac{V}{Q} \quad \text{ou} \quad D = \frac{1}{TRH} \quad (\text{Eq. 11})$$

Onde:

V - volume do biorreator (L);

Q - vazão de alimentação do biorreator (L/d);

$S_0$  - concentração de glicose na alimentação do biorreator (g/L).

TRH - Tempo de Retenção Hidráulica (d)

D - Vazão específica de alimentação ( $d^{-1}$ )

Tabela 4: Concentração de glicose, vazão e cargas orgânicas volumétricas aplicadas ao biorreator contínuo de mistura completa de 1 L, para a lavagem do lodo em diferentes TRHs, a 50°C e pH inicial de 6,0.

Concentração de glicose (g/L)	Vazão (L/d)	Carga orgânica volumétrica (g/L.d)	TRH (d)	D ( $d^{-1}$ )
20	2	40	0,5	2
20	4	80	0,25	4

Ao longo do período de lavagem dos biorreatores, aos quais foram aplicados os TRHs de 0,5 e 0,25 d, ou  $D$  2 e 4  $d^{-1}$ , foi feito um acompanhamento da concentração celular, através da determinação dos sólidos voláteis totais no biorreator. Esses valores foram utilizados para calcular a velocidade específica de crescimento celular, por meio do balanço de massa de células em um biorreator contínuo homogêneo sem reciclo, conforme a Equação 14. (SCHMIDELL, 2001).

$$\frac{dX}{dt} = (\mu - D).X \quad (\text{Eq. 12})$$

Integrando a Equação 14, para  $\mu$  e  $D$  constantes tem-se

$$X = X_i \cdot e^{(\mu - D)t} \quad (\text{Eq. 13})$$

Onde:

$X_i$  = concentração celular inicial no biorreator (g/L);

$X$  = concentração celular no efluente no instante  $t$  (g/L);

$D$  = vazão específica de alimentação ( $d^{-1}$  ou  $h^{-1}$ );

$\mu$  = velocidade específica de crescimento do microrganismo ( $d^{-1}$  ou  $h^{-1}$ ).

### 3.10 Ensaios cinéticos em batelada para o acompanhamento da produção de $H_2$ por fermentação

Os ensaios em batelada foram baseados em metodologias para os ensaios de atividade metanogênica específica (AME) (Aquino et al., 2007) adaptado para a produção  $H_2$ . Para os ensaios realizados com o lodo sem tratamento com diferentes  $S_0/X_0$ , os ensaios foram realizados em biorreatores de 250 mL, adicionando-se 100 mL de lodo e 100 mL de substrato (meio de cultura).

Antes de iniciar os ensaios foi determinada a concentração de Sólidos Totais (ST) e voláteis totais (SV) do lodo. A condição anaeróbia foi mantida pelo borbulhamento de gás argônio durante 2 min. Após o borbulhamento de gás argônio foi retirada amostra do meio líquido para análises químicas. Antes de fechar os biorreatores para o início dos ensaios, o argônio foi borbulhado novamente. Após, o sistema operacional dos biorreatores em batelada foi montado no interior de uma

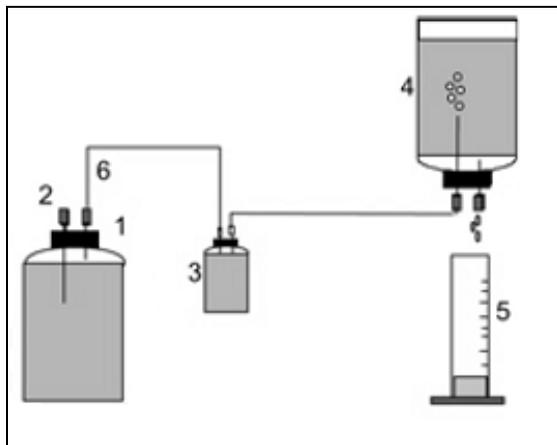
estufa. (Figura 4), onde a temperatura foi mantida a 50°C e a agitação orbital em 200 rpm. A tampa do biorreatores era constituída por rolha de silicone, na qual são acopladas duas tubulações: uma para a entrada de gás argônio (remoção de ar) e outra para saída do gás produzido no sistema. A tubulação de saída de gás foi acoplada a um sistema de medida de gás, no qual o gás produzido é recolhido em um frasco tipo Mariotte invertido contendo NaOH 5% (m/v). O volume de NaOH deslocado é captado em uma proveta e representa o volume de gás total gerado, exceto o CO<sub>2</sub> que fica retido no NaOH. A composição do gás gerado foi analisada por cromatografia gasosa.

Nos ensaios para o estudo da relação inicial substrato/microrganismo ( $S_0/X_0$ ) foi utilizado o inóculo (lodo anaeróbio) sem pré-tratamento com concentração de sólidos voláteis entre 1,1 e 1,6 g/L. O meio de cultura continha seis diferentes concentrações de glicose a fim de perfazer diferentes relações  $S_0/X_0$ , as quais foram calculadas após a determinação de SVTe COT, conforme item 4.7 e pH ajustado para 6,5.

Nos ensaios que utilizaram os lodos pré-tratados como inóculo foram utilizada a relação  $S_0/X_0$  de 2,0, sendo que a concentração de SV variou entre 2,05 a 2,30 pH foi ajustado para 6 ( $\pm 0,2$ ), com NaOH 10 % (m/v) ou HCl 1% (m/v).

Nos ensaios utilizados para investigar a melhor relação  $S_0/X_0$  dos lodos pré-tratados foram utilizadas relações  $S_0/X_0$  de 1,7 a 7,2.

Figura 4: Biorreatores em batelada para a produção biológica de hidrogênio por fermentação: 1) biorreatores; 2) ponto de borbulhamento de gás inerte e coleta de amostra; 3) frasco de segurança; 4) frasco Mariotte contendo NaOH 5 % (m/v); 5) proveta graduada para coleta da solução de NaOH deslocada; 6) ponto de amostragem do gás do *headspace*. Adaptado de García-Morales et al. (2001).



### 3.11 Cinética para produção de H<sub>2</sub>

As velocidades de produção de hidrogênio foram determinadas a partir dos valores de inclinação das tangentes das respectivas curvas de volume acumulado de hidrogênio em função do tempo. Considerando que há uma variação na inclinação das tangentes em determinados períodos de tempo, calculou-se as velocidades ( $r$ ) e velocidades específicas ( $\mu$ ) de acordo com as seguintes equações:

$$r_{H_2} = \frac{dP_{H_2}}{dt} \dots \dots \dots \text{Eq. (14)}$$

$$\mu_{H_2} = \frac{1}{X} \left( \frac{dP_{H_2}}{dt} \right) \text{Eq. (15)}$$

Sendo:

$r_{H_2}$ =velocidade de produção de hidrogênio em mL/h

$\mu_{H_2}$ = velocidade específica de produção de hidrogênio em mL/h.gSV

X= concentração de sólidos voláteis ao final do ensaio de fermentação emg/L.

### **3.12 Produção de H<sub>2</sub> em biorreatores operados em batelada sequenciais repetidas**

Foi utilizado biorreatores do tipo ASBR (“Anaerobic Sequential Batch Reactor”) de 450 mL de volume útil, em triplicata, para cada inóculo. Primeiramente mediu-se a quantidade de hidrogênio produzida pelo período de 24h, em seguida a agitação foi desligada por aproximadamente 1 h para ocorrer a sedimentação do lodo. A seguir, o pH foi medido e retirou-se 300 mL do sobrenadante de cada biorreator para posterior análise, durante 36 dias. Antes de iniciar a alimentação, a saída de gases era fechada. Após este procedimento, alimentou-se o biorreator com 300 mL de glicose (5g/L) adicionada da solução de micronutrientes (conforme item 4.2) corrigindo o pH para 6,0. Dessa forma, permitiu-se iniciar outra batelada. Esse procedimento foi realizado uma vez ao dia por um período de 36 dias. Diariamente foram feitas as análises do sobrenadante retirado para acompanhamento dos biorreatores: glicose inicial e final, pH inicial e final e sólidos voláteis.

### **3.13 Métodos Analíticos**

#### **3.13.1 Determinação dos Sólidos Totais e Sólidos Voláteis (ST e SV)**

Para a realização dessa análise foi efetuada a secagem de papel filtro em forno de micro-ondas, ajustado na potência de 180 Watts, durante 15 minutos. Filtrou-se a amostra com papel filtro previamente seco e, em seguida, secou-se o filtro com a amostra em forno micro-ondas mesmas condições descritas anteriormente. A concentração de sólidos totais foi obtida pela diferença de peso do papel

filtro antes e depois da secagem sendo considerado o volume de amostra utilizado para a análise. Para a determinação dos sólidos voláteis, utilizou-se o método descrito no *Standard Methods for the examination of water and wastewater*, o qual utiliza a queima da biomassa em mufla a 600 °C por 15 minutos (APHA, 2005).

### 3.13.2 Determinação do pH

A determinação do pH foi feita pelo pHmetro digital Marconi. O pHmetro foi calibrado diariamente com soluções tampão de pH 4,0 e de pH 7,0. Após calibrado, fez-se a leitura do pH das amostras (APHA, 2005).

### 3.13.3 Determinação de Carbono Orgânico Total e inorgânico (COT)

O analisador utilizado para análise de Carbono Orgânico Total foi Shimadzu- Modelo TOC-VCPN, por método de medida Direto-Combustão- oxidação catalítica a 680 °C. A detecção foi por NDIR (*non-dispersive infrared gas analyzer*), sendo utilizado um volume de amostra para IC (carbono inorgânico) de 27µL e volume de amostra para TC (carbono total): de 20 µL. O pré-tratamento para a determinação de IC foi a adição automática de ácido e injeção de gás. O gás carregador utilizado foi o oxigênio com fluxo de 230mL/min A condição de calibração utilizada foi a auto diluição de Padrão de Biftalato de potássio 1000ppm(seco a 110° C por 1 hora), variação de 50 a 1000ppm.

### 3.13.4 Análise da composição do gás nos biorreatores

A determinação dos gases através de cromatografia a gás (CG) foi realizada de acordo com Han e Shin (2003), modificando-se a temperatura do detector para 100°C. A concentração dos gases produzidos foi avaliada por meio da retirada de 0,3 mL de amostra do gás produzido na saída do biorreatores, utilizando-se uma seringa *gás tight*. A análise foi realizada em cromatógrafo a gás equipado com detector de condutividade térmica (TCD). A coluna utilizada foi uma coluna empacotada (ShinCarbon ST 100/120 mesh), peneira molecular

5A 2m x 2 mm, sendo o gás de arraste, argônio ultra puro sob vazão de 30 mL/min. As temperaturas do injetor, da coluna e do detector foram 80°C, 50°C e 100°C, respectivamente.

### 3.13.5 Análise de ácidos orgânicos voláteis e etanol por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A determinação dos subprodutos da fermentação, como os ácidos orgânicos voláteis e o etanol, foi realizada por CLAE, de acordo com metodologia descrita por Sá et al. (2011). As condições utilizadas foram coluna Aminex HPX-87H, fase móvel consistindo de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,005 mol/L, fluxo de 1.0 mL/min, temperatura do forno de 55°C e comprimento de onda de 210 nm. O cromatógrafo utilizado é composto pelos seguintes módulos: desgaseificador (modelo DGU-2A), bomba (modelo LC-10AD vp), injetor manual/ válvula reodyne, forno para coluna (modelo CTO-10AS), detector arranjo de diodo (modelo SPD-M10A vp) conectado em série com detector de índice de refração (modelo RID-10A). A aquisição e o tratamento dos dados foram controlados pelo software Class VP 6.1 (Shimadzu, Japão). Os ácidos orgânicos e alcóois.

### 3.14 Acompanhamento da microbiota por técnicas de biologia molecular

As análises por técnicas moleculares visaram à caracterização da diversidade microbiana do inóculo e consistiram nas seguintes etapas: extração do DNA, reação em cadeia polimerase (PCR), e separação dos segmentos amplificados no PCR usando eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) e/ou fazendo o sequenciamento.

As análises de biologia molecular foram feitas com amostras dos lodos utilizados para inocular os biorreatores operados em batelada, para os lodos pré-tratados e para o controle (lodo sem pré-tratamento). Além disso, foi realizado o acompanhamento das microbiotas durante a operação dos biorreatores a partir de amostras retiradas nos tempos 0, 12, 24 e 36 dias.

Em seguida, estão apresentados os procedimentos experimentais realizados no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Microrganismos (LBBMM) do Departamento de

Bioquímica (BQA) do Centro de Ciências Biológicas (CCB) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Também foram realizadas análises no Departamento de Ciência do Solo no laboratório Microbiologia Molecular e Ecologia Microbiana na Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/USP.

### 3.14.1 Extração do DNA genômico

O DNA foi extraído de acordo com a metodologia descrita para o kit Power Soil DNA Isolation (MoBio, EUA). Após a extração, foi verificada a integridade e a qualidade dos DNAs obtidos através da eletroforese em gel de agarose 1% (m/v), com coloração em brometo de etídeo e visualização em luz ultravioleta. Os DNAs foram quantificados por meio da análise em espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Scientific, EUA).

### 3.14.2 Amplificação do 16S rDNA

A partir do DNA genômico extraído da amostra, a amplificação do 16S rDNA foi realizada por meio da técnica de PCR utilizando-se os oligonucleotídeos universais para domínio Bactéria 27F (5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTACACTT 3'), para obter cópias do gene e especificar a região V6 do gene 16S. O volume final das reações foram de 25 µL contendo 1 µL de DNA, 1X tampão de PCR, 0,4 mM de cada oligonucleotídeo, 0,2 mM de cada DNTP, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 100% BSA e 0,05 U da enzima Taq DNA polimerase (*Invitrogen*). Nas reações foi utilizada água como controle negativo. A reação de amplificação foi realizada em termociclador e as condições de amplificação estão descritas na Tabela 5. Realizada a primeira reação de PCR, o produto dessa reação foi utilizado para realizar uma segunda reação de PCR direcionada para a região V6 e utilizando diferentes oligonucleotídeos como: U968 (5'-GC<sup>3</sup>CGCCCCGGGGCGCGCCCCGGGGCGGGGGCACGGGGGAACGCGAAGAACCTTAC-3') e R1387 (5'-CGGTGTGTACAAGGCCCGGAACG-3').

O volume final da segunda reação de PCR foi de 50 µL contendo 5 µL da primeira amplificação, 1X tampão de PCR, 0,4 mM

de cada oligonucleotídeo, 0,2 mM de cada DNTP, 2,5 mM de  $MgCl_2$ , 100% BSA e 0,05 U da enzima Taq DNA polimerase (*Invitrogen*). A reação de amplificação foi realizada em termociclador e as condições de amplificação estão descritas na Tabela 5.

Tabela 5: Condições empregadas na PCR.

Cíclon	Desnaturação inicial	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Extensão final	Resfriamento
30	94 °C 5 min	94 °C 30 s	57 °C 45 s	72 °C 1 min	72 °C 10 min	4 °C

### 3.14.3 Eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE)

O produto de PCR foi utilizado para realizar o DGGE conforme Heuer et al. (1997). Para a técnica de DGGE foi aplicado em gel de poli(acrilamida) 6% (m/v) em tampão TAE 1X. O gradiente desnaturante variou de 25 a 65% (onde 100% de desnaturação significa 7M de uréia e 40% de formamida). Os géis foram submetidos a eletroforese vertical por 16h a 100V à temperatura de 60°C e posteriormente corados por 1h com SYBR Gold (diluído 1:1000, Molecular Probes, Leiden, The Netherlands) e fotografado sob luz ultra violeta.

### 3.14.4 Identificação da comunidade bacteriana por meio de sequenciamento

A identificação da comunidade microbiana existente nos diferentes lodos foi baseada na amplificação da região V6 do gene 16S rRNA de bactérias. Os DNAs extraídos das amostras de diferentes lodos foram amplificados com os oligonucleotídeos 967F (59-CAACGCGAAGAACCTTAC C-39) e 1046R (59-CGACAGCCATGCANACC T-39). O oligonucleotídeo *foward* recebeu marcadores distintos (tags de identificação de 5 pares de bases) para cada uma das amostras analisadas. As reações de PCR foram conduzidas conforme proposto por Sogin et al. 2006. As condições de amplificações foram de volume final 50 µL contendo 5 µL da primeira amplificação, 1X tampão de PCR, 0,2 mM de cada oligonucleotídeo, 0,2 mM de cada DNTP, 5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 100% BSA e 0,01 U da enzima Taq DNA polimerase (*Invitrogen*). Nas reações foram utilizados controles negativos. Após a amplificação as amostras foram purificadas com o kit Charge Switch PCR Clean-UP (Life Technologies) e quantificadas utilizando Qubit 2.0 Fluorometer (Life Technologies) e sequenciadas utilizando o *Ion Torrent Personal Genome Machine*, sistema com 3 íons 316TM chip (Life Technologies, EUA) de acordo com Kavamura et al. 2013. As sequências obtidas foram comparadas com sequências publicadas em banco de dados NCBI (National Center for Biotechnology Information).

### 3.14.5 Índice de Shannon

O índice de Shannon ( $H'$ ) mede a diversidade de indivíduos em uma população com muitas espécies. As imagens do gel de DGGE foram analisadas pelo software ImagequantTL unidimensional (Amersham Biosciences, UK, 2003) para calcular a matriz de presença e ausência de bandas. A partir dessa matriz o programa Past 1.90 calcula o índice de Shannon utilizando o algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) com base no coeficiente de similaridade de Bray-Curtis (COSTA, 2012). O índice de Shannon ( $H$ ) varia entre 0 (apenas uma espécie) e um valor máximo correspondente a  $S$  espécies. Quanto menor o valor do índice de Shannon a diversidade da amostra é baixa e quanto maior o índice de Shannon, maior a diversidade microbiana na amostra. É calculado através da Equação 22.

$$H = - \sum_{i=1}^S (p_i)(\ln p_i) \quad \text{Eq. (16)}$$

onde  $S$  é o número de espécies,  $p_i$  é a proporção da espécie  $i$ , estimada como  $n_i/N$ , onde  $n_i$  é a medida de importância da espécie  $i$  (número de indivíduos), e  $N$  é o número total de indivíduos.

### 3.14.6 Análise de agrupamento

A análise de agrupamento foi utilizada para verificar a formação de grupos dentro de uma comunidade microbiana. A análise é apresentada por uma forma gráfica denominada dendrograma. Através da matriz de presença e ausência de bandas, foi calculada pelo *software Imagequant TL unidimensional* (Amersham Biosciences, UK, 2003), (MCGAIG et al., 2001), fez-se a análise de agrupamento, obtendo uma matriz com valores de distância e plotando-se o gráfico de similaridade entre as amostras. O dendrograma foi construído pelo *software Primer 5*.



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Efeitos da relação inicial substrato/microrganismo ( $S_0/X_0$ ) sobre a produção de hidrogênio por fermentação

A relação entre a concentração de substrato (S), ou fonte de carbono e a concentração de biomassa (X) também é conhecida como a relação Alimento/Microrganismo (A/M). Em estudos realizados em batelada por curtos períodos, em testes em batelada, esta relação é denominada de relação inicial substrato/microrganismo, ou seja, relação  $S_0/X_0$ . Segundo Aquino et al. (2007) para cada quantidade de biomassa existe uma faixa adequada de quantidade de substrato que varia com a natureza e atividade da cultura de microrganismos. Por isto, estes estudos devem ser realizados, individualmente, para cada cultura mista.

Neste trabalho, foram realizados ensaios em batelada com meio de cultura contendo diferentes concentrações de glicose mantendo a concentração de SV entre de 1,24 a 1,58 g/L. As concentrações iniciais da fonte de carbono foram determinadas pelas análises de COT e transformadas em glicose equivalente, para fins de comparação com a literatura, uma vez que a glicose foi a única fonte de carbono adicionada aos biorreatores. As relações de  $S_0/X_0$  foram calculadas com base na concentração de glicose equivalente e de SV no início dos ensaios. Os resultados estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6: Relações  $S_0/X_0$  calculadas a partir das concentrações de SV e glicose equivalente, utilizadas nos ensaios de produção de  $H_2$  em batelada.

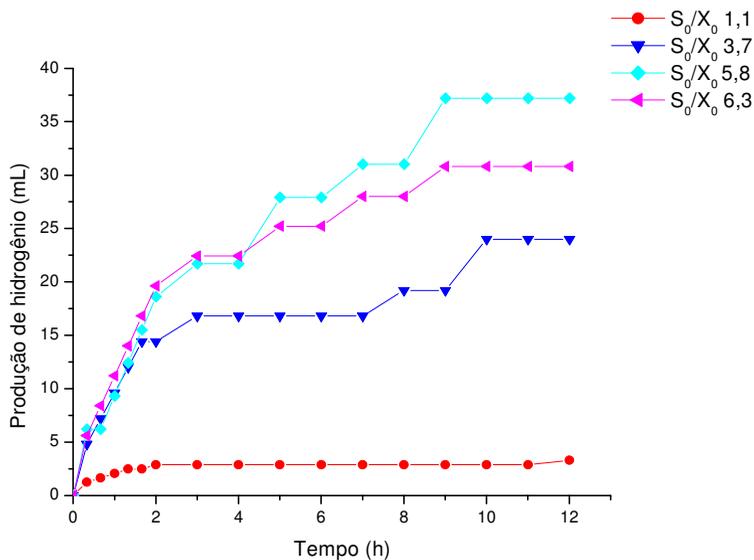
COT <sub>inicial</sub> (g/L)	Glicose eq. inicial (g/L)	SV (g/L)	$S_0/X_0$ (g glicose/gSV)
0,71	1,78	1,58±0,02	1,1
1,85	4,62	1,24±0,08	3,7
2,90	7,25	1,24±0,01	5,8
3,85	9,62	1,51±0,04	6,3

\* $S_0/X_0$  foi determinado com os valores iniciais de glicose equivalente a partir das concentrações de COT (fator 2,5).

A Figura 5 apresenta o volume de hidrogênio produzido durante os ensaios de produção de  $H_2$  em batelada, realizados com o inóculo

(lodo anaeróbico de sistema de tratamento biológico de vinhaça sem pré-tratamento) em diferentes relações  $S_0/X_0$  (Tabela 6). O volume de hidrogênio produzido foi acompanhado a cada 15 minutos, nas primeiras 2 horas de ensaio e após esse período, a cada hora.

Figura 5: Volume de hidrogênio acumulado (mL) ao longo do tempo, nos ensaios cinéticos com diferentes relações  $S_0/X_0$ .



Como pode ser observado na Figura 5 os ensaios com relações  $S_0/X_0$  1,1, 3,7, 5,8 e 6,3g glicose/g SV produziram 3,28, 24, 37,2, e 30,8 mL de hidrogênio em 12 horas de ensaio, respectivamente.

Diante dos resultados obtidos para produção de hidrogênio o intervalo de relação  $S_0/X_0$  entre 5,8 e 6,3g glicose/g SV foi escolhido como o mais adequado para a realização dos ensaios cinéticos de produção de  $H_2$  com o lodo sem qualquer tipo de pré-tratamento, pois foram os ensaios que produziram mais hidrogênio.

Na Tabela 7 estão apresentados os valores de pH e SV do início e final dos ensaios cinéticos realizados com diferentes  $S_0/X_0$ . A

variação do pH do início ao final do experimento (12 h de fermentação) foi menor no ensaio com  $S_0/X_0$  de 1,1 g glicose/ g SV no qual o pH variou de 6,5 a 6,35, aproximadamente. Já os valores de pH nos biorreatores com  $S_0/X_0$  entre 3,7, 5,8 e 6,3 g glicose/gSV variaram entre 6,5 até 4,93, do início para o final do experimentos. A diminuição mais acentuada do pH nos biorreatores com valores de  $S_0/X_0$  mais elevadas indica uma maior produção de ácidos orgânicos pela cultura mista. A concentração de biomassa caracterizada pela determinação de SV permaneceu praticamente constante durante a realização dos ensaios, pois todos os biorreatores apresentaram valores semelhantes de SV inicial e final. Provavelmente, o período de realização do experimento foi muito curto para observar crescimento celular pela determinação de sólidos voláteis.

Tabela 7: Valores de pH e SV do início e final do experimento com diferentes relações  $S_0/X_0$ .

$S_0/X_0$ (g glicose/ g SV)	pH inicial	pH final	SV inicial (g/L)	SV final (g/L)
1,1	6,51±0,05	6,35±0,01	1,58±0,02	1,56±0
3,7	6,53±0,01	5,23±0,04	1,24±0,08	1,20±0
5,8	6,49±0	4,93±0,02	1,24±0	1,24±0
6,3	6,50±0,05	5,04±0,145	1,51±0,045	1,37±0,05

Na Tabela 8 estão apresentadas as concentrações de glicose inicial e final determinada nos ensaios com as diferentes relações  $S_0/X_0$ . A partir desses valores foi verificado o consumo de glicose durante a realização dos ensaios, bem como os rendimentos de produção de  $H_2$  e as respectivas eficiências.

O consumo de glicose nos ensaios com as relações  $S_0/X_0$  5,8 e 6,3 g glicose/ g SV foi em média 6 mmol e o rendimento (Y) de produção de  $H_2$  a partir da glicose consumida para essas duas relações

foi de 0,22 e 0,17 mmol de H<sub>2</sub>/ glicose equivalente consumida, representando uma eficiência de 5%. A partir desses valores, observou-se que este lodo é pouco específico para a produção de H<sub>2</sub>.

Tabela 8: Consumo de glicose equivalente, rendimento e eficiência dos experimentos de produção de H<sub>2</sub> com diferentes relações S<sub>0</sub>/X<sub>0</sub>.

S <sub>0</sub> /X <sub>0</sub> (g glicose/ g SV)	1,1	3,7	5,8	6,3
Glicose eq. <sub>inicial</sub> (mmol)	4,9	13	20	26,7
Glicose eq. <sub>final</sub> (mmol)	3,75	10	14	20,5
Glicose <sub>consumida</sub> (mmol)	1,15	3	6	6,2
H <sub>2</sub> <sub>produzido</sub> (mmol)	0,115	0,84	1,30	1,08
Y (mmol de H <sub>2</sub> /mmol de glicose consumida)	0,10	0,28	0,22	0,17
Eficiência (%)	2,5	7,0	5,5	4,25

\*Concentração de glicose equivalente da Tabela 8 foi convertida em mmol, considerando 180g/mol de glicose e o volume do biorreatores de 0,5 L.

\*Os volumes de produção máxima de H<sub>2</sub> apresentados na Tabela 9 foram convertidos em mmol pela Equação dos gases ideais usando 1 atm e 50°C.

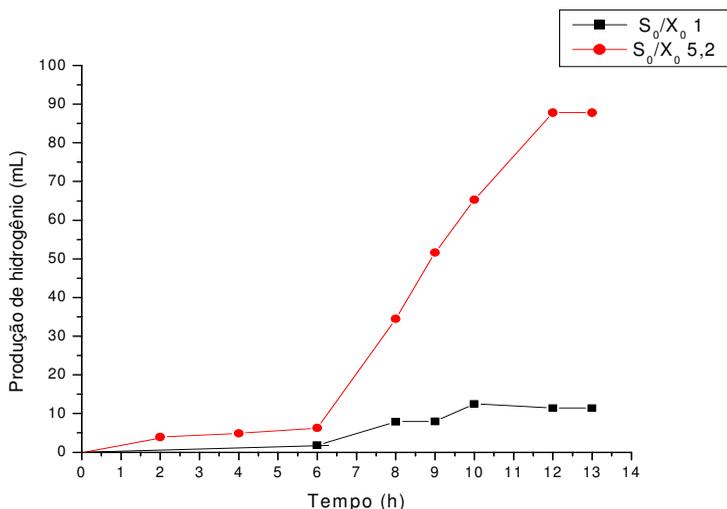
Para estudar com maiores detalhes as diferenças entre a produção de H<sub>2</sub> com baixa e alta relação S<sub>0</sub>/X<sub>0</sub>, foram realizados experimentos similares aos anteriores, mas apenas com as relações S<sub>0</sub>/X<sub>0</sub> 1,0 e 5,2g glicose/ g SV.

Na Figura 6 estão apresentados os resultados de produção de hidrogênio (mL) nos experimentos com S<sub>0</sub>/X<sub>0</sub> igual a 1,0 e 5,2g glicose/ g SV durante 14 horas de fermentação. Conforme se observa na Figura 7, após 6 h de experimento o volume de H<sub>2</sub> começa a aumentar em ambos os ensaios. Ao final de 14 h de experimento foi observada a

produção de 12 e 90 mL de  $H_2$ , nos ensaios com as relações  $S_0/X_0$  de 1,0 e 5,2g glicose/ g SV, respectivamente.

A análise cromatográfica de composição do gás revelou que no ensaio com  $S_0/X_0$  de 5,2 g glicose/ g SV, o  $H_2$  ao final de 14 h foi 60% e na relação  $S_0/X_0$  1,0g glicose/ g SV de apenas 8%. Estes resultados revelam a importância do estudo da relação  $S_0/X_0$  para a produção biológica de  $H_2$  pela cultura mista, pois quando a concentração de substrato foi aumentada (relação  $S_0/X_0$  de 5,2g glicose/ g SV), a formação de  $H_2$  foi altamente favorecida.

Figura 6: Volume de hidrogênio acumulado nos ensaios cinéticos com a relação  $S_0/X_0$  1,0 e 5,2g glicose/ g SV durante 14 horas de experimento.



O volume de hidrogênio acumulado total durante o ensaio e as velocidades de produção de  $H_2$  nas relações  $S_0/X_0$  de 1,0 e 5,2 g glicose/ g SV em 14 horas de ensaio estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9: Parâmetros cinéticos para a produção de H<sub>2</sub> nos ensaios com relação S<sub>0</sub>/X<sub>0</sub> de 1,0 e 5,2g glicose/ g SV.

S <sub>0</sub> /X <sub>0</sub> (g glicose/ g SV)	V (mL)	r <sub>H2</sub> (mL/h)	μ <sub>H2</sub> (mL/h.g SV)	R <sup>2</sup>
1,0	12	1,6	1,36	0,9741
5,2	89	13,7	11,7	0,9941

V: Volume acumulado de H<sub>2</sub> (mL); r<sub>H2</sub>: velocidade de produção de H<sub>2</sub> (mL/h); μ<sub>H2</sub>: velocidade específica (mL/h.gSV), no intervalo de 6 a 12h. R<sup>2</sup> se refere ao ajuste linear dos dados para a determinação de r<sub>H2</sub> nos intervalos mencionados.

Como pode ser observado na Tabela 9, o volume acumulado de H<sub>2</sub> (V) foi maior no ensaio com S<sub>0</sub>/X<sub>0</sub> de 5,2g glicose/ g SV (90 mL) quando comparado ao de S<sub>0</sub>/X<sub>0</sub> 1,0g glicose/ g SV (12 mL). Da mesma forma, a velocidade de produção (r<sub>H2</sub>) da relação foi mais elevada e a do ensaio com baixa relação foi de 1,6 e 13,7 mL/h de H<sub>2</sub>, respectivamente. Em ambos os ensaios foi utilizada a mesma concentração de SV de 1,17 g/L. Portanto, a diferença entre as velocidades específicas foram de 1,36 mL/h.gSV e 11,7 mL/h.gSV. As diferenças entre os parâmetros cinéticos das duas relações estudadas, mostrou que a maior relação S<sub>0</sub>/X<sub>0</sub> de 5,2g glicose/ g SV foi melhor para produzir hidrogênio para lodo sem pré-tratamento.

A quantificação de metabólitos microbianos solúveis, tais como os ácidos orgânicos voláteis e etanol, durante o processo de fermentação para a produção de H<sub>2</sub> fornecem importantes informações sobre o caminho metabólico seguido pelos microrganismos e são frequentemente utilizados para avaliar a eficiência da produção de H<sub>2</sub> (HAN; SHIN, 2004; ABREU et al., 2009; SÁ et al., 2011). Na Tabela 11 são apresentados os valores de pH, concentrações de glicose, SV, ácidos orgânicos e etanol no início e ao final dos experimentos com as relações S<sub>0</sub>/X<sub>0</sub> 1,0 e 5,2g glicose/ g SV.

Tabela 10: Valores de pH, SV, glicose, ácidos orgânicos e etanol (mmol/L) no início e final dos experimentos (diferença) com a relação  $S_0/X_0$  1,0 e 5,2 g glicose/ g SV.

$S_0/X_0$	1,0		5,2	
	Inicial	Final	Inicial	Final
pH	6,5±0,02	6,16±0,01	6,51±0,03	5,24±0,03
SV (g/L)	1,05±0,05	1,15±0,05	0,98±0,05	1,10±0,01
Glicose (mmol)	2,78	1,83	15,8	10,8
Glicose consumida (mmol)		0,95		5,0
H <sub>2</sub> produzido (mmol)		0,42		3,15
Y (mmolH <sub>2</sub> /mmol <sub>gli</sub> consumida)		0,44		0,63
Eficiência (%)		11		16
Ác láctico (mmol/L) variação		-	3,55±0,3	8,10±0,5
Ác. Acético (mmol/L) variação	10,1±0,2	10,1±0,3	11,87±0,02	43,46±0,05
Ác. Propiônico (mmol/L) variação	-	0,4±0,03	1,88±0,2	3,64±0,1
Etanol (mmol/L) variação	11,3±0,1	41,95±0,2	57,17±0,04	-
Ác. Butírico (mmol/L) variação	-	1,02±0,1	3,29±0,1	17,02±0,3
		1,02		13,73

(-): não detectado. Os valores apresentados foram convertidos em mmol pela equação dos gases ideais usando 1 atm e 50°C.

A variação do pH nos experimentos foi muito diferente entre os ensaios com relações  $S_0/X_0$  de 1,0 e de 5,2 g glicose/ g SV (Tabela 10), conforme já havia sido observado nos ensaios anteriores. Para a relação  $S_0/X_0$  mais baixa, o valor de pH manteve-se praticamente constante ao longo do ensaio, sofrendo um leve aumento entre 6,5 e 6,75. Já o valor de pH no experimento com  $S_0/X_0$  igual a 5,2 g glicose/ g SV, apresentou diminuição ao longo do experimento de 6,5 para 5,14. As diferenças entre as concentrações de SV do início para o final do ensaio foram pequenas, devido provavelmente ao curto período do ensaio e à natureza da análise realizada para verificar o crescimento celular, que foi a análise de sólidos voláteis.

Conforme pode ser observado na Tabela 10, no ensaio com relação  $S_0/X_0$  de 1,0 g glicose/ g SV o ácido acético, propiônico e butírico foram encontrados apenas em baixas concentrações. A concentração de ácido acético, principal metabólito da produção de  $H_2$ , permaneceu baixa e praticamente constante ao longo do ensaio. Estes resultados refletem a baixa produção de  $H_2$  (Figura 6), apenas 12 mL de  $H_2$ .

O metabólito encontrado em maior concentração no ensaio com  $S_0/X_0$  de 1,0 foi o etanol aumentou em cerca de 3,7 vezes (11,3 para 41,93 mmol). O aumento da concentração de etanol sugere que essa condição, de baixa concentração de fonte de carbono, favoreceu a formação de etanol pela cultura mista estudada. Ren et al. (2007) observaram o desenvolvimento de bactérias produtoras de  $H_2$ , via etanólica do tipo *Ethanoligenens harbinense* durante a produção de  $H_2$  em biorreatores contínuos alimentados com melão. Outros autores relatam a presença de bactérias produtoras de  $H_2$  e etanol em culturas mistas, principalmente sob condições termofílicas, mas em pHs mais baixos do que os utilizados neste experimento (REN et al., 2006; XING et al., 2008, ORLYGSSON et al., 2010). Neste trabalho, devido à origem da cultura mista, lodo oriundo de sistema de tratamento de vinhaça, não se pode descartar a possibilidade de que leveduras utilizadas no processo de fermentação etanólica, estejam presentes no lodo do sistema de tratamento de efluentes e que sejam as reponsáveis pela produção de etanol. Entretanto, na relação  $S_0/X_0$  de 5,2 g glicose/ g SV não foi observada a presença de etanol.

Os resultados das análises de ácidos orgânicos e etanol para o ensaio com  $S_0/X_0$  de 5,2 g glicose/ g SV (Tabela 10) mostraram que houve um aumento nas concentrações dos ácidos láctico, acético, propiônico

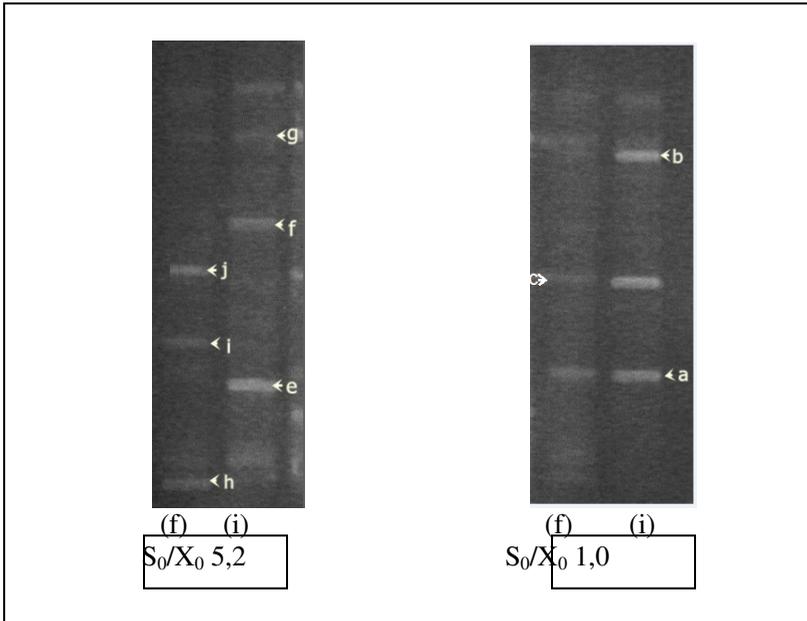
ebutírico decorrer desse ensaio. Nesse ensaio, o aumento das concentrações dos ácidos acético e butírico, principais metabólitos da produção de  $H_2$  por fermentação, coincide com o maior volume de  $H_2$ , comparada ao ensaio com baixa  $S_0/X_0$  (Figura 6). A concentração de ácido acético aumentou de 11,87 para 43,46 mmol/L. Pela relação estequiométrica da reação que envolve a formação de  $H_2$  a partir de glicose, 2 mmols de ácido acético seriam produzidos juntamente com 4 mmol de  $H_2$ . Apesar dos experimentos mostrarem claramente que a relação  $S_0/X_0$  de 5,2 é mais apropriada para a produção de  $H_2$ , comparada à relação  $S_0/X_0$  mais baixa, o rendimento de produção de  $H_2$  foi de 0,63 mmol  $H_2$ /mmol glicose consumida (Tabela 10), perfazendo uma eficiência de apenas 16 % em relação ao rendimento teórico máximo que é de 4 mmol  $H_2$ /mmol glicose.

Com o objetivo de aumentar o rendimento da produção de  $H_2$  foram realizados pré-tratamentos no lodo, visando o enriquecimento da cultura mista em microrganismos produtores de  $H_2$ .

#### 4.1.1 Análise das comunidades microbianas presentes nos ensaios com relações $S_0/X_0$ 1,0 e 5,2 g glicose/ g SV

Foram analisadas amostras do lodo utilizado como inóculo (0 h) e ao final (14 h) dos ensaios, em ambas as condições. Na Figura 7, está apresentada a fotografia do gel de DGGE das amostras de lodo no início e no final do ensaio.

Figura 7: Gel de DGGE com as amostras de lodo dos ensaios com  $S_0/X_0$  5,2 g glicose/ g S<sub>Ve</sub> com  $S_0/X_0$  1 g glicose/ g SV.



Uma identificação prévia dos microrganismos por comparação das sequências de DNA dos ensaios com  $S_0/X_0$  1,0 e 5,2g glicose/ g SV encontram-se resumidos nas Tabelas 11 e 12, respectivamente.

Tabela 11:Correspondência dos fragmentos do gel de DGGE dos ensaios com  $S_0/X_0$  de 1,0 determinados pelas suas sequências de 16S rDNA, com sequências do GenBank.

Afiliação / n° acesso	Banda	Similaridade (%)	Início	Final
<i>Nitratifactor</i>				
(CKF3D3T5016)	a	95	x	x
<i>Acetovibrio</i>				
(CEXXDGCK04)	b	96	x	
<i>Clostridium</i>				
(CF1754HY016)	c	96	x	x

No ensaio com relação  $S_0/X_0$  1,0 puderam ser identificadas apenas 3 bandas, cujas sequências podem representar a presença de diferentes microrganismos no início e no final do ensaio. As sequências obtidas foram comparadas com as depositadas no banco de dados GenBank (NCBI, 2012) pelo método BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Na Tabela 11 pode ser verificado que ao início deste ensaio está, provavelmente, presente, o gênero *Clostridium* (banda c), *Acetovibrio* (banda b) e *Nitratifactor* (banda a).

O gênero *Nitratifactor* (banda a) também apresenta elevada similaridade com o genoma de *Arcobacter*. Estes microrganismos são quimiolitotróficos presentes em ambientes com baixa concentração de oxigênio dissolvido, como as profundezas do oceano, e possuem como principal metabolismo a redução do nitrato utilizando o  $H_2$  como doador de elétrons, ou seja, um consumidor de  $H_2$  (NAKAGAWA et al., 2005). Possuem temperatura ótima de  $55^\circ C$ , crescem sob condições microaerofílicas e têm pH ótimo de 6,4. Essas informações coincidem com os resultados dos ensaios cinéticos, pois no volume total de gás produzido, o  $N_2$  foi o gás predominante (50%-dados não mostrados) e o  $H_2$  apareceu apenas em baixa concentração (5%). Os resultados referentes à presença de  $N_2$  não foram explorados, pois não é o objetivo deste trabalho.

O *Acetovibrio*, também identificado como possível microrganismo presente no início do ensaio com  $S_0/X_0$  1,0 (Tabela 11 –

banda c) é um microrganismo mesofílico e anaeróbico conhecido pela sua eficiente capacidade de degradar celulose microcristalina (DASSA et al., 2012). O gênero *Clostridium* (banda c) é descrito na literatura como o principal gênero produtor de  $H_2$ , conhecido também por ser acidofílico (LAY et al., 1999; FANG et al., 2006; BANDO et al., 2013). Este resultado indica que na cultura mista utilizada neste trabalho existem microrganismos potencialmente produtores de  $H_2$ , mas que, provavelmente, a condição de baixa concentração de substrato não tenha favorecido este metabolismo.

Os microrganismos identificados pela análise do fragmento do gel de DGGE do ensaio com  $S_0/X_0$  de 5,2 estão descritos na Tabela 12.

Tabela 12: Correspondências dos fragmentos do gel de DGGE dos ensaios com  $S_0/X_0$  5,2 determinados pelas suas sequências de 16S rDNA, com sequências do GenBank.

Afiliação / n° acesso	Banda	Similaridade (%)	Início	Final
<i>Clostridium acetobutylicum</i> (CF05P14W01R)	e	93	x	
<i>Clostridium perfringens</i> (CEYDVMPX016)	f	93	x	
<i>Thermoanaerobacteriac eae</i> (CEX4104B01R)	g	97	x	
<i>Bacillus sp</i> (CKGEZAEA014)	h	93		x
<i>Coprothermobacter sp.</i> (CKGXAMW01R)	i	91		x
<i>Clostridium botulinum</i> (CKK5G08C01R)	j	96		x

Os resultados da Tabela 12 mostram que o gênero predominante ao longo do ensaio com  $S_0/X_0$  de 5,2 g glicose/ g SV, foi o *Clostridium*, reconhecidamente produtor de  $H_2$ . Entretanto, a microbiota predominante mudou ao longo do ensaio, como pode ser observado nos principais microrganismos identificados no início e final do ensaio.

No início do ensaio com  $S_0/X_0$  de 5,2 g glicose/ g SV duas espécies de *Clostridium* foram encontradas, o *C. acetobutylicum* (banda e) e *C. perfringens* (banda f), ambas conhecidas como produtoras de  $H_2$  (LAY et al., 1999; LI; FANG, 2009). Nesta fase do ensaio também foi identificada a presença de *Thermoanaerobacteriaceae* (banda g) que está relacionado à oxidação do acetato, sob condições termofílicas (LIU; CONRAD, 2010). Estes microrganismos também são descritos como produtores de  $H_2$  em elevadas temperaturas (ELSHARNOUBY et al., 2013; JAYASINGHEARACHCHI et al., 2012).

Ao final do ensaio, foi observada a presença do gênero *Clostridium botulinum* (banda j), além do *Bacillus* sp. e *Coprothermobacter* sp. O gênero *Bacillus* sp. tem sido encontrado em culturas mistas para a produção de  $H_2$ , mas a sua função tem sido, predominantemente, relacionada ao consumo de  $O_2$  no meio por ser um anaeróbio facultativo, tornando o ambiente mais propício para a formação de  $H_2$  (HUNG et al., 2011). O gênero *Coprothermobacter* sp. por sua vez tem sido descrito como produtor de  $H_2$ , apenas sob condições termofílicas (TANDISHABO et al., 2012).

Adiferença entre a microbiota inicial nos ensaios com as diferentes relações  $S_0/X_0$  pode estar relacionada apenas à concentração das amostras aplicadas no gel de DGGE, uma vez que amostras mais diluídas são mais difíceis de serem visualizadas e coletadas. Sendo assim, algumas espécies que poderiam estar presentes e ativas podem não ter sido analisadas. No entanto, comparando-se as espécies encontradas para as duas relações  $S_0/X_0$ , pode-se sugerir uma ligeira diferença na microbiota que dominou os biorreatores. Observou-se para a relação  $S_0/X_0$  de 5,2 g glicose/ g SV maior frequência de espécies diretamente relacionadas à produção de hidrogênio (*Clostridium* sp.), o que sugere que este parâmetro tem influência na microbiota ativa no biorreator.

## 4.2 Pré-tratamentos do inóculo e acompanhamento da produção de $H_2$

Considerando os resultados obtidos nos ensaios com as diferentes relações  $S_0/X_0$ , nos quais os rendimentos de produção de  $H_2$  foram baixos (variaram entre 0,1 e 0,63 mmol  $H_2$ /mmol<sub>gli</sub> consumida), foram realizados pré-tratamentos na cultura mista com o objetivo de enriquecer em microrganismos produtores de  $H_2$  e

consequentemente aumentar o rendimento da produção de  $H_2$  pelo lodo estudado.

Pré-tratamentos de culturas mistas são normalmente utilizados para suprimir a atividade dos microrganismos consumidores de  $H_2$ , preservando a atividade dos produtores, tornando a cultura mista enriquecida em tais bactérias (ASSAWAMONGKHOLSIRI et al., 2013; PENTEADO et al., 2013; LIU et al., 2013; KAN, 2012, SONG et al., 2012).

Foram realizados oitotipos de pré-tratamentos do lodo, com base condições estabelecidas em trabalhos científicos anteriores, quais sejam:

- 1) tratamento térmico a  $100^\circ\text{C}$  por 15min (KAN, 2013);
- 2) tratamento térmico a  $100^\circ\text{C}$  por 60min (ZHANG et al., 2011);
- 3) tratamento térmico a  $80^\circ\text{C}$  por 15 min (WHANG et al., 2011);
- 4) tratamento térmico a  $80^\circ\text{C}$  por 60min (WHANG et al., 2011);
- 5) tratamento ácido (pH3 com HCl), (CHANG et al., 2011);
- 6) tratamento combinado (pH 3 efervura por 30 min), (CUI; SHEN, 2012);
- 7) lavagem seletiva do lodo em CSTR, operado a  $50^\circ\text{C}$  com TRH de 12h;
- 8)lavagem seletiva do lodo em CSTR, operado a  $50^\circ\text{C}$  com TRH de 6 h.

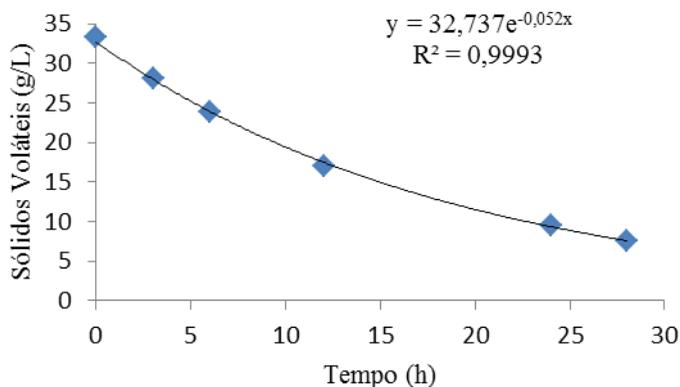
Nas Figuras 8 e 9 estão apresentados os resultados do acompanhamento da concentração de SV durante a lavagem seletiva do lodo realizada em dois CSTRs distintos, operados com TRHs de 12 e 6 h. Avazão específica de alimentação maior do que a velocidade de crescimento dos microrganismos ( $D > \mu$ ) aplicada a reatores contínuos, ocasiona a lavagem, o que fica evidenciado pela intensa redução da concentração celular (SV) observada nestas figuras.

Os valores de D escolhidos para o enriquecimento da cultura mista em bactérias produtoras de  $H_2$  foram de  $0,083\text{ h}^{-1}$  e  $0,17\text{ h}^{-1}$ , pois os TRHs encontrados na literatura com mais frequência para a operação de biorreatores contínuos para a produção de  $H_2$  com culturas mistas estão entre 12 e 6 h. Exemplo disto é o trabalho de Chen e Chang (2001) que estudaram o efeito de diferentes vazões específicas de alimentação (D) sobre a produção de  $H_2$  em biorreator aplicando valores de D entre  $0,075$ - $0,167\text{ h}^{-1}$ . O valor ótimo encontrado foi  $0,125\text{ h}^{-1}$ . Han e Shin (2004) estudaram a faixa de D entre  $0,0875$  e  $0,233\text{ h}^{-1}$ , para a produção de hidrogênio a partir de resíduos de alimentos, obtendo maiores

produções de  $H_2$  em  $0,1875 \text{ h}^{-1}$  (TRH= 5,3 h). Kim e Lee (2010) prepararam um inóculo com elevada produção de  $H_2$  por fermentação a partir da operação de um CSTR de 5 L a  $60^\circ\text{C}$ , aplicando um TRH de 10,3 h ( $D=0,097\text{h}^{-1}$ ).

A partir das equações exponenciais obtidas pelo ajuste dos dados experimentais de SV, pôde ser calculada as velocidades de crescimento dos microrganismos nos biorreatores.

Figura 8: Concentração de SV durante o período de lavagem do lodo em um CSTR, operado com TRH de 12h ( $D = 0,083 \text{ h}^{-1}$ ).



A partir da equação exponencial obtida pelo ajuste dos dados experimentais apresentada na Figura 9, pode ser calculado o valor da velocidade específica de crescimento dos microrganismos ( $\mu$ ):

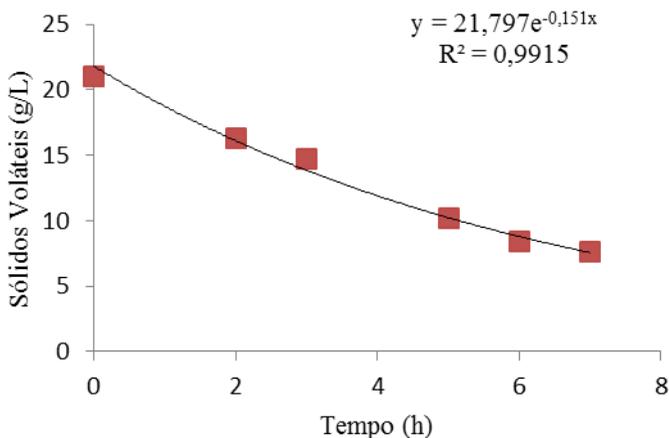
$$X = 32,737e^{-0,052t},$$

como  $(\mu - D) = -0,052$   
 $D = 0,083 \text{ h}^{-1}$

Logo:

$\mu = 0,031 \text{ h}^{-1}$
------------------------------

Figura 9: Concentração de SV durante o período de lavagem no CSTR, operado com TRH de 6 h ( $D=0,166 \text{ h}^{-1}$ ).



A partir da equação exponencial obtida pelo ajuste dos dados experimentais, pode ser calculado o valor de  $\mu$  :

$$X = 21,797e^{-0,12t} ;$$

$$\text{Como } (\mu - D) = -0,12$$

$$D = 0,166\text{h}^{-1}$$

$$\mu = 0,046 \text{ h}^{-1}$$

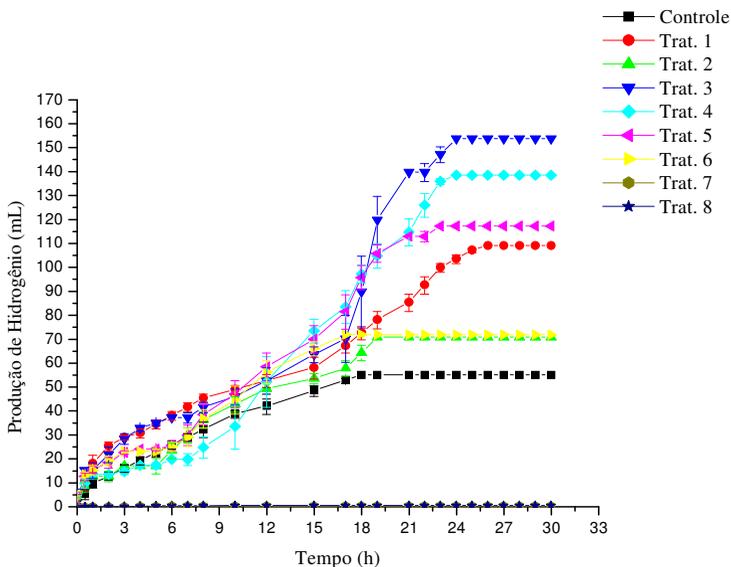
As velocidades de crescimento de  $0,031$  e  $0,046 \text{ h}^{-1}$  estimadas neste trabalho são menores do que os valores de  $\mu$  descritos na literatura para as bactérias acidogênicas produtoras de  $\text{H}_2$  ( $\mu=0,172 \text{ h}^{-1}$ ) (CHEN; CHANG, 2001). Deve-se considerar que as condições utilizadas nos ensaios de lavagem, tal como composição do meio de cultura, pH e temperatura interferem neste valor. A temperatura deste ensaio foi a  $50^\circ\text{C}$ , enquanto os valores da literatura são, na sua maioria, na faixa mesofílica. Os valores de  $\mu$  obtidos neste trabalho estão na mesma ordem de grandeza, mas foram diferentes, uma vez que estes foram estimados a partir de resultados de dois experimentos realizados independentemente.

Após o término dos pré-tratamentos (1 a 8) da cultura mista, estes lodos foram utilizados como inóculo de biorreatores anaeróbios, operados em batelada para o acompanhamento da produção de hidrogênio. O lodo sem sofrer qualquer tipo de pré-tratamento (controle) também foi usado com inóculo para fins de comparação, e a relação  $S_0/X_0$  utilizada nos ensaios foi de 5,5 g glicose/ g SV.

A Figura 10 apresenta o volume de hidrogênio produzido nos ensaios em batelada pelos lodos pré-tratados e o controle (lodo sem pré-tratamento), durante 30 horas de fermentação. Como pode ser observado na Figura 11, o lodo controle, sem qualquer tipo de pré-tratamento, teve a sua produção de gás estabilizada antes dos lodos pré-tratados, em cerca de 18 horas de ensaio. Os lodos pré-tratados continuaram a produção de gás por um período mais prolongado.

A importância dos pré-tratamentos como métodos de enriquecimento do lodo para a produção de  $H_2$  pode ser verificada pelos resultados apresentados na Figura 10, uma vez que os volumes de hidrogênio produzidos pelos lodos que sofreram a maioria dos pré-tratamentos foram superiores, quando comparados ao controle. Apenas os lodos que sofreram a lavagem seletiva, tratamentos 7 e 8, produziram um volume de hidrogênio inferior quando comparados ao controle, sugerindo, num primeiro momento, que estes tratamentos não foram eficientes para enriquecer o lodo em bactérias produtoras de  $H_2$ .

Figura 10: Volume acumulado de H<sub>2</sub> em função do tempo produzido pelos lodos. Controle (sem pré-tratamento); 1- Térmico 100°C/15 min; 2- Térmico 100°C/60 min; 3- Térmico 80°C/15 min; 4- Térmico 80°C/60 min; 5-Ácido pH 3/24h; 6- Ácido pH 3/24h e fervura/30 min; 7-Lavagem TRH 12h; 8-Lavagem TRH 6h. Arelação S<sub>0</sub>/X<sub>0</sub> utilizada nos ensaios foi de 5,5 g glicose/ g SV.



A produção de H<sub>2</sub> cessou após cerca de 30 h em todos os ensaios com os lodos pré-tratados. Após este período o volume de hidrogênio acumulado nos ensaios com os lodos submetidos aos pré-tratamentos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 foram 109, 71, 154, 139, 117, 72, 0,6 e 0,75 mL, respectivamente e o controle (sem tratamento) 31 mL. O maior volume de de hidrogênio foi produzido pelo lodo tratado a 80 °C por 15 minutos (tratamento 3), 154 mL de hidrogênio. No ensaio com o lodo tratado a 80 °C por 60 minutos (tratamento 4) o volume de hidrogênio também foi elevado (139 mL), seguido pelo ensaio com o lodo que sofreu tratamento ácido (tratamento 5) com 117 mL de H<sub>2</sub>. Na Tabela 14 estão apresentados os parâmetros cinéticos obtidos pelos dados experimentais..

Tabela 13: Parâmetros cinéticos de produção de  $H_2$  para os ensaios com os lodos submetidos aos pré-tratamentos e o controle. (1- Térmico 100 °C/15 min; 2- Térmico 100 °C/60 min; 3- Térmico 80 °C/15 min; 4- Térmico 80 °C/60 min; 5-Ácido pH 3/24h; 6- Ácido pH 3/24h e fervura/30 min; 7-Lavagem TRH 12h; 8-Lavagem TRH 6h). A relação  $S_0/X_0$  utilizada nos ensaios foi de 5,5 g glicose/g SV.

Tratamentos	V (mL)	$r_{H_2}$ (mL/h)	$\mu_{H_2}$ (mL/h.gSV)	$R^2$
Controle	31	2,06	0,98	0,9905
1	109	4,90	2,21	0,9921
2	71	2,49	1,19	0,9953
3	154	9,35	4,19	0,9907
4	139	11,84	5,43	0,9821
5	117	11,36	5,21	0,9951
6	72	4,24	1,92	0,9709
7	0,60	0,08	0,03	0,9903
8	0,75	0,10	0,04	0,9878

V: volume acumulado de  $H_2$  (mL);  $r_{H_2}$ : velocidade máxima de produção de  $H_2$  (mL/h);  $\mu_{H_2}$ : velocidade específica de produção de hidrogênio (mL/gSV.h). Controle: intervalo 2-13h; Trat.1: intervalo 15-26h; Trat. 2: intervalo 8-24h; Trat. 3: 8-21h; Trat.4: intervalo 14-24h; Trat. 5: intervalo 15-22h; Trat.6: intervalo 9-19h; Trat.7: intervalo 05-6h e Trat.8: intervalo 1,5-5h.  $R^2$  se refere ao ajuste linear dos dados para a determinação de  $r_{H_2}$  nos intervalos mencionados.

Os resultados apresentados na Tabela 13 revelaram que a maioria dos pré-tratamentos realizados na cultura mista foram efetivos para o enriquecimento em bactérias produtoras de  $H_2$ , o volume acumulado de  $H_2$  (V) e a velocidade máxima de produção ( $r_{H_2}$ ) aumentaram em relação ao controle. Entretanto, os lodos tratados pela lavagem seletiva (tratamentos 7 e 8) praticamente não produziram hidrogênio, comparadas ao lodo que não sofreu o pré-tratamento. As velocidades de produção de  $H_2$  foram estimadas a partir dos valores de maior inclinação das tangentes das respectivas curvas apresentadas na figura anterior. De acordo com os resultados apresentados na Tabela 13, os pré-tratamentos do lodo que foram mais adequados para aumentar o volume e a velocidade de produção de  $H_2$  foram os pré-tratamentos 3, 4 e 5, ou seja; os tratamentos térmicos a 80 °C por 15 min e por 60 min e o tratamento ácido (pH 3/HCl), respectivamente. A elevação da temperatura a 100 °C, apesar de ser um método citado na literatura para o enriquecimento em bactérias produtoras de  $H_2$  (PRAKASHAM et al., 2012; CHEN et al., 2012) não foi o mais adequado sob as condições utilizadas. Essa temperatura e o tempo parecem ter sido muito elevados e podem ter causado a eliminação de microrganismos produtores de  $H_2$  não esporulantes, tais como as enterobactérias (ELSHARNOUBY et al., 2013), que poderiam contribuir para o aumento do volume de  $H_2$  produzido.

As velocidades de produção de hidrogênio relatadas na literatura variam muito, pois dependem da natureza do inóculo e dos tipos de pré-tratamentos utilizados para o enriquecimento da cultura mista. Porém, os valores obtidos neste trabalho se encontram na mesma ordem de grandeza dos valores citados na literatura. Buitrón e Carvajal (2010) relataram velocidades de produção de hidrogênio que variaram de 17,2 a 274 mL/h utilizando diferentes concentrações de glicose (1 a 5 g/L) e temperaturas entre 25 e 35 °C. Já Assawamongkholisiri et al. (2013) relataram velocidades de produção de hidrogênio entre 3,23 a 34,56 mL/h para um lodo submetido a diferentes pré-tratamentos. Estes autores tiveram volumes maiores de  $H_2$  para o lodo tratado por ácido durante 6 horas.

Chang et al. (2011) utilizaram glicose como substrato em biorreatores em batelada para estudar as velocidades de produção de hidrogênio de lodos pré-tratados com ácido (pH 3/HCl), com base (pH 10/NaOH) e por temperatura (95 °C/30min). Nos ensaios realizados com o lodo controle, estes autores verificaram uma velocidade de 2,54 mL de  $H_2$  /h. Nos ensaios realizados com os lodos submetidos aos pré-tratamentos com ácido, com base e o térmico, as velocidades foram

22,26, 20,73 e 21,02 mL/h, respectivamente. Os valores obtidos por estes autores foram superiores aos deste trabalho, entretanto o tratamento ácido do lodo foi o mais eficaz no aumento da velocidade de produção de  $H_2$ , assim como nesse estudo.

Velocidades de produção de  $H_2$  inferiores às estimadas neste trabalho (Tabela 14) foram relatadas por Ning et al. (2012) para lodos pré-tratados com clorofórmio. No lodo controle a velocidade de produção de  $H_2$  foi de 4,2 mL/h, e para os lodos tratados com clorofórmio, nas percentagens de 0,025, 0,050, 0,100 e 0,125% as velocidades de produção de  $H_2$  foram 4,5, 9,1, 8,9 e 2,2 mL/h, respectivamente. Goud et al. (2013) observaram que o pré-tratamento térmico a 100 °C por 1h foi o mais eficiente para o enriquecimento de uma cultura mista anaeróbia. Entretanto, Monlau et al. (2013) verificaram que o tratamento ácido foi o mais eficiente para produzir  $H_2$ . Já Jia et al. (2013) compararam diferentes pré-tratamentos, tais como: ácido, alcalino, clorofórmio, BES, aeração, secagem e ultrassom. Os autores concluíram que o pré-tratamento mais eficiente para aumentar a produção de  $H_2$  foi a secagem do lodo a 60 °C por 24h.

Em outro trabalho a respeito do estudo de pré-tratamentos de culturas mistas, Elbeshbishy et al. (2011) relataram que a velocidade de produção máxima de  $H_2$  aumentou em 3 vezes quando o tratamento ácido (pH 3/HCl) foi combinado com o tratamento por ultrassom (20Hz). Na Tabela 15 estão apresentadas as concentrações de glicose do início e final dos ensaios de produção de  $H_2$ , bem como o rendimento e a eficiência dos ensaios com o lodo controle (sem pré-tratamento) e com os lodos pré-tratados.

Tabela 74: Concentrações de glicose no início e final do experimento, rendimento e eficiência dos ensaios em batelada com os lodos pré-tratados. (1- Térmico 100 °C/15 min; 2- Térmico 100 °C/60 min; 3- Térmico 80 °C/15 min; 4- Térmico 80 °C/60 min; 5-Ácido pH 3/24h; 6- Ácido pH 3/24h e fervura/30 min; 7-Lavagem TRH 12h; 8-Lavagem TRH 6h). A relação  $S_0/X_0$  utilizada nos ensaios foi de 5,5 g glicose/ g SV.

	Pré- tratamentos do lodo								
	Sem (controle)	1	2	3	4	5	6	7	8
Glicose <sub>inicial</sub> (mmol)	29,5	29,5	29,5	29,5	31	31,7	31,5	30,8	31,6
Glicose <sub>final</sub> (mmol)	11,75	12,6	14,1	15,5	16	15,3	16	21,8	21,6
Glicose <sub>consumida</sub> (mmol)	17,75	16,0	15,4	14	15	16,4	15,5	9	10
H <sub>2</sub> produzido (mmol)	1,08	3,82	2,49	5,4	4,87	4,10	2,52	0,02	0,02
Y									
(mmol de H <sub>2</sub> /mmol <sub>de</sub> glicose consumida)	0,06	0,24	0,16	0,38	0,32	0,25	0,16	0,002	0,005
Eficiência %	1,5	6,0	4,0	9,5	8,0	6,25	4,0	0,05	0,125

Os resultados apresentados na Tabela 14 demonstraram que as conversões (mmol de  $H_2$ /mmol de glicose consumida) nos ensaios realizados com os lodos pré-tratados foram superiores comparados ao ensaio controle, exceto para os ensaios inoculados com os lodos submetidos à lavagem seletiva (tratamentos 7 e 8), que tiveram conversões inferiores. Os maiores valores de conversão de substrato em produto foram verificados nos ensaios realizados com os lodos submetidos aos tratamentos 3, 4 e 5 e foram 0,38, 0,32 e 0,25 mmol de  $H_2$ /mmol de glicose consumida, respectivamente. Esses mesmos lodos pré-tratados foram os que apresentaram as maiores velocidades de produção de  $H_2$  (Tabela 13).

O lodo controle, sem pré-tratamento, apresentou conversão de apenas 0,06 mmol de  $H_2$ /mmol de glicose consumida, enquanto que em ensaios anteriores, com diferentes relações  $S_0/X_0$ , o lodo sem pré-tratamento atingiu rendimento de até 0,63 mmol de  $H_2$ /mmol de glicose (Tabela 14). Entretanto, como já foi mencionado anteriormente, em cada ensaio foi utilizado o lodo sem pré-tratamento (controle) para fins de comparação.

De acordo com estes resultados, pode-se concluir que os pré-tratamentos mais adequados para o enriquecimento deste lodo foram os tratamentos térmico a 80 °C por 15 e 60 min (tratamentos 3 e 4) e o tratamento ácido (tratamento 5). Os resultados apresentados nesse trabalho demonstram que diferentes métodos de pré-tratamentos aplicados à cultura mista responderam de forma diferente, mas que os pré-tratamentos aumentaram a velocidade de produção de  $H_2$  entre 1,29 e 5,3 vezes, quando comparado ao controle. Esta diferença entre as respostas obtidas pelos diferentes pré-tratamentos demonstra a importância em se estudar diferentes formas de enriquecimento de culturas mistas em bactérias produtoras de  $H_2$ . Nesse sentido, a contribuição deste estudo está relacionada à origem do lodo, proveniente de um reator anaeróbico para o tratamento de vinhaça. Culturas mistas dessa natureza ainda não foram estudadas como inóculo para a produção de  $H_2$  por fermentação.

Os métodos de tratamento do lodo realizados promoveram diferentes variações de pH nos ensaios de produção de hidrogênio. O pH inicial do controle e dos lodos pré-tratados variaram de 6 a 6,03. O decréscimo do pH nos ensaios com os diferentes lodos tratados está relacionado ao acúmulo de ácidos orgânicos produzidos durante as 24 horas de fermentação. O valor de pH final no lodo controle foi de 3,4,

mais baixo do que o pH final observado nos ensaios inoculados com os lodos pré-tratados. Nos ensaios realizados com os lodos submetidos aos tratamentos 2, 3, 4, 7, e 8 os pHs finais foram de 4,25, 4,9, 4,9, 4,9 e 4,63, respectivamente. Já os pHs finais dos ensaios com o lodo após tratamento 1, 5 e 6 foram de 5,1, 5,1 e 5,0, respectivamente. Os valores de pH ao final dos ensaios são semelhantes aos reportados por Ren et al. (2008) que utilizaram biorreatores em batelada para produzir  $H_2$  e encontraram ao final do experimento valores de pH final entre 4,5 e 5. Os autores tiveram maior produção de  $H_2$  em pH inicial 6,5 e temperatura de 60 °C. Já a concentração de sólidos voláteis que no início dos ensaios estava entre 2 e 2,3 g/L, após 24 horas de teste em batelada permaneceu praticamente constante, entre 2 e 2,2 g/L.

#### 4.2.1 Produção de metabólitos solúveis nos ensaios

A produção de  $H_2$  por fermentação é acompanhada da formação de ácidos orgânicos, especialmente o acético e o butírico. Entretanto, outros metabólitos solúveis, normalmente moléculas reduzidas, tais como o etanol e o ácido láctico, podem ser formados, competindo pelos equivalentes redutores, que seriam utilizados para a formação do  $H_2$ . Ou seja, a presença do ácido acético e butírico indica que a produção de  $H_2$  foi favorecida, enquanto que a presença de ácido láctico e etanol diminuem a formação do  $H_2$ . O ácido acético também indica um maior rendimento em  $H_2$  uma vez que, quando este ácido é o metabólito principal 4 mols de  $H_2$  por mol de glicose são formados, enquanto que quando o ácido butírico é formado o rendimento decresce para 2 mols de  $H_2$  por mol de glicose consumida. O ácido propiônico, assim como o acético e o butírico, é um metabólito da digestão anaeróbia, mas normalmente não é associado à produção de  $H_2$  (MATHEWS; WANG, 2009). A concentração dos ácidos orgânicos no início e ao final dos ensaios em batelada para a produção de  $H_2$  com os lodos pré-tratados e com o controle estão apresentados na Tabela 16.

Tabela 15: Concentração dos ácidos orgânicos no início (0 h) e ao final (24 h) dos ensaios em batelada para a produção de H<sub>2</sub> com os lodos pré-tratados e o controle. (1- Térmico 100°C/15 min; 2- Térmico 100 °C/15 min; 3- Térmico 80 °C/15 min; 4- Térmico 80 °C/30 min; 5-Ácido pH 3/24 h; 6- Ácido pH 3/24 h e Térmico 100 °C/30 min; 7-Lavagem TRH 12 h; 8-Lavagem TRH 6 h).

	Ác. Lático (mmol/L)		Ác. Acético (mmol/L)		Ác. Butírico (mmol/L)		Ác. Propiônico (mmol/L)	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
Controle	25,86±0,1	51,94±0,21	2,99±0,2	3,83±0,4	5,90±0,3	5,90±0,3	6,34±0,2	6,88±0,4
Variação	26,08	0,84			0		0,54	
Trat. 1	26,04±0,1	35,84±0,1	3,49±0,1	7,66±0,5	6,01±0,5	11,12±0,1	5,80±0,1	11,87±0,5
Variação	9,8	4,17			5,11		6,07	
Trat. 2	30,07±0,2	44,28±0,1	3,83±0,1	7,66±0,1	6,24±0,1	10,66±0,3	6,88±0,1	15,51±0,5
Variação	14,21	3,83			4,42		8,63	
Trat. 3	30,96±0,5	55,38±0,2	3,66±0,1	12,15±0,1	5,90±0,5	1,81±0,1	6,07±0,1	2,02±0,1
Variação	24,42	8,49			-4,1		-4,05	
Trat. 4	28,30±0,1	45,39±0,2	3,49±0,1	21,98±0,1	5,10±0,1	12,82±0,1	4,85±0,1	13,76±0,1
Variação	17,09	18,49			7,72		8,91	
Trat. 5	53,49±0,2	37,84±0,3	6,66±0,2	31,97±0,1	-	9,76±0,3	-	-
Variação	-15,65	25,31			9,76		-	
Trat. 6	51,59±0,3	44,95±0,4	5,99±0,5	15,32±0,5	7,71±0,3	12,03±0,3	-	-
Variação	-6,64	9,33			4,32		-	
Trat. 7	27,08±0,3	67,14±0,4	3,83±0,1	4,66±0,5	-	-	-	-
Variação	40,06	0,83			-		-	
Trat. 8	26,08±0,3	64,15±0,2	3,33±0,1	3,49±0,1	5,56±0,1	5,78±0,5	5,39±0,1	10,25±0,3
Variação	38,07	0,16			0,22		4,86	

(-) não detectado.

Na Tabela 15 não está apresentada a concentração de etanol, pois este metabólito não foi detectado em nenhum dos ensaios conduzidos com os lodos pré-tratados, nem no ensaio com o lodo controle (sem tratamento).

Os ácidos orgânicos, principalmente o ácido lático, foi detectado em elevadas concentrações já no início dos ensaios. Provavelmente, os ácidos foram liberados pelas condições impostas pelos pré-tratamentos, tais como elevadas temperaturas, pH ácido e até mesmo as condições de lavagem. Uma elevação na concentração de ácido lático foi observada ao final dos ensaios cinéticos com todos os lodos, exceto nos ensaios realizados com os lodos que sofreram os tratamentos ácido (tratamento 5) e ácido associado à temperatura (tratamento 6). Nestes ensaios (5 e 6) ocorreu um decréscimo, ou seja, um consumo de ácido lático, ao contrário dos demais ensaios, indicando diferença entre os metabolismos dos microrganismos selecionados por este tipo de pré-tratamento. Alguns estudos relatam ainda que o ácido lático pode ser utilizado como substrato para produção de  $H_2$  por algumas espécies de bactérias, tais como o *Desulfovibrio desulfuricans*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium tyrobutyricum* (HASHSHAM et al., 2000). Nos ensaios realizados com os lodos 7 e 8, ou seja, com os lodos que sofreram a lavagem aplicando TRH de 12 e 6 h, as concentrações de ácido lático ao final dos ensaios foram as mais altas, indicando que estes tratamentos, provavelmente, favoreceram o enriquecimento da cultura em microrganismos produtores de ácido lático. As bactérias lácticas crescem tanto em condições anaeróbias como em aeróbias. Elas multiplicam-se dependendo do pH, composição nutritiva e temperatura do meio (DICKS; ENDO, 2009; KONIG; FROHLICH, 2009). Todavia, o ácido lático também pode ser produzido por microrganismos produtores de  $H_2$ , como algumas cepas de *Clostridium* como uma forma de dissipar o excesso de elétrons, competindo, portanto, com a via fermentativa de formação de  $H_2$  (DICKS; ENDO, 2009; KONIG; FROHLICH, 2009). Já Noike et al. (2002) apontam que a presença de bactérias lácticas podem inibir a produção de hidrogênio. Em seu estudo, os autores utilizaram cepa de *Clostridium*, sabidamente produtor de hidrogênio, cultivada em presença de duas bactérias ácido-láticas, *Lactobacillus paracasei* e *Enterococcus durans*. O resultado deste estudo foi o decréscimo ou a inibição total da produção de hidrogênio pelo *Clostridium* em presença destas bactérias. Tal inibição foi parcialmente revertida na presença de tripsina, uma protease capaz de inativar as bacteriocinas (antibióticos) produzidas

pelas cepas de *Lactobacillus*. Jia et al. (2013) relataram que o pré-tratamento por aeração promoveu uma elevada produção de ácido láctico (59,60 mmol/L) entre os métodos de pré-tratamento de lodo estudados pelos autores, sugerindo que essa concentração pode ameaçar a eficiência da produção de H<sub>2</sub>.

O ácido acético, em baixas concentrações, foi detectado no início de todos os ensaios realizados com os lodos pré-tratados e com o lodo controle (sem tratamento). Entretanto, as maiores concentrações de ácido acético, 21,98 e 31,97 mmol/L, foram verificadas após a os ensaios de fermentação com os lodos que sofreram os pré-tratamentos térmico 80 °C/60 min e ácido, pré-tratamentos 4 e 5, respectivamente. Os ensaios que apresentaram as maiores concentrações de ácido acético também foram os ensaios, nos quais foi observada a maior produção de H<sub>2</sub>, uma vez que este é o principal metabólito da produção fermentativa de H<sub>2</sub>.

Entretanto, a presença de ácidos orgânicos no início do ensaio, dependendo da concentração, pode inibir a formação de H<sub>2</sub>. Wang et al. (2009) afirmaram que o acúmulo de ácidos orgânicos pode ser prejudicial para a produção de hidrogênio. Este efeito é mais acentuado em valores de pHs mais baixos, nos quais os ácidos orgânicos encontram-se predominantemente na sua forma protonada, o que facilita a sua entrada na célula, com consequente diminuição do pH intracelular e interrupção de várias vias metabólicas (PALMQVIST; HAHN-HAGERDAL., 2000; KLINKE et al., 2004). Em revisão bibliográfica, Mohan et al. (2007) destacaram o efeito inibitório dos ácidos orgânicos pela redução da capacidade tamponante do meio com consequente declínio do pH. Em valores de pH abaixo de 4,5 a produção fermentativa de H<sub>2</sub> é inibida.

Por outro lado, Kim et al. (2012) relataram que concentrações elevadas de ácido láctico e acético no início dos experimentos pode aumentar o rendimento na produção de hidrogênio, pois esses ácidos, dependendo da concentração e do pH do meio em que se encontram, podem ser utilizados como substratos na produção de hidrogênio.

Wang et al. (2008) investigaram o efeito inibitório do etanol e dos ácidos orgânicos (acético, propiônico e butírico) e etanol sobre a produção de H<sub>2</sub> em biorreator em batelada, utilizando como substrato a glicose a 35 °C e pH inicial 7. Os autores concluíram que a velocidade de produção de H<sub>2</sub> tende a diminuir com o aumento da concentração de etanol, ácido acético, propiônico e butírico. Sendo que o etanol tem

menor efeito inibidor, comparado aos ácidos orgânicos. Em estudo recente, Assawamongkholdiri et al. (2013) realizaram pré-tratamentos térmico, ácido e a combinação do térmico com o ácido para o enriquecimento de uma cultura mista em bactérias produtoras de  $H_2$ , e a maior concentração de ácido acético encontrada foi 15,32 mmol/L, no ensaios realizados com o lodo tratado termicamente. Porém, neste mesmo trabalho, a maior produção de  $H_2$  foi observada nos ensaios com o lodo tratado com ácido durante 6 h, no qual 54% do ácido acético foi consumido, provavelmente para a produção de  $H_2$ .

Como pode ser observado na Tabela 15, a concentração de ácido butírico não variou nos ensaios com o lodo controle e nos ensaios que sofreram o pré-tratamento por lavagem (pré-tratamento 7 e 8). No início do pré-tratamento 5 não foi detectado o ácido butírico, somente no final do teste em batelada em concentração de 9,76 mmol/L. As maiores concentrações de ácido butírico ocorreram ao final dos ensaios com lodos que sofreram os pré-tratamentos 4 e 6, térmico e térmico combinado com o ácido, 12,82 e 12,03 mmol/L, respectivamente. Estes resultados indicam que a fermentação tipo butírica foi mais favorecida nesses pré-tratamentos. As concentrações de ácido butírico detectadas neste trabalho se encontram na mesma ordem de grandeza das encontradas no trabalho de Jia et al. (2013), no qual 20,77 mmol/L de ácido butírico foi detectado no ensaio realizado com o lodo pré-tratado por secagem a 60 °C por 24 h (o pré-tratamento mais eficiente para produzir hidrogênio), ao final do ensaio em batelada. No tratamento 3 (térmico 80 °C/15 min) a concentração de ácido butírico diminuiu ao final do experimento, sugerindo que essa diminuição pode ser resultado da oxidação anaeróbica do ácido butírico para a formação de  $CO_2$  e  $H_2$ .

O ácido propiônico não foi observado nos ensaios com os lodos que sofreram os tratamentos 5, 6 e 7, (ácido pH 3/24 h e térmico 100 °C/30 min e lavagem TRH 12 h, respectivamente). Entretanto, nos ensaios realizados com os outros lodos as concentrações de ácido propiônico variaram entre 2,02 e 13,76 mmol/L, na mesma ordem de grandeza das relatadas por Assawamongkholdiri et al. (2013). Entretanto, Jia et al. (2013) encontraram concentrações de ácido propiônico muito mais baixas dos observados neste trabalho entre 0,08 e 1,76 mmol/L e produções de  $H_2$  mais elevadas.

De uma maneira geral pode-se concluir que a maioria dos pré-tratamentos do lodo aumentaram a produção de  $H_2$ , e que nestes, o ácido acético foi o metabólito predominante, seguido do ácido butírico. O

ácido láctico foi o metabólito predominante nos ensaios com as menores produções de  $H_2$ . Nem todos os pré-tratamentos tiveram influência positiva na cultura mista para a produção de hidrogênio. Os pré-tratamentos com lavagem seletiva em TRHs de 6 e 12 h causaram uma diminuição na capacidade de lodo em produzir  $H_2$ . Os diferentes pré-tratamentos resultaram em variações dos caminhos de fermentação a partir da glicose. Além disso, os resultados mostram que a diferença nos resultados entre os pré-tratamentos pode ser atribuída à diversidade da população microbiana existente no lodo. Portanto, foram realizadas análises das comunidades microbianas baseadas no DNA, cujos resultados serão apresentados nos itens seguintes.

#### 4.2.2 Análise das comunidades microbianas nos lodos pré-tratados

A Figura 11 apresenta o gel de DGGE das amostras do lodo controle e dos lodos pré-tratados. As diferentes bandas que aparecem no gel sugerem que a microbiota dos lodos foi modificada de forma diferente pelos diferentes pré-tratamentos. O gel de DGGE mostra, visualmente, as diferenças entre as amostras. Portanto, a diversidade bacteriana foi estimada pelo índice de Shannon, utilizado para comparar os diferentes perfis dos pré-tratamentos. O índice de diversidade (Shannon) combina dois atributos de uma comunidade biológica: o número de espécies e sua equitabilidade (o quão similar as espécies estão representadas na comunidade). Podemos usar o Índice de Shannon para dizer que a comunidade A é mais diversa do que a comunidade B, desde que se tenha uma comunidade comparativa, neste trabalho foi utilizado o lodo controle como comunidade comparativa. Baseado no gel de DGGE, o programa Past, obtém os valores de alfa-diversidade, pelo índice de Shannon e número de bandas de cada amostra. Na Figura 11 estão apresentadas as bandas encontradas nas amostras, no gel de DGGE do lodo controle (sem tratamento) e dos lodos pré-tratados. E na Figura 12 podem ser observados os índices de Shannon, calculados para as diferentes amostras dos lodos.

Figura 11: Gel de DGGE com as amostras dos lodos controle (sem tratamento) e dos lodos pré-tratados. As linhas correspondem a: c- controle, 1- trat. 1, 2- trat. 2, 3- trat. 3, 4- trat. 4, 5- trat. 5, 6 -trat. 6, 7- trat. 7 e 8- trat. 8. 1- Térmico 100°C/15 min; 2- Térmico 100 °C/15 min; 3- Térmico 80 °C/15 min; 4- Térmico 80 °C/30 min; 5-Ácido pH 3/24 h; 6- Ácido pH 3/24 h e Térmico 100 °C/30 min; 7-Lavagem TRH 12 h; 8-Lavagem TRH 6 h.

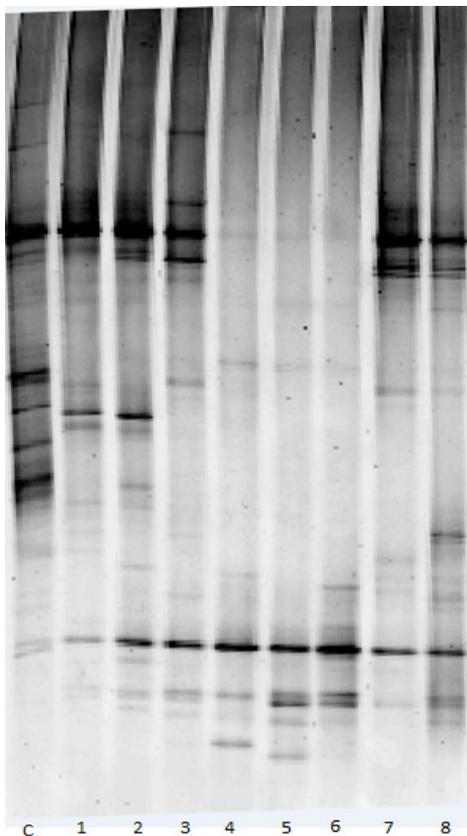
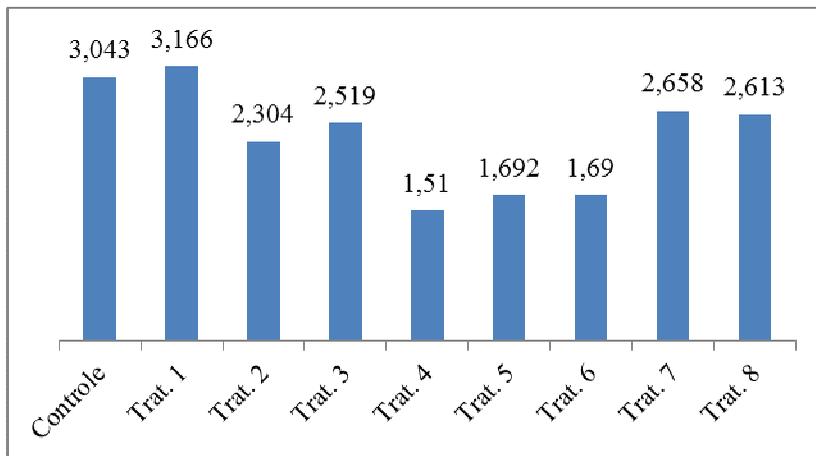


Figura 12: Valores de diversidade, indicados pelo índice de Shannon dos diferentes pré-tratamentos dos lodos. 1- Térmico 100°C/15 min; 2- Térmico 100 °C/15 min; 3- Térmico 80 °C/15 min; 4- Térmico 80 °C/30 min; 5-Ácido pH 3/24 h; 6- Ácido pH 3/24 h e Térmico 100 °C/30 min; 7-Lavagem TRH 12 h; 8- Lavagem TRH 6 h.



Comparando-se os índices de Shannon (diversidade) na Figura 12 das amostras controle (3,04) e do lodo que sofreu o pré-tratamento 1 (3,166) estes são muito próximos, significando que o perfil da comunidade é semelhante. Entretanto, sugere-se que essa pequena alteração justifica a diferente produção de  $H_2$  obtida por estes lodos, uma vez que o lodo que sofreu o tratamento 1 (100 °C por 15 min) teve uma velocidade de produção de  $H_2$ , 3 vezes maior do que a do controle (sem tratamento).

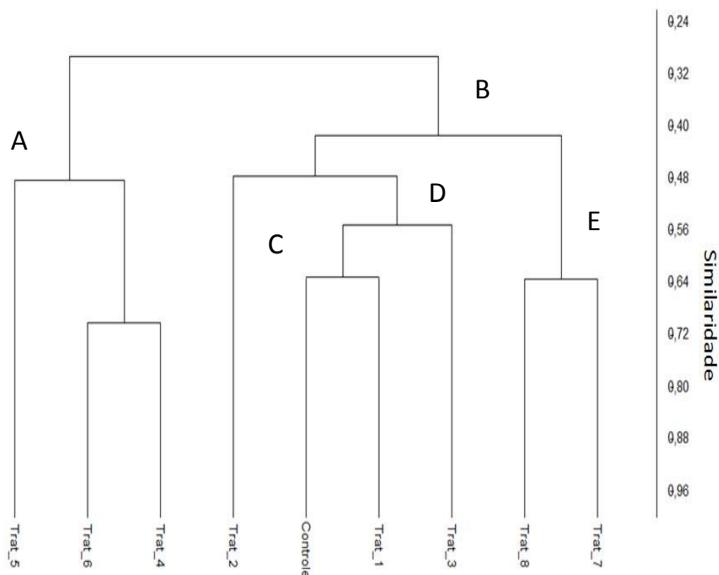
O índice de Shannon observado para a amostra de lodo do tratamento 2 (100 °C por 60 min) (2,304), comparado ao controle (3,04) e o lodo do tratamento 1 (3,166) foi menor, indicando uma redução na diversidade da comunidade bacteriana total. Em consequência, a comunidade de microrganismos produtores de  $H_2$  também foi reduzida, se comparada ao lodo do tratamento 1, uma vez que a produção de  $H_2$  do lodo do tratamento 2 que foi 71 mL e do tratamento 1 foi de 121 mL. Este resultado sugere que o tratamento 2 foi menos favorável à seleção de uma comunidade microbiana produtora de  $H_2$ . O tratamento 3 (80 °C por 15 min) foi o que produziu a maior quantidade de  $H_2$  (154 ml). Portanto, as condições de seleção favoreceram microrganismos

produtores de  $H_2$ . Comparando os índices de Shannon dos lodos submetidos aos tratamentos 3 e 4 (80 °C/30 min), de 2,519 e 1,52, respectivamente pode-se afirmar que houve uma redução bastante elevada na diversidade bacteriana, especialmente no lodo que sofreu o tratamento 4. Contudo, essa variação na composição do lodo não foi suficientemente importante, pois a diferença de produção de  $H_2$  foi pequena entre os lodos que sofreram os tratamentos 3 e 4, sendo iguais a 154 e 139 mL, respectivamente.

Os tratamentos 5 (pH 3/24 h) e 6 (pH 3/24h e 100 °C/30 min) também influenciaram na redução da diversidade microbiana em relação ao controle, pois os índices de Shannon são menores que o controle, 1,692 e 1,69, respectivamente. Comparando os lodos que sofreram os tratamentos 5 e 6, pode-se observar que o efeito do tratamento térmico combinado ao ácido, foi muito agressivo, pois além de reduzir a diversidade bacteriana total, influenciou na produção de  $H_2$ , que diminuiu de 117 para 72 mL de  $H_2$ .

Quando há várias comunidades sendo comparadas simultaneamente uma boa representação da diversidade microbiana pode ser obtida através das análises de agrupamento. A análise de agrupamento é obtida através de uma matriz, as duas amostras mais similares são combinadas para formar um grupo único, relacionando a estrutura da comunidade microbiana de cada amostra. Na Figura 13 está representado o dendograma dos lodos pré-tratados e do lodo controle mostrando a similaridade entre as amostras.

Figura 13: Dendrograma do DGGE mostrando a similaridade das amostras dos lodos controlee com tratamentos:1- Térmico 100°C/15 min; 2- Térmico 100 °C/15 min; 3- Térmico 80 °C/15 min; 4- Térmico 80 °C/30 min; 5-Ácido pH 3/24 h; 6- Ácido pH 3/24 h e Térmico 100 °C/30 min; 7-Lavagem TRH 12 h; 8- Lavagem TRH 6 h.



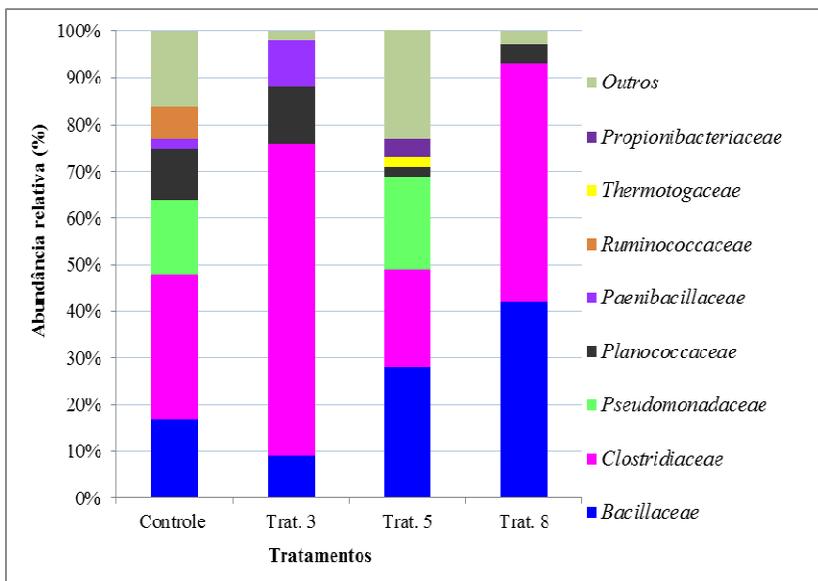
Como pode ser observado na Figura 13, se for feito um corte na altura de 0,32 de similaridade no dendrograma haverá dois grupos independentes, o grupo A e o grupo B (dois agrupamentos), mostrando que esse dois grupos são distintos entre si, ou seja, a diversidade microbiana dos pré-tratamentos do grupo A são muito diferentes dos pré-tratamentos que estão ligados no grupo B. O grupo A englobou menos pré-tratamentos, os tratamentos 4, 5 e 6 e mostra que o tratamento 4 e 6 são mais similares entre si, se fizermos um corte no nível de 0,5 de similaridade. Dentro do grupo B, dividiu-se em outros 3 grupos, se fizermos o corte a nível de 0,5 de similaridade, os grupos C, D e E. O grupo C engloba apenas um pré-tratamento, o tratamento 2, mostrando bastante diferença entre os outros grupos do grupo B.

Comparando os grupos D e E, no agrupamento D está o lodo controle (sem pré-tratamento) e que está ligado com as os lodos tratados 1, mostrando que o tratamento 1 não fez mudanças significantes na

comunidade microbiana do lodo. Já no grupo E os lodos pré-tratados com tratamento 7 e 8 mostraram-se muito semelhantes entre si e muito diferentes entre os outros, o que pode justificar a baixa produção de hidrogênio desses tratamentos. Esse dendograma mostrou que os lodos são distintos entre si, pois nenhum tem similaridade maior que 75%, indicando que os pré-tratamentos modificaram a comunidade microbiana de cada lodo de forma distinta. Como os diferentes pré-tratamentos produziram diferentes volumes de  $H_2$  foi necessário identificar os microrganismos presentes em algumas amostras.

A escolha das amostras a serem analisadas foi baseada na produção de hidrogênio. As amostras referentes aos lodos submetidos aos pré-tratamentos 3 e 5 foram sequenciadas, pois foram os tratamentos que promoveram maior aumento na produção de hidrogênio e foram acompanhados por 36 dias. O sequenciamento da amostra referente ao tratamento 8 foi realizado para comparar e diferenciar, pois este tratamento promoveu uma diminuição na produção de hidrogênio. Na Figura 14 mostra a classificação das sequências encontradas nas amostras dos lodos pré-tratados.

Figura 14: Classificação das sequências divididas por famílias com abundância relativa maior do que 1%, nas amostras dos lodos pré-tratados. 3- Térmico 80 °C/15 min; 5-Ácido pH 3/24 h; 8-Lavagem TRH 6 h.



Como se pode observar na Figura 14 o sequenciamento dos lodos pré-tratados confirmam que os pré-tratamentos causaram modificações na comunidade microbiana dos lodos. Os *Bacillaceae* é uma família de bactérias gram-positivas do filo firmicutes, os gêneros representativos incluem *Bacillus*, *Listeria* e *Staphylococcus*, foram encontrados no lodo controle (sem tratamento), tratamento 3, tratamento 5 e tratamento 8 numa percentagem de 10, 2, 24 e 39%, respectivamente. Comparando com a produção de hidrogênio de cada lodo, a presença dos *Bacillaceae* sugerem que esses microrganismos não contribuíram para produção de hidrogênio, competindo com as bactérias produtoras de hidrogênio. Principalmente no tratamento 8 que a produção de hidrogênio foi menor que o lodo sem tratamento (controle). Essa família foi encontrada em todas as amostras, no lodo controle de 17% no tratamento 3 de 9%, no tratamento 5 de 28% e no tratamento 8 de 42%. Segundo Chou et al. (2011), os *Bacillus sp.* melhoram o processo de produção de hidrogênio fermentativo quando são associados a outros microrganismos, além de ser obrigatoriamente ou facultativamente aeróbias podendo ser um consumidor de oxigênio nos biorreatores. Patel et al. (2014) e Zhang et al. (2014) relataram que *Bacillus* tem influência sinérgica na produção de hidrogênio e pode ser utilizado como estratégia para melhorar esse processo. Foram encontradas outras famílias de microrganismos pertencentes a ordem dos *Bacillales*, as *Planococcaceae* foram encontrados em todas as amostras, no controle (sem tratamento) 11% e no tratamento 3 10%, já no tratamento 5 e tratamento 8 apresentaram percentagem inferior a 5%. A *Paenibacillaceae* foi encontrada no tratamento 3 com 10% e no controle (sem tratamento) com 2%.

Os microrganismos da família *Propionibacteriaceae* são gram-positivas, não esporulantes, mesofílicas e aerotolerantes produtores de ácido propiônico, foram encontrados apenas no lodo tratado com ácido (tratamento 5), em 4%, uma percentagem baixa que provavelmente não atrapalhou a produção de hidrogênio. A família *Thermotogaceae* foi encontrada apenas no tratamento 5 é um microrganismo encontrado em altas temperaturas, mas também existem espécies encontradas em temperaturas mesofílicas. Devido a capacidade de se reproduzirem a altas temperaturas esses microrganismos são indicados para uso em processos industriais. Esse microrganismo utiliza carboidratos complexos para produzir hidrogênio sendo citado como uma possível fonte para produção de combustíveis fósseis (CONNERS et al., 2006). Os microrganismos da família foram encontrados somente

no controle (sem tratamento) em 7%, esse gênero pertence a ordem *Clostridiales* que são microrganismos indicados na literatura para produzir hidrogênio (KIM et al., 2012). Os microrganismos mais conhecido como produtores de hidrogênio são do gênero *Clostridium* (CHEN et al., 2012; LIU et al., 2012; ELSHARNOUBY et al., 2013; MOTTE et al., 2014), que pertencem a família *Clostridiaceae* que foi encontrada em todas as amostras, mas em quantidades altas nos tratamentos 3 (67%) e 8 (51%). No tratamento 3 esses microrganismos contribuíram com a produção de hidrogênio devido ao volume produzido no teste em batelada (154 mL). Já o tratamento 8 produziu 0,75 mL de hidrogênio supõe-se que as *Bacillaceae* encontrados na amostra em (42%) devem ter interferido na rota metabólica das bactérias produtoras de hidrogênio. No lodo controle (sem tratamento) e no tratamento 5 os microrganismos a família *Clostridiaceae* também foi encontrada, cerca de 31 e 21%, respectivamente. Esses microrganismos tem um crescimento ótimo a 60°C e tem ampla capacidade de fermentar vários substratos para produção de hidrogênio (O-Thong et al., 2009). Santos et al. (2014) concluíram que na comunidade microbiana do lodo utilizado houve alterações significantes e o *Clostridium sp.* e *Thermoanaerobacterium sp.* foram os microrganismo produtores de hidrogênio mais eficientes, em altas temperaturas. Ren et al. (2008) estudaram a produção de hidrogênio a partir de glicose, xilose e mistura de glicose/xilose a partir de um *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* W16, em batelada. Os autores encontraram pH e temperatura ideal para crescimento desses microrganismos 6,5 e 60 °C, respectivamente. A maior produção de hidrogênio encontrada foi como a glicose pura (substrato) de 2,42 mol de H<sub>2</sub>/mol de glicose

Já os microrganismos da família *Pseudomonadaceae* foram encontradoa em quantidades altas nos lodos (controle e tratamento 5) em 16 e 20%, respectivamente. Guo et al. (2008) relataram que efeito de três diferentes pré-tratamentos: micro-ondas, esterilização e ultrassom para produzir hidrogênio de resíduos utilizando *Pseudomonas sp.* como inóculo. Os autores observaram que a esterilização foi o melhor tratamento para produzir hidrogênio (15 mL/g CODt).

### 4.3 Estudo da relação $S_0/X_0$ com os lodos pré-tratados

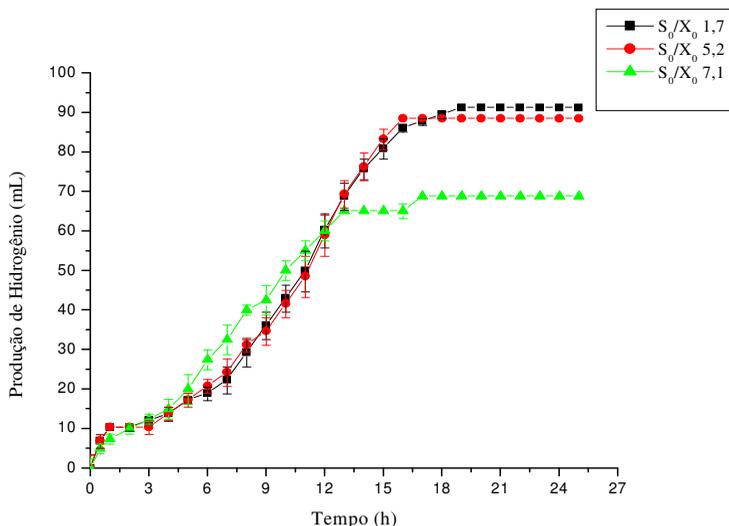
As análises moleculares apresentadas no item anterior revelaram que diferentes pré-tratamentos causaram modificações

distintas na microbiota estudada. Portanto, um novo estudo da relação entre a concentração inicial de substrato ou fonte de carbono ( $S_0$ ) e a concentração inicial de microrganismos ( $X_0$ ), conhecida como relação  $S_0/X_0$ , foi realizado. A partir dos resultados dos ensaios cinéticos de produção de  $H_2$  com os lodos pré-tratados, foram selecionados dois lodos pré-tratados que resultaram em elevadas velocidades de produção de  $H_2$  e uma composição biológica bastante diversa, comparativamente ao controle quais sejam: o lodo submetido ao tratamento 3 ( $80^\circ\text{C}/15\text{min}$ ) e o lodo do tratamento 5 (pH3/HCl). Com estes lodos foi realizado um estudo para encontrar a melhor relação  $S_0/X_0$  para produção de  $H_2$ . Foram estudadas as relações  $S_0/X_0$  de 1,7, 5,2 e 7,2 g glicose/ g SV nos ensaios realizados com os dois lodos.

#### 4.3.1 Estudo da relação $S_0/X_0$ usando o lodo do Tratamento 3 ( $80^\circ\text{C}$ por 15 min)

Foram realizados ensaios em batelada com meio de cultura contendo três diferentes concentrações de carbono (glicose) mantendo a concentração de SV do lodo tratado entre 1,34 e 1,53 g/L. As relações de  $S_0/X_0$  foram calculadas com base na concentração de glicose e de SV no início dos ensaios e os resultados estão apresentados na Tabela 17. Na Figura 17 estão apresentados os volumes de  $H_2$  produzido nos ensaios pelo lodo pré-tratado a  $80^\circ\text{C}$  por 15 min, em ensaios em batelada com as diferentes relações  $S_0/X_0$ .

Figura 15: Volume de hidrogênio acumulado em função do tempo pelo lodo pré-tratado a 80 °C por 15 min, nas relações  $S_0/X_0$  1,7 , 5,2 e 7,1 g glicose/g SV.



Como pode ser observado na Figura 15, os volumes de  $H_2$  produzidos nos ensaios com as menores relações  $S_0/X_0$ , 1,7 e 5,2 g glicose/g SV foram similares (92 e 89 mL, respectivamente) e mais elevados do que na relação de 7,1 g glicose/g SV (70 mL de  $H_2$ ).

Na Tabela 16 estão apresentados os valores de glicose, pHs e SV no início e final do experimento, mol de glicose consumida, mol de hidrogênio produzido, rendimento e eficiência dos ensaios realizados com diferentes relações  $S_0/X_0$ , utilizando o lodo tratado termicamente (80 °C por 15 min).

Tabela 16: Valores de glicose, conversão, eficiência, pH e concentração de SV dos ensaios em batelada do início e final, com as diferentes relações  $S_0/X_0$ , para o lodo tratado termicamente (80 °C por 15 min).

$*S_0/X_0$	1,7	5,2	7,1
Glicose inicial (mmol)	6,69	19,3	29,9
Glicose final (mmol)	3,75	14,3	17,4
Glicose consumida (mmol)	2,94	5,0	12,5
H <sub>2</sub> produzido (mmol)	3,22	3,12	2,42
Y (mmol de H <sub>2</sub> /mmol de glicose consumida)	1,09	0,62	0,19
Eficiência (%) <sup>a</sup>	28	15,5	4,75
SV <sub>i</sub> (g/L)	1,45±0,055	1,34±0,005	1,53±0,005
SV <sub>f</sub> (g/L)	1,34±0,035	1,39±0,015	1,52±0,15
pH <sub>i</sub>	6±0,005	6,01±0,005	6,01±0,05
pH <sub>f</sub>	4,75±0,001	4,76±0,045	4,65±0,015

\*A relação  $S_0/X_0$  foi calculada com base nas concentrações de glicose em g/L (não apresentadas na tabela acima), considerando que 1 mmol de glicose tem 180 mg e o volume do biorreator de 0,5 L, em g glicose/g SV.

O consumo de glicose nos ensaios com as diferentes relações  $S_0/X_0$  aumentaram com o aumento da relação  $S_0/X_0$ . Na relação de 1,7 g glicose/g SV foi observado o menor consumo de glicose (2,94 mmol), mas com a maior conversão em H<sub>2</sub> (Y), 1,09 mmol de H<sub>2</sub>/mmol de glicose consumida. Nos ensaios com a relação  $S_0/X_0$  de 5,2 g glicose/g SV foi consumido 5,0 mmol de glicose. Já na maior relação  $S_0/X_0$  estudada, 7,1, foi observado o consumo mais elevado de glicose de 12,5 mmol, embora neste ensaio tenha sido observado a menor conversão do

substrato em  $H_2$ , 0,19 mmol de  $H_2$ /mmol de glicose<sub>consumida</sub> e, conseqüentemente, a menor eficiência, apenas 4,75%. O pH inicial e final nos ensaios realizados com as diferentes relações  $S_0/X_0$ , depois de 24 horas variaram de forma bastante semelhante (Tabela 16). Os pHs iniciais variaram entre 6,01 e 5,99 e os finais entre 4,65 e 4,76. Evidenciando que as diferenças encontradas nos rendimentos de produção de  $H_2$  não podem ser atribuída as diferenças de pHs.

Portanto, estes ensaios revelaram que o rendimento, ou fator de conversão (mmol de  $H_2$ /mmol de glicose consumida) aumentou para 1,09 no ensaio com  $S_0/X_0$  de 1,7 g glicose/g SV, comprovando a importância, não apenas do pré-tratamento do lodo, mas também de se trabalhar na melhor condição, neste caso de concentração de substrato, para a produção de  $H_2$ . Desta forma, a relação  $S_0/X_0$  mais apropriada para a produção de  $H_2$  pelo lodo pré-tratado a 80 °C por 15 min foi de 1,7 g glicose/g SV.

As velocidades de produção de  $H_2$  foram estimadas a partir das inclinações das tangentes das respectivas curvas de volume de  $H_2$  para as diferentes relações  $S_0/X_0$ , apresentadas na figura anterior. Considerando que há uma variação na inclinação das tangentes em determinados períodos de tempo, calculou-se as velocidades ( $r_{H_2}$ ) e velocidades específicas ( $\mu_{H_2}$ ) para cada relação  $S_0/X_0$  em diferentes períodos de tempo. Na Tabela 17 estão apresentados os parâmetros cinéticos obtidos para as diferentes relações  $S_0/X_0$  estudadas com o lodo tratado termicamente.

Tabela 17: Parâmetros cinéticos para a produção de  $H_2$  nos ensaios em batelada, com as diferentes relações  $S_0/X_0$ , com lodo tratado termicamente (80 °C por 15 min).

$S_0/X_0$ (g glicose/g SV)	1,7	5,2	7,1
V (mL)	92	89	70
$r_{H_2}$ (mL/h)	7,61	7,55	5,61
$\mu_{H_2}$ (mL/gSV.h)	5,51	5,59	4,15
$R^2$	0,9962	0,9904	0,9964

V: quantidade máxima de  $H_2$  (mL);  $r_{H_2}$ : velocidade máxima de produção de  $H_2$  (mL/h);  $\mu_{H_2}$ : velocidade específica de produção de hidrogênio (mL/gSV.h).  $S_0/X_0$  1,7: intervalo 7-15h;  $S_0/X_0$  5,2: intervalo 7-16h;  $S_0/X_0$  7,1: intervalo 4-

13h.  $R^2$  se refere ao ajuste linear dos dados para a determinação de  $r_{H_2}$  nos intervalos mencionados.

Como pode ser observado na Tabela 17, os valores de volume acumulado de  $H_2$  (V), das velocidades de produção de  $H_2$  ( $r_{H_2}$ ) e das velocidades de produção de  $H_2$  específicas ( $\mu_{H_2}$ ) foram bastante semelhantes para os ensaios realizados com as relações  $S_0/X_0$  1,7 e 5,2 g glicose/g SV. Já no ensaio realizado com a relação 7,1 g glicose/g SV, todos os parâmetros cinéticos diminuíram, comparando-se com os ensaios realizados com as relações 1,7 e 5,2 g glicose/g SV.

Na Tabela 18 estão apresentadas as concentrações dos ácidos orgânicos (mmol/L) no início (0 h) e ao final (24 h) dos ensaios em batelada para a produção de  $H_2$  com as diferentes relações  $S_0/X_0$ . O etanol não foi detectado nos experimentos realizados com os lodos pré-tratados, pela análise no CLAE, por isto não são apresentados na tabela.

Tabela 18: Concentração dos ácidos orgânicos (g/L) no início (0 h) e ao final (24 h) dos ensaios em batelada para a produção de  $H_2$  com as diferentes relações  $S_0/X_0$ , com o lodo tratado termicamente (80 °C por 15 min).

$S_0/X_0$ (g glicose/g SV)	Ác. Lático (mmol/L)		Ác. Acético (mmol/L)		Ác. Propiônico (mmol/L)		Ác. Butírico (mmol/L)	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
1,7	16,64±0,2	25,74±0,5	1,99±0,2	14,98±0,1	5,39±0,1	10,79±0,1	5,56±0,1	11,80±0,2
Varição	9,1		12,99		5,4		6,24	
5,2	17,31±0,2	33,29±0,2	1,83±0,2	15,98±0,1	5,39±0,1	10,12±0,2	5,64±0,2	3,97±0,2
Varição	15,98		14,15		4,73		-1,7	
7,1	19,97±0,3	35,50±0,2	1,99±0,1	11,32±0,1	4,99±0,2	8,63±0,2	5,33±0,1	14,07±0,1
Varição	15,53		9,33		3,64		8,74	

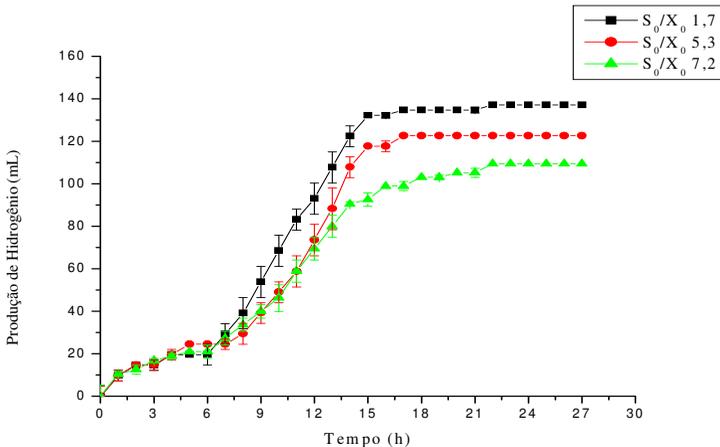
Segundo os dados apresentados na Tabela 18, as concentrações de ácido acético, principal metabólito da produção de  $H_2$ , aumentou em todos os ensaios. Porém, nos ensaios com as relações  $S_0/X_0$  1,7 e 5,2 g glicose/g SV a produção de ácido acético foi mais expressiva, 12,98 e 14,15 mmol/L, respectivamente. Na Tabela 18 também pode ser observado que a concentração de ácido lático mais elevada ocorreu nos experimentos com maiores  $S_0/X_0$ , 5,2 e 7,1 g glicose/g SV que foi de 15,98 e 15,53 mmol/L, respectivamente. A

menor concentração de ácido lático foi observada no ensaio com a maior produção de  $H_2$  ( $S_0/X_0$  1,7 g glicose/g SV). A concentração de ácido propiônico aumentou em 5,40, 4,73 e 3,64 mmol/L nos ensaios realizados com as relações  $S_0/X_0$  1,7, 5,2 e 7,1 g glicose/g SV, respectivamente. A concentração de ácido butírico não pôde ser relacionada à produção de  $H_2$ , uma vez que na relação  $S_0/X_0$  7,1 g glicose/g SV apresentou menor produção de  $H_2$ , mas foi observada a maior produção de ácido butírico (8,74 mmol/L).

#### 4.3.2 Estudo da relação $S_0/X_0$ usando o lodo do Tratamento 5 com ácido (pH3/HCl)

Foram realizados ensaios em batelada com o lodo submetido ao tratamento ácido com meio de cultura contendo três diferentes concentrações de carbono (glicose), mantendo-se a concentração de SV entre de 1,3 a 1,5 g/L. As relações de  $S_0/X_0$  foram calculadas com base na glicose e de SV no início dos ensaios e os resultados estão apresentados na Tabela 20. Na Figura 16 estão apresentados os volumes de  $H_2$  produzido em função do tempo pelo lodo pré-tratado com ácido (pH3/HCl) em diferentes relações  $S_0/X_0$ .

Figura 16: Volumede hidrogênio acumulado em função do tempo pelo lodo pré-tratado com ácido (pH3/HCl) nas relações  $S_0/X_0$  1,7, 5,3 e 7,2 g glicose/g SV.



Como pode ser observado na Figura 16 o ensaio com a relação  $S_0/X_0$  de 1,7 g glicose/g SV foi a que apresentou maior produção de hidrogênio, de 138 mL. Nos ensaios com as relações  $S_0/X_0$  de 5,3 e 7,2 g glicose/g SV foi produzido 123 e 110 mL de  $H_2$ , respectivamente. Na Tabela 20 estão apresentados os valores de glicose, pHs e SV no início e fim do experimento, mmol de glicose consumida, mmol de hidrogênio produzido, fator de conversão e eficiência nas diferentes relações  $S_0/X_0$ , com lodo tratado com ácido (pH3/HCl).

Tabela 19: Valores de glicose, hidrogênio, fator de conversão, eficiência, pH e concentração de SV dos ensaios em batelada do início e final, com as diferentes relações  $S_0/X_0$ , com lodo tratado com ácido (pH3/HCl).

<b>*<math>S_0/X_0</math> (g glicose/g SV)</b>	<b>1,7</b>	<b>5,3</b>	<b>7,2</b>
Glicose <sub>inicial</sub> (mmol)	7,11	19,3	30
Glicose <sub>final</sub> (mmol)	3,47	15,1	12,6
Glicose <sub>consumida</sub> (mmol)	3,64	4,2	17,4
$H_2$ produzido (mmol)	4,81	4,32	3,85
Y (mmol de $H_2$ /mmol de glicose consumida)	1,32	1,02	0,22
Eficiência (%)	33	26	5,5
SV <sub>i</sub>	1,45±0,05	1,3±0,01	1,5±0,01
SV <sub>f</sub>	1,42±0,01	1,3±0,02	1,5±0,01
pH <sub>i</sub>	6±0,05	6,01±0,05	6,01±0,01
pH <sub>f</sub>	4,71±0,01	4,66±0,05	4,63±0,04

\*A relação  $S_0/X_0$  foi calculada com base nas concentrações de glicose em g/L (não apresentadas na tabela acima), considerando que 1 mmol de glicose tem 180 mg e o volume do biorreatores de 0,5 L, em g glicose/g SV.

O consumo de glicose nos ensaios com as diferentes relações  $S_0/X_0$  foram diferentes uma vez que no ensaio realizado com a relação  $S_0/X_0$  1,7 g glicose/g SV foi observado o menor consumo de glicose e a maior conversão em  $H_2$  de 3,64 mmol e 1,32 mmol de  $H_2$ /mmol de glicose consumida, respectivamente. O aumento da concentração de glicose no meio resultou numa diminuição da conversão de glicose em  $H_2$ , pois nas relações  $S_0/X_0$  de 5,3 e 7,2 g glicose/g SV, os valores de conversão de substrato em produto diminuíram para 1,02 e 0,22 mmol de  $H_2$ /mmol de glicose consumida, respectivamente, indicando que a glicose está sendo consumida em outros processos bioquímicos e não para a produção de  $H_2$ .

Os resultados apresentados na Tabela 19 mostram que o pH inicial e final das diferentes relações  $S_0/X_0$ , depois de 24 horas de ensaio, variaram de maneira semelhante. Os pHs iniciais ficaram em 6,0 e os finais entre 4,63 e 4,74, evidenciando que as diferenças encontradas nos rendimentos de produção de  $H_2$  não podem ser atribuídas as diferenças de pHs.

As velocidades de produção de  $H_2$  foram determinadas a partir dos valores de inclinação das tangentes das respectivas curvas de concentração para as diferentes relações  $S_0/X_0$ , apresentadas na figura anterior. Considerando que há uma variação na inclinação das tangentes em determinados períodos de tempo, calculou-se as velocidades ( $r_{H_2}$ ) e velocidades específicas ( $\mu_{H_2}$ ) para cada relação  $S_0/X_0$ . Na tabela 20 estão apresentados os parâmetros cinéticos das diferentes relações  $S_0/X_0$  estudadas com o lodo tratado com ácido.

Tabela 20: Parâmetros cinéticos para a produção de  $H_2$  nos ensaios em batelada, com as diferentes relações  $S_0/X_0$ , com lodo tratado com ácido (pH3/HCl).

$S_0/X_0$ (g glicose/g SV)	1,7	5,3	7,2
V(mL)	138	123	110
$r_{H_2}$ (mL/h)	12,98	13,03	10,42
$\mu_{H_2}$ (mL/gSV.h)	9,27	9,87	7,72
$R^2$	0,9976	0,9871	0,9955

V: volume acumulado de  $H_2$  (mL);  $r_{H_2}$ : velocidade máxima de produção de  $H_2$  (mL/h);  $\mu_{H_2}$ : velocidade específica de produção de hidrogênio (mL/h.gSV).  $S_0/X_0$  1,7: intervalo 6-15h;  $S_0/X_0$  5,3: intervalo 8-15h;  $S_0/X_0$  7,2: intervalo 9-14h.  $R^2$  se refere ao ajuste linear dos dados para a determinação de  $r_{H_2}$  nos intervalos mencionados.

Como pode ser observado na Tabela 20, valores bastante semelhantes do volume acumulado de  $H_2$  (V), de velocidades de produção de  $H_2$  ( $r_{H_2}$ ) e de velocidades de produção de  $H_2$  específica ( $\mu_{H_2}$ ) foram encontrados para os ensaios realizados com as relações  $S_0/X_0$  1,7 e 5,3 g glicose/g SV. Já no ensaio realizado com a relação 7,2 g glicose/g SV todos os parâmetros cinéticos diminuíram, comparando-se com os ensaios utilizando as relações 1,7 e 5,3 g glicose/g SV. Na Tabela 21 estão apresentadas as concentrações dos ácidos orgânicos no início (0 h) e ao final (24 h) dos ensaios em batelada para a produção de  $H_2$  com as diferentes relações  $S_0/X_0$ .

Tabela 21: Concentração dos ácidos orgânicos no início (0 h) e ao final (24 h) dos ensaios em batelada para a produção de  $H_2$  com as diferentes relações  $S_0/X_0$ , com lodo tratado com ácido (pH3/HCl).

$S_0/X_0$ (g glicose/g SV)	Ác. Lático (mmol/L)		Ác. Acético (mmol/L)		Ác. Propiônico (mmol/L)		Ác. Butírico (mmol/L)	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
1,7	19,97±0,3	15,53±0,3	-	16,65±0,2	-	-	1,92±0,1	44,6±0,3
Varição	-4,44		16,65		-		42,68	
5,3	21,86±0,2	21,19±0,5	8,99±0,2	29,3±0,1	-	-	1,36±0,1	23,83±0,1
Varição	-0,67		20,31		-		22,47	
7,2	18,97±0,3	19,08±0,5	9,32±0,4	25,31±0,5	-	-	1,36±0,2	23,15±0,2
Varição	0,11		15,99		-		21,79	

(-) não detectado

Na Tabela 21 pode-se observar a diferença entre a concentração dos ácidos orgânicos no início e no final dos experimentos realizados com o lodo pré-tratado por ácido. Em todos os experimentos, realizados com diferentes relações  $S_0/X_0$ , foi observado um aumento similar na concentração de ácido acético que variou entre 15,99 e 20,31 mmol/L. O ácido propiônico e o etanol não foram detectados nos ensaios com o lodo pré-tratado com ácido nas relações  $S_0/X_0$  estudadas. Na relação  $S_0/X_0$  de 1,7 g glicose/g SV foi produzido 42,68mmol/L de ácido butírico. Nas demais relações  $S_0/X_0$  estudadas o ácido butírico foi detectado em menor concentração, cerca de 22 mmol/L.

Nos ensaios que apresentaram as maiores produções de  $H_2$ , nas relações  $S_0/X_0$  1,7 e 5,3 g glicose/g SV foi observada uma diminuição (consumo) na concentração de ácido láctico de 4,44 e 0,67

mmol/L, respectivamente (Tabela 21). Comparando-se estes resultados com o lodo tratado termicamente (Tabela 18), a diminuição da concentração de ácido láctico nos ensaios realizados com o lodo tratado com ácido, parece ter sido a maior diferença entre os metabólitos solúveis analisados nestes ensaios. Como foi mencionado anteriormente, o aparecimento do ácido láctico, normalmente está relacionado à diminuição da produção de  $H_2$ , uma vez que ambos competem por equivalentes redutores para a sua formação (SINHA; PANDEY, 2011).

Comparando-se o estudo de  $S_0/X_0$  realizado para o lodo sem pré-tratamento (item 5.1) com o estudo de  $S_0/X_0$  para os lodos pré-tratados, pode-se afirmar que a relação  $S_0/X_0$  mais favorável à produção de  $H_2$  diminuiu quando os lodos pré-tratados foram utilizados como inóculo. Para o lodo sem pré-tratamento a relação  $S_0/X_0$  de 5,3 g glicose/g SV promoveu a maior produção de  $H_2$ , enquanto que para os lodos pré-tratados esta relação foi de 1,7 g glicose/g SV.

Esta mudança na condição ótima de  $S_0/X_0$  para a produção de  $H_2$ , do lodo original para o lodo pré-tratado, certamente está relacionada com a alteração promovida pelos pré-tratamentos na comunidade microbiana do lodo.

O estudo de diferentes relações  $S_0/X_0$  com o lodo tratado termicamente (80 °C por 15 min) e o tratado com ácido (pH3/HCl) revelou que as relações  $S_0/X_0$  mais baixas foram mais apropriadas para a produção de  $H_2$ . Portanto, a relação  $S_0/X_0$  em torno de 1,7 g glicose/g SV foi utilizada na operação de biorreatores inoculados com os lodos pré-tratados por um longo período.

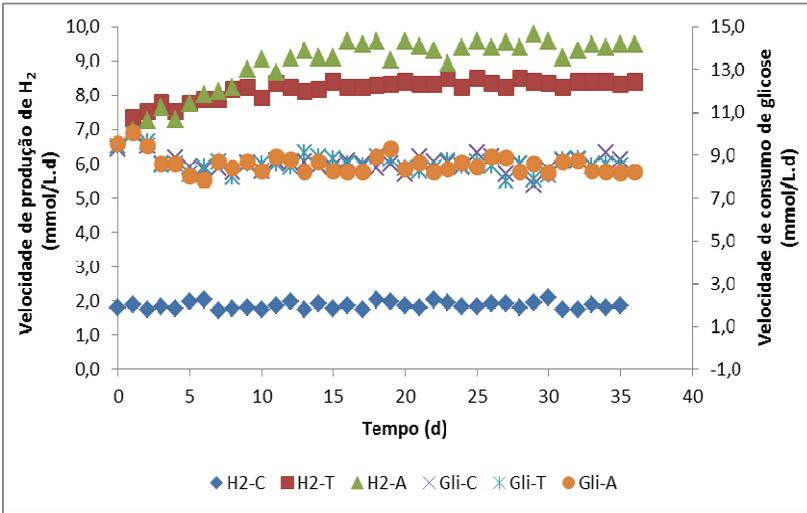
#### **4.4 Acompanhamento de biorreatores em batelada sequenciais repetidas inoculados com os lodos pré-tratados**

Os pré-tratamentos, o térmico a 80 °C por 15 min e o ácido pH 3 por 24 h foram considerados os mais apropriados para o enriquecimento do lodo proveniente de um sistema de tratamento de vinhaça em bactérias produtoras de  $H_2$ . Portanto, os lodos que sofreram estes pré-tratamentos foram utilizados como inóculo de biorreatores operados em batelada sequenciais por um período de 36 dias. O intuito deste estudo foi verificar se o aumento da produção de  $H_2$  promovido pelos pré-tratamentos aplicados aos lodos se mantém em ensaios de longo prazo. Segundo Luo et al. (2010<sup>b</sup>), o aumento na produção de  $H_2$ , promovido pelo pré-tratamento de culturas mistas e observado em testes em batelada, pode não se manter por longos períodos. Por isto, os

desempenhos dos biorreatores inoculados com os lodos pré-tratados foram comparados com um biorreatores controle, inoculado com o lodo sem pré-tratamento.

Os biorreatores foram inoculados com os lodos com concentração inicial de SV entre 2,38 e 2,50 g/L. A alimentação foi realizada com meio de cultura contendo, aproximadamente, 27,8 mmol/L (5 g/L) de glicose e mantidos a temperatura de 50 °C. As relações de  $S_0/X_0$  no acompanhamento dos biorreatores de 36 dias permaneceram em torno de 2. pois não houve um crescimento expressivo da biomassa celular neste período. Isto foi constatado pela análise de sólidos voláteis ao final do período de 36 dias, pois a concentração de SV nos biorreatores inoculados com o lodo controle, o térmico e o ácido eram de 2,51, 2,50 e 2,57, respectivamente, praticamente a mesmo do início da operação dos reatores (tabela 23). Provavelmente, a retirada diária do sobrenadante para a alimentação dos biorreatores promovia uma retirada de células e portanto não foi possível identificar o crescimento da biomassa nos reatores. A Figura 17 apresenta as velocidades de produção de  $H_2$  e consumo de glicose nos biorreatores no período de 36 dias, inoculados com o lodo sem tratamento (controle), o tratado termicamente (80 °C por 15 min) e o tratado com ácido (pH3/HCl).

Figura 17: Velocidades de produção de hidrogênio e de consumo de glicose nos biorreatores inoculados com os lodos pré-tratados por ácido (A), térmico (T) e sem pré-tratamento (controle -C), durante o período de 36 dias.



Como pode ser observado na Figura 17 as velocidades tanto de produção de H<sub>2</sub>, quanto de consumo de substrato se estabilizaram nos primeiros 10 dias de operação dos reatores. As velocidades de consumo de substrato (glicose) foram muito similares nos 3 reatores inoculados com os diferentes lodos: no controle, no que sofreu tratamento térmico e no ácido e permaneceram em média cerca de 8,5 mmol/L.d. Entretanto, as velocidades de formação de H<sub>2</sub> foram muito diferentes entre os lodos que sofreram os pré-tratamentos e o lodo controle. As velocidades de formação de H<sub>2</sub> foram em média de 8,2 e 9,0 mmol/L.d nos reatores inoculados com os lodos pré-tratados termicamente (H<sub>2</sub>-T) e ácido (H<sub>2</sub>-A), respectivamente, enquanto que para o lodo controle esta velocidade foi em média de 1,85 mmol/L.d (H<sub>2</sub>-C). Estes resultados evidenciaram a importância dos pré-tratamentos dos lodos para a produção de H<sub>2</sub>.

Com base nestes resultados foi possível calcular os fatores de conversão (média de todo o período) para os lodos controle e pré-tratados por calor e ácido, os quais foram 0,22, 0,95 e 1,05 mmolH<sub>2</sub>/mmol de glicose<sub>consumida</sub>, respectivamente.

Sob condições similares as deste trabalho, ou seja, utilizando glicose como substrato, cultura mista de microorganismos e condições termofílicas, são relatados valores de conversão entre 1,19 e 2,15 mmolH<sub>2</sub>/mmol de glicose<sub>consumida</sub> por Yin et al., (2014), 0,9 mmolH<sub>2</sub>/mmol de glicose<sub>consumida</sub> por Kan (2013) e 2,19 mmolH<sub>2</sub>/mmol de glicose<sub>consumida</sub> por Sá et al.(2013). Os maiores valores de conversão são descritos para culturas puras termofílicas, onde são atingidos valores próximos ao teórico de 4 mmol H<sub>2</sub>/ mmol de glicose<sub>consumida</sub> (DING et al., 2009). Considerando que o valor teórico e máximo seria a formação de 4 mol de H<sub>2</sub> por mol de glicose consumida, a cultura mista tratada por ácido e pelo calor, neste trabalho, atingiram 26,25 e 23,75% deste valor. Estes valores parecem baixos se comparados aos da literatura anteriormente citados, mas são bastante elevados se comparados ao lodo controle (sem pré-tratamento), no qual a eficiência da conversão foi apenas de 5,5 %.

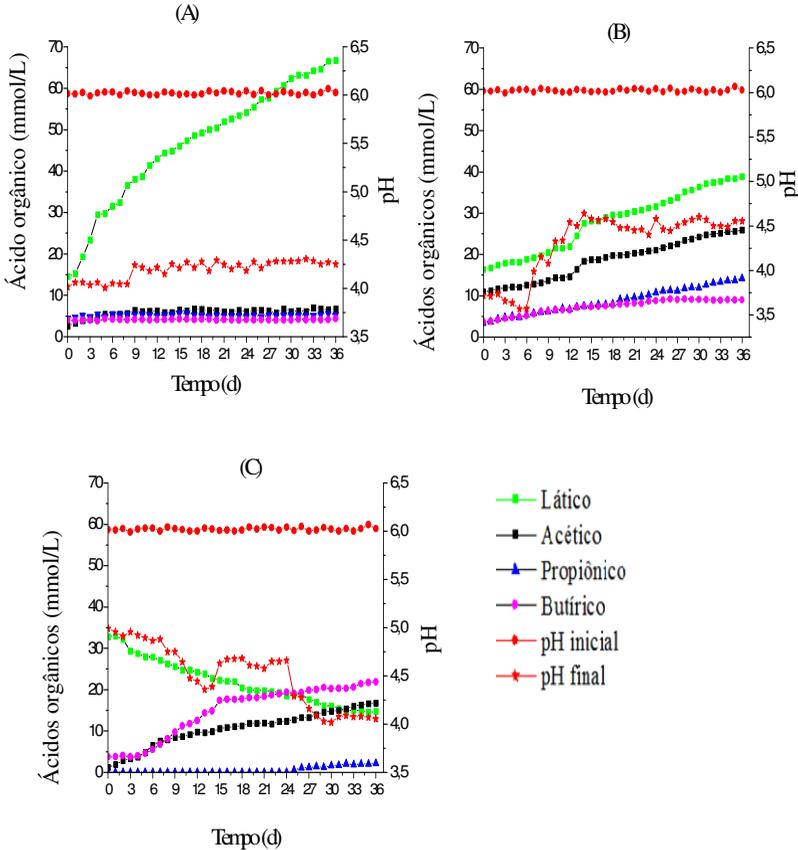
Nos ensaios realizados anteriormente em batelada, com as relações S<sub>0</sub>/X<sub>0</sub> de 1,7 dos lodos submetidos aos tratamentos térmico e ácido, foram atingidos valores de conversão de 1,0 e 1,14 mmol H<sub>2</sub>/mmol de glicose<sub>consumida</sub>, respectivamente. Estes valores foram bastante semelhantes aos observados no ensaio de longo prazo. Apesar do longo período de acompanhamento dos biorreatores, a carga do substrato (glicose) foi mantida constante, o que pode ter limitado o crescimento de microrganismos produtores de H<sub>2</sub> no ensaio de longo prazo, sem possibilitar o aumento do fator de conversão.

A Figura 21 mostra os valores de pH e as concentrações dos ácidos orgânicos na entrada e na saída dos biorreatores inoculados com o lodo sem tratamento (controle), tratado termicamente e o tratado com ácido, durante os 36 dias de acompanhamento dos biorreatores.

#### 4.4.1 Concentrações dos ácidos orgânicos e pHs nos biorreatores

As concentrações dos ácidos orgânicos (lático, acético, propiônico e butírico) ao longo do período de operação dos biorreatores estão apresentadas nas Figuras 18: A - média dos biorreatores inoculados com o lodo sem pré-tratamento - controle, B-média dos biorreatores inoculados com o lodo submetido ao tratamento térmico, e C média dos-biorreatores inoculados com o lodo submetido ao tratamento ácido. O etanol não foi detectado durante os 36 dias de monitoramento em nenhum dos biorreatores.

Figura 18: Concentração dos ácidos orgânicos (mmol/L) nos biorreatores pelo período de 36 dias. A) inoculado com o lodo sem tratamento (controle); B) inoculado com o lodo tratado termicamente e C) inoculado com o lodo tratado com ácido.



Conforme os resultados apresentados na Figura 18, de uma maneira geral, percebe-se que a maior diferença entre os metabólitos solúveis avaliados nos biorreatores reside na concentração do ácido láctico. Enquanto a sua concentração aumentou nos biorreatores controle e no biorreator inoculado com o lodo termicamente tratado, no biorreator com o lodo tratado por ácido, a concentração de ácido láctico diminuiu ao longo do período de acompanhamento.

O ácido láctico foi o ácido detectado em maior concentração no biorreator com o lodo controle. A concentração inicial de ácido láctico foi de 21,75 mmol/L ou seja, 1,96 g/L, e ao final do experimento a sua concentração alcançou 100,11 mmol/L (9,02 g/L). Como consequência do aumento da concentração de ácido láctico a produção de hidrogênio pode ter sido inibida e/ou diminuída, uma vez que neste biorreator foi observada a menor produção de H<sub>2</sub>, 1,85 mmol/L.d (Figura 17 ). Já as concentrações dos demais ácidos orgânicos analisados no biorreator controle, o acético, o propiônico e o butírico, permaneceram mais baixas durante os 36 dias de operação. A concentração de ácido acético aumentou de 3,83 mmol/L (0,23 g/L) para 10,07 mmol/L (0,61 g/L) ao final do período, mas, o ácido propiônico e butírico variaram pouco durante o experimento, o propiônico aumentou de 6,54 mmol/L (0,48 g/L) para 7,83 mmol/L (0,58 g/L) e o butírico permaneceu praticamente constante em torno de 6,0 mmol/L.

A Figura 18 (B) apresenta as concentrações dos ácidos orgânicos no biorreatores inoculados com o lodo tratado termicamente (80 °C/15min), na qual se pode observar que a concentração inicial de ácido láctico (Figura 18 A), também é elevada, 24,47 mmol/L. A concentração de ácido láctico neste biorreator aumenta para 58,21 mmol/L (5,24 g/L) ao final dos 36 dias. Apesar deste aumento na concentração de ácido láctico, a produção de H<sub>2</sub> neste biorreator se manteve elevada e constante, por volta de 8 mmol/L.d(Figura 19). O ácido acético, principal metabólito da produção de H<sub>2</sub> por fermentação, aumentou de 3,83 mmol/L (0,23 g/L) no início do experimento para 25,89 mmol/L (1,55 g/L) no 36<sup>o</sup> dia. A concentração de ácido propiônico variou de 4,92 mmol/L (0,36 g/L) no início do ensaio para 21,18 mmol/L (1,51 g/L) no final. Ao contrário do observado no controle, neste biorreator foi observado um aumento da concentração de ácido butírico de 5,5 mmol/L (0,48 g/L) para 13,45 mmol/L (1,18 g/L) ao final do período.

Na Figura 18 (C) pode ser observada a evolução da concentração dos ácidos orgânicos durante o período de 36 dias de operação dos biorreatores inoculados com o lodo pré-tratado com ácido. Como pode ser observado nesta figura a concentração de ácido láctico diminuiu durante os 36 dias de experimento, ou seja, houve um consumo de ácido láctico pela cultura mista destes biorreatores, ao contrário do observado nos reatores controle e térmico. A elevada concentração de ácido láctico inicial de 49,61 mmol/L (4,47 g/L) diminuiu para 22,31 mmol/L (2,01 g/L) ao final do período. Neste mesmo biorreator, a concentração de ácido acético aumentou de 1,83

mmol/L (0,11 g/L) no início do experimento para 25,22 mmol/L (1,51 g/L), ou seja, uma diferença de 23,39 mmol/L (1,4 g/L) de ácido acético durante os 36 dias de monitoramento dos biorreatores. O ácido propiônico não foi detectado no início do experimento, apenas nos últimos 10 dias de operação. Ao final do período a sua concentração foi de 2,15 mmol/L (0,24 g/L). A concentração de ácido butírico também teve um aumento expressivo comparado aos outros biorreatores, aumentou de 5,67 mmol/L (0,5 g/L) para 21,88 mmol/L (2,89 g/L) ao final do período.

A presença de ácido lático em processos de produção de  $H_2$  não é incomum, mas o que leva a sua formação ainda é motivo de investigação. Van Niel et al. (2002) estudaram a cinética de produção de  $H_2$  pela bactéria termofílica *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* utilizando sacarose como substrato. Os autores relataram que concentrações acima de 5 a 10 mmol/L de  $H_2$  no *headspace* dos biorreatores promoveram uma mudança na via metabólica da bactéria com a formação de ácido lático. Lian et al. (2014) relataram que a 50 °C a produção de ácido lático diminui, enquanto a 35 °C é a temperatura ótima para produção de ácido lático. Os autores utilizaram casca de batata e cultura mista nos biorretores com o objetivo de produzir ácido lático como coproduto de indústria de alimentos.

Chaganti et al. (2012) estudaram diferentes pré-tratamentos: choque térmico, químico (com ácido) e ácido lático (adicionando ácido lático nos biorreatores). O melhor pré-tratamento foi a adição de 2 g/L (22,3 mmol/L) de ácido lático nos biorreatores, produzindo 3,4 mol de  $H_2$ / mol de glicose. Os autores também relataram que em concentrações mais elevadas o ácido lático inibiu a produção de hidrogênio. Kim et al. (2012) relataram que o aumento da produção de hidrogênio em 22%, em biorreatores em batelada, foi possível devido ao aumento da concentração inicial de ácido lático de 0 para 8 g/L (89 mmol/L). Santos (2014) também relatou que a produção de ácido lático apresentou efeito positivo na produção de hidrogênio. A degradação do lactato pode ocasionar uma maior quantidade de NADH para produção de hidrogênio pela rota do butirato (BAGHCHEHSARAE et al., 2009), o que pode explicar a maior produção de hidrogênio no biorreator tratado com ácido.

O acompanhamento da concentração dos ácidos orgânicos nos biorreatores, inoculados com os diferentes lodos submetidos a diferentes métodos de enriquecimento, revelou que diferentes metabolismos estão ocorrendo para a formação do  $H_2$ . O tratamento ácido do lodo, em particular, promoveu um maior aumento na produção de  $H_2$  e o

consumo de um metabólito, normalmente associado à diminuição da produção de  $H_2$ , o ácido lático.

Como pode ser observado nas Figuras 20 a variação dos pHs no biorreator inoculado com o lodo controle, térmico e ácido foi bastante distinta. De uma maneira geral, pode-se dizer que o pH do controle manteve-se aproximadamente constante por volta de 4,3 (Figura 20 A). Já o pH do efluente do biorreator inoculado com o lodo submetido ao tratamento térmico (Figura 20 B), no início estava abaixo de 4,0, aumentando no decorrer da operação do biorreatores, sendo estabilizado em 4,5. O pH nos efluentes dos biorreatores inoculados com o lodo tratado por ácido (Figura 20 C), teve um comportamento contrário ao observado nos efluentes dos biorreatores contendo o lodo tratado por calor, ou seja, iniciou por volta de 5,0 e diminuiu até 4,0, ao final do período de operação.

Apesar destas variações o pH manteve-se dentro da faixa relatada na literatura do pH de efluentes de biorreatores para a produção de  $H_2$ . Nos trabalhos sobre produção biológica de  $H_2$  por cultura mista, o pH ótimo para a produção de  $H_2$  é em torno de 4,5 a 6,5 (MOHAN, 2009; CHEONG; HANSEN, 2006). Estes valores variam muito na literatura, trabalhos como o de Mu et al. (2006) relatam que o pH mais favorável para a produção de hidrogênio foi em torno de 4,2, dentre a faixa estudada de 3,4 a 6,3.

#### 4.4.2 Análise das comunidades microbianas durante o acompanhamento dos biorreatores em batelada alimentada inoculados com os lodos pré-tratados

A Figura 19 apresenta o gel de DGGE com as amostras de lodo retiradas durante o acompanhamento dos biorreatores inoculados com os lodos pré-tratados durante 36 dias. As diferentes bandas que aparecem no gel sugerem que a microbiota dos lodos foi modificada de forma diferente pelos diferentes pré-tratamentos. O gel de DGGE mostra, visualmente, as diferenças entre as amostras. Portanto, a diversidade bacteriana foi estimada pelo índice de Shannon, utilizado para comparar os diferentes perfis. Na Figura 19 estão apresentadas as bandas encontradas nos biorreatores durante o período de 36 dias, no gel de DGGE. E na Figura 20 pode ser observado os índices de Shannon do acompanhamento de biorreatores em batelada alimentada inoculados com os lodos sem tratamento (controle) e os pré-tratados em 0, 12, 23 e 36 dias.

Figura 19: Gel de DGGE com as amostras dos lodos durante o acompanhamento do biorreatores em batelada alimentada inoculados com os lodos sem tratamento (controle) e os pré-tratados, em 0, 12, 23 e 36 dias.

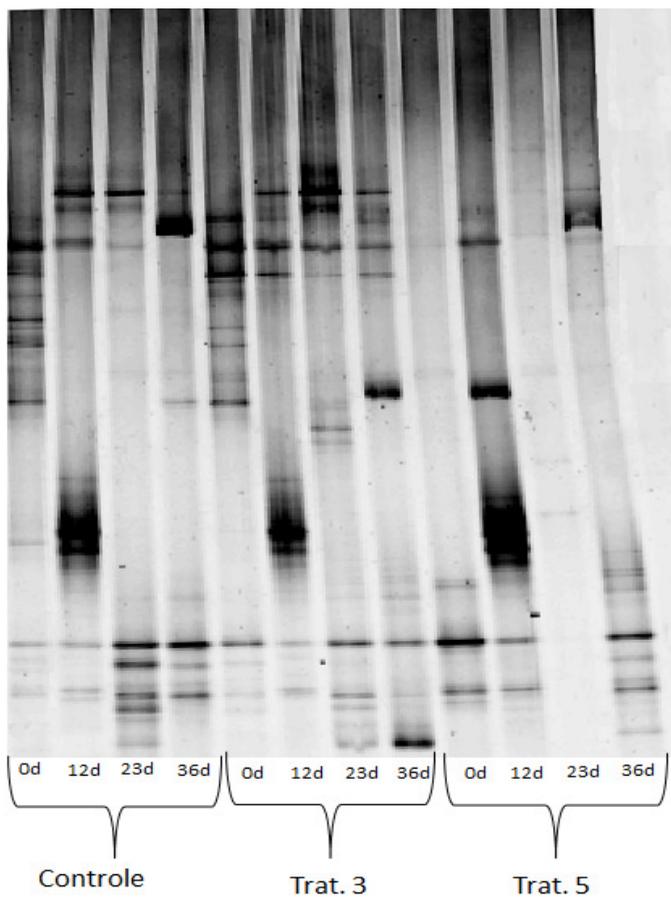
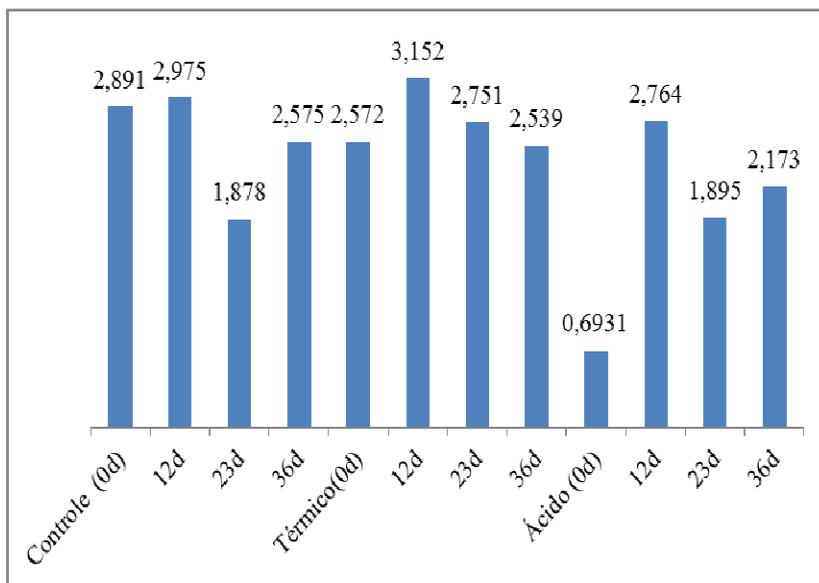
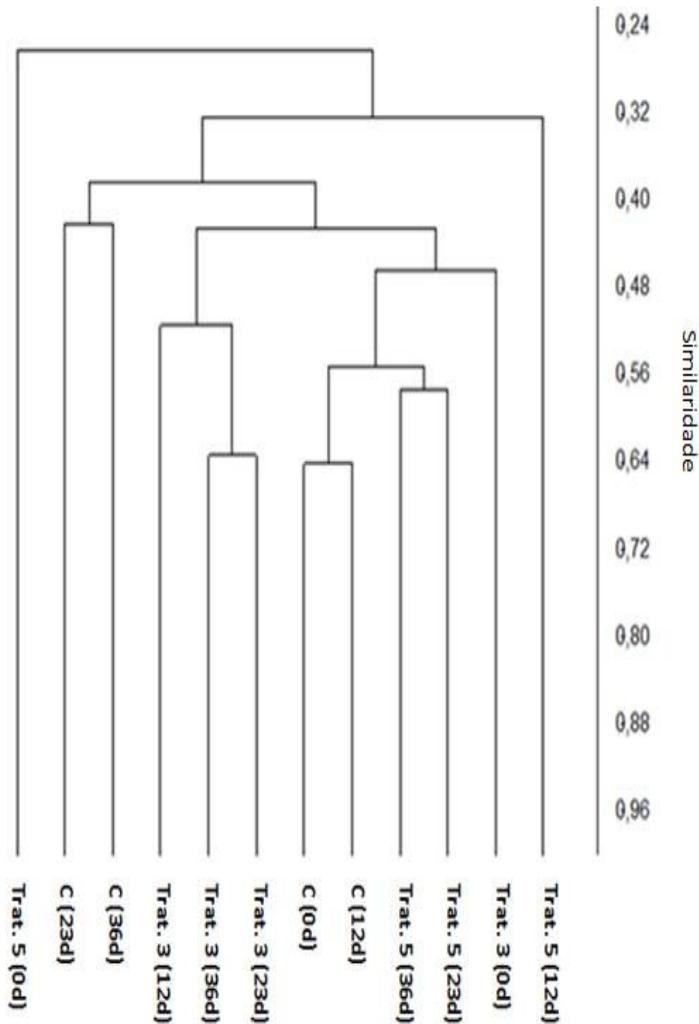


Figura 20: Valores de diversidade, indicados pelo índice de Shannon do acompanhamento de biorreatores em batelada alimentada inoculados com os lodos sem tratamento (controle) e os pré-tratados em 0, 12, 23 e 36 dias



Quando há várias comunidades sendo comparadas simultaneamente uma boa representação da diversidade microbiana pode ser obtida através das análises de agrupamento (*cluster analysis*). A análise de agrupamento é obtida através de uma matriz contendo a similaridade para cada par de amostras. As duas amostras mais similares são combinadas para formar um grupo único. As análises procedem até o último grupo ser combinado, originando um dendograma. Essa análise é baseada no algoritmo de Bray-Curtis, transformando os dados numa matriz de distância e plotando um gráfico de similaridade entre as amostras, relacionando a estrutura da comunidade microbiana de cada amostra. Na Figura 21 está representado o dendograma mostrando a similaridade entre as amostras do acompanhamento de biorreatores em batelada alimentada inoculados com os lodos sem tratamento (controle) e os pré-tratados em 0, 12, 23 e 36 dias.

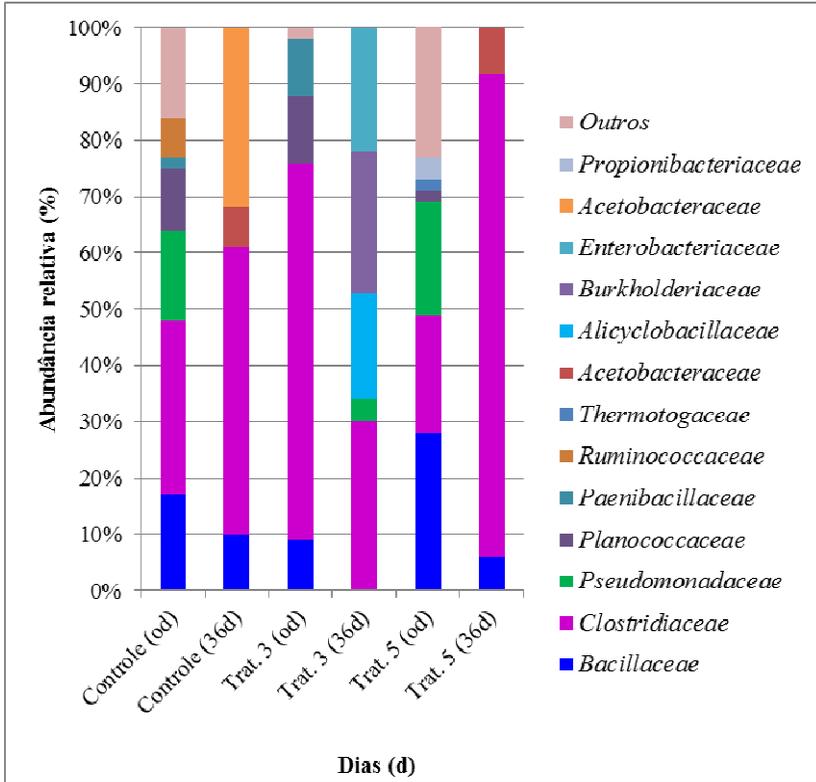
Figura 21: Dendograma do DGGE mostrando a similaridade entre as amostras do acompanhamento de biorreatores em batelada alimentada inoculados com os lodos sem tratamento (controle) e os pré-tratados em 0, 12, 23 e 36 dias.



Como pode ser observado na Figura 21, a maior similaridade entre as amostras é 66%, no agrupamento entre as amostras controle (sem tratamento) 0 e 12 dias, já o agrupamento das amostras controle

(23 d) e controle (36 d) a similaridade é de 42%, ou seja, a diversidade microbiana mudou durante o acompanhamento dos biorreatores, nos 36 dias. Em cada período monitorado 0, 12, 23 e 36 dias, a comunidade apresentou uma mudança na comunidade microbiana de 0 d ao 36 d. No tratamento 3 (80 °C por 15 min) a amostra no 0 d, mostrou-se bastante diferente das amostras dos dias 12, 23 e 36, pois está em outro agrupamento no dendograma, quando considerado o corte no dendograma em 50%. Sugerindo que a comunidade microbiana mudou até o 12 d. As amostras dos dias 23 e 36 do tratamento 3 apresentaram similaridade de 65% pertencendo ao mesmo agrupamento. Já a amostra do tratamento 3 do 12 d mostrou-se menos similar ainda, em relação as amostras dos dias 23 e 36, 42%. As similaridades entre as amostras indicam quanto a diversidade microbiana mudou com o passar dos dias. No tratamento 3, as amostras mostraram-se diferentes com o passar do tempo. A amostra mais diferente de todo o dendograma é a amostra do tratamento 5 (ácido/pH3) 0d, pois ela não está agrupada com nenhuma outra amostra. Isso indica que o tratamento ácido fez mudanças significantes no lodo utilizado. As amostras 23 e 36 do tratamento 5 pertencem ao mesmo agrupamento com similaridade de 58%. A amostra 12 d do tratamento 5 apresenta similaridade menor que 35% em relação as outras amostras tratadas com ácido por 24h. O acompanhamento da comunidade microbiana dos biorreatores no período de 36 dias mostrou através do dendograma que as amostras mudaram com o passar dos dias, em todos os lodos (controle, tratamento 3 e tratamento 5). Assim para saber mais especificamente quais os gêneros de microrganismos que foram prejudicados ou favorecidos com as condições experimentais utilizadas neste trabalho. As amostras dos biorreatores no início (0 d) e final (36 d) foram sequenciadas conforme item 4.10.4. Na Figura 27 mostra a classificação das sequências encontradas no acompanhamento dos biorreatores em batelada alimentada inoculados com os lodos sem tratamento (controle) e os pré-tratados em 0 e 36 dias. Na Figura 22 estão representadas as sequências dos microorganismos predominantes nos diferentes lodos utilizados como inóculo, classificadas em famílias com abundância relativa maior do que 1%.

Figura 22: Classificação das sequências divididas por famílias com abundância relativa maior do que 1%, no acompanhamento dos biorreatores em batelada alimentada inoculados com os lodos sem tratamento (controle) e os pré-tratados em 0 e 36 dias,



Como pode ser observado na Figura 22, as sequências encontradas no acompanhamento dos biorreatores em batelada alimentada inoculados com o lodo sem tratamento (controle) e os pré-tratados em 0 e 36 dias mostraram diferentes entre si. Nos lodos controle, tratamento 3 e tratamento 5, no tempo 0 dias (inicial) apresentaram comunidade microbiana. No lodo controle do início do experimento comparado com o final (36 dias) a percentagem da família *Clostridiaceae* aumentou de 31 para 51%, sendo que o *Clostridium* é o microrganismo mais efetivo, dentre os estudados, na produção de hidrogênio e pertence a essa família encontrada na comunidade

microbiana do inóculo deste estudo. Mesmo com esse aumento de microrganismos, não foi observado aumento na produção de hidrogênio. Esta observação sugere que pode ter ocorrido um desvio de rota metabólica de alguns desses *Clostridium* devido às condições ambientais. Segundo Neves (2009), *Clostridium* produz hidrogênio, durante sua fase de crescimento (exponencial) e ao atingir a fase estacionária pode alterar seu metabolismo passando da produção de hidrogênio para a produção de outros compostos, tais como butanol e acetona. O surgimento de 32% da família *Acetobacteraceae* no lodo controle chamou atenção. Estas bactérias, produtoras de ácido acético, oxidam alcoóis ou açúcares e são amplamente utilizadas no processamento industrial de alimentos. Na literatura não foi encontrada relação desses microrganismos com produção de hidrogênio.

A família *Pseudomonadaceae* encontrada no lodo controle (sem tratamento) e no lodo tratado por ácido (tratamento 5) desapareceram durante os 36 dias de experimento em batelada alimentada. E no tratamento térmico (3) foi encontrada 4% dessa família no lodo.

No tratamento 3 (térmico) foi observada uma diminuição da família *Clostridiaceae* de 67% para 30% (36d), mudança relevante. As *Clostridiaceae* também foram encontradas no início do experimento controle e do tratamento 3 desapareceu durante os 36 dias de experimento sugerindo que outros microrganismos se sobressaíram na competição entre os microrganismos existentes na amostra. O gênero *Thermoanaerobacterium sp.* tem sido estudado para produzir hidrogênio e pertencem a família das *Clostridiaceae*. São bactérias termofílicas e halotolerantes capazes de fermentar diferentes fontes de carbono.

Singh et al. (2014) pesquisaram a produção de hidrogênio por *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*. Os autores encontraram condições ótimas para produção de hidrogênio pH 7, a 55-60 °C, utilizando biorreatores contínuos, com TRH de 48 h. Os rendimentos máximos de hidrogênio foram 2,5 mol de H<sub>2</sub>/mol de glicose; 2,2 mol de H<sub>2</sub>/mol de xilose e 5,2 mol de H<sub>2</sub>/mol de sacarose. O-Thong et al. (2008), também estudaram a *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* e a produção de hidrogênio foi influenciada pelo pH e pela concentração de sacarose utilizada. As condições ótimas utilizadas foram pH 6,2, 60 °C e 20 g/L de sacarose, produziram 12,12 mmol de H<sub>2</sub>/L.h. Os autores indicaram essa cultura para aplicação em tratamentos de efluentes orgânicos que geralmente contenham açúcar. O-Thong et al. (2008) operaram um biorreator em batelada sequenciada

a 60 °C para investigar a influência *Thermoanaerobacterium sp.* na produção de hidrogênio em efluente óleo de palma. Esse microrganismo foi encontrado em grande quantidade no lodo utilizado. Assim os autores otimizaram as condições de cultivo, resultando no aumento na produção de hidrogênio e redução da DQO.

A família *Alicyclobacillaceae* e *Burkholderiaceae* não foram encontrados no início do lodo controle (sem tratamento) e nem nos pré-tratados. Esses microrganismos se destacaram no tratamento térmico (tratamento 3), pois no período de 36 d foram encontrados em 19 e 25%, respectivamente. As *Alicyclobacillaceae* são a família do gênero *Kirpudia* que é uma reclassificação do gênero *Bacillus*, são microrganismos que oxidam o hidrogênio, termoacidofílicos formadores de esporos, crescem a temperatura de 35-65 °C (KLENK et al., 2011). Já a família *Burkholderiaceae* ao qual o gênero *Burkholderia* pertence, constitui um grupo de microrganismos gram-negativos não fermentadores de glicose e são amplamente encontrados no meio ambiente. Também são fixadores de nitrogênio e estão sendo estudadas para melhorar a produção de hidrogênio. Hoyos et al. (2014) estudaram *Burkholderia unamae* e *Burkholderia tropica* para determinar suas capacidades de produção de H<sub>2</sub>. Várias condições de cultivo, de condições atmosféricas, de fontes de carbono e compostos químicos foram testadas. Os resultados mostraram que ambas as culturas foram capazes de produzir H<sub>2</sub>. O meio de cultura com o rendimento mais elevado de H<sub>2</sub> foi de 1% v/v de melação enriquecidas com Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> (0,2 g / L), FeSO<sub>4</sub> (0,2 g / L) e de cisteína (0,02 g / L), sob um vácuo parcial (20% de ar v/v). Sob estas condições, a maior velocidade de produção de H<sub>2</sub> foi de 24,64 mmol H<sub>2</sub>/L para a cultura de *B. unamae*.

A família da *Enterobacteriaceae*, também, foram encontradas apenas no final dos 36 dias de acompanhamento do tratamento 3 em 22%. Essa família são microrganismos mesófilos, anaeróbios facultativos sendo utilizado em fermentação anaeróbia para produzir hidrogênio. A capacidade de produção de hidrogênio a partir de *Enterobacter aerogenes*, tem sido largamente estudada, tem-se obtido o rendimento de 1,97 mol de H<sub>2</sub>/mol de glicose. Outra espécie é a *Enterobacter cloacae* ITT-BY 08 que apresentou um rendimento de 2,2 mol de H<sub>2</sub>/mol glicose (KAPDAN; KARGI, 2006). Patel et al. (2014) concluíram que o gênero *Enterobacter sp.* foi eficiente para melhoria da produção de hidrogênio, produzindo 3 mol de H<sub>2</sub>/mol de glicose.

## 5 CONCLUSÕES

- Foi verificada a possibilidade de utilização de uma cultura mista proveniente de um sistema anaeróbio de tratamento de vinhaça na produção de H<sub>2</sub> por fermentação.

- Estudos com diferentes relações Substrato/microrganismo revelaram que a melhor faixa para a produção de H<sub>2</sub> pelo lodo antes do pré-tratamento foi entre 5 e 6 e que após os pré-tratamentos térmico e ácido estes valores diminuíram para 2,0. Portanto, a eficiência na produção de hidrogênio cai com a elevação da concentração da fonte de carbono.

- Dentre os pré-tratamentos realizados no lodo anaeróbio a fim de selecionar bactérias produtoras de H<sub>2</sub>, o tratamento 5, ou seja o tratamento ácido (pH 3/24 h) foi o melhor dentre os métodos de pré-tratamento do lodo, seguido pelo pré-tratamento térmico (80 °C/15 min).

- O tratamento térmico a 80 °C por 15 min. é benéfico ao processo, porém o aumento do tempo do tratamento interfere negativamente na produção de hidrogênio.

- Tem que mudar para as famílias, pois mudou completamente a discussão !!!!!Os principais gêneros identificados no acompanhamento dos biorreatores em 36 dias foram *Clostridium*, *Thermoanaerobacterium*, *Bacillus* e *Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae*, *Kyrpidia*, *Burkholderia*, *Glucanobacter*.

- O tratamento ácido da cultura mista parece ter favorecido a produção de H<sub>2</sub> predominantemente pelo gênero *Thermoanaerobacterium*, enquanto que no lodo submetido ao tratamento térmico predominaram os gêneros *Burkholderia*, *Clostridium* e *Enterobacteriaceae*, produtores de H<sub>2</sub>.

- O tratamento ácido da cultura mista proveniente de um reator anaeróbio aplicado ao tratamento de vinhaça foi o mais apropriado para o enriquecimento desta cultura mista em microrganismos produtores de H<sub>2</sub>.



## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKI, H.; TANIGUCH, Y.; TAMURA, I.; KEGASA, A.; HAYAKAWA, H.; ISHIKAWA, Y.; YAMAMOTO, S.; SUGIMOTO I. Fuel cells and energy networks of electricity, heat, and hydrogen: A demonstration in hydrogen-fueled apartments. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, p. 1204-1213, 2012.

ALAUZET, C.; TEYSSIER, C.; JUMAS-BILAK, E.; GOUBY, A.; CHIRON, R.; RABAUD, C.; COUNIL, F.; LOZNIEWSKI, A.; MARCHANDIN, H. *Gluconobacter* as Well as Asaia Species, Newly Emerging Opportunistic Human Pathogens among Acetic Acid Bacteria. **J. Clin. Microbiol.**, v. 48, p. 3935-3942, 2010.

ANGENENT, T.; KARIM, K; AL-DAHAN, MUTHANNA H.; WRENN, A.; DOMÍGUEZ-, R.. Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater. **Trends in Biotechnology**, v. 22 (9), p. 477-485, 2004.

ANTONOPOULOU, G.; GAVALA, H. N. ; SKIADAS, I. V. ; LYBERATOS, G. Effect of pH on fermentative hydrogen production from sweet sorghum extract. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.35, p. 1921-1928, 2010.

ANTONOPOULOU, G.; GAVALA, H. N. ; SKIADAS, I. V. ; LYBERATOS, G. Effect of substrate concentration on fermentative hydrogen production from sweet sorghum extract. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.37, p. 1204-1213, 2011.

APHA, AWWA, WEF.. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 19th. edn. American Public Health Association. Washington, DC, 1995.

AQUINO, S. F.; CHERNICHARO, C. A. L.; FORESTI, E.; SANTOS, M. L. F.; MONTEGGIA, L.O. Metodologia para determinação da atividade metanogênica específica (AME) em lodos anaeróbios. **Engenharia Sanitária Ambiental**, v.12, Nº 2, p.192-201, 2007.

AROOJ, M. F; HAN, S. K.; KIM, S. H.; KIM, D. H.; SHIN, H. S. Continuous biohydrogen production in a CSTR using starch as a substrate. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.33, p. 3289–3294, 2008.

ASSAWAMONGKHOLSIRI, T. ; REUNGSANG, A.; PATTRA, S. Effect of acid, heat and combined acid-heat pretreatments of anaerobic sludge on hydrogen production by anaerobic mixed cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, p. 6146-6153, 2013.

BADIEI, M.; JAHIM, J.M.; ANUAR, N.; ABDULLAH, S.R.S. Effect of hydraulic retention time on biohydrogen production from palm oil mill effluent in anaerobic sequencing batch reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.36, p. 5912-5919, 2011.

BAGHCHEHSARAEE, B.; NAKHLA, G.; KARAMANEV, D.; MARGARITIS, A. Effect of extrinsic lactic acid on fermentative hydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.34, p. 2573-2579, 2009.

BANDO, Y.; FUJIMOTO, N.; SUZUKI, M.; OHNISHI, A. A microbiological study of biohydrogen production from beer lees. **International Journal of Hydrogen Energy**. v. 38, p.2709-2718, 2013.

BREURE, A.E.; VAN ANDEL, J.G. Hydrolysis and acidogenic fermentation of a protein gelatin in anaerobic continuous culture. **Applied Microbiology Biotechnology**. v 20, p. 40-45, 1984.

BUITRÓN, G.; CARVAJAL, C. Biohydrogen production from Tequila vinasses in an anaerobic sequencing batch reactor: Effect of initial substrate concentration, temperature and hydraulic retention time. **Bioresource Technology**, v.101, p. 9071–9077, 2010.

CAMPOS, J.R. **Tratamento de esgotos sanitários por processo anaeróbico e disposição controlada no solo**. Rio de Janeiro: ABES – PROSAB, p. 464, 1999.

CHAGANTI, Subba Rao; KIM, Dong-Hoon; LALMAN, Jerald A. Dark fermentative hydrogen production by mixed anaerobic cultures: Effect of inoculum treatment methods on hydrogen yield. **Renewable Energy**, v. 48, p. 117-121, 2012.

CHANG, S., LI, J.Z, LIU, F. Evaluation of different pretreatment methods for preparing hydrogen-producing seed inocula from waste activated sludge. **Renewable Energy**, v. 36, p. 1517-1522, 2011.

CHAUBEY, R., SAHU, S., JAMES, O.O., MAITY, S. A review on development of industrial processes and emerging techniques for production of hydrogen from renewable and sustainable sources. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 23, p. 443-462, 2013.

CHEN, C.C.; C.Y.; CHANG, J.S. Kinetics of hydrogen production with continuous anaerobic cultures utilizing sucrose as the limiting substrate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 57, p. 56-64, 2001.

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

CHEN, C.C.; LIN, C.Y. Using sucrose as a substrate in an anaerobic hydrogen-producing reactor. **Advances in Environmental Research**, v. 7, p. 695-699, 2004.

CHEN, W.M.; TSENG, Z.J.; LEE, K.S.; CHANG, J.S. Fermentative hydrogen production with *Clostridium butyricum* CGS5 isolated from anaerobic sewage sludge. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 30, p. 1063 – 1070, 2005.

CHEONG, D.Y.; HANSEN, C.L. Acidogenesis characteristics of natural, mixed anaerobes converting carbohydrate-rich synthetic wastewater to hydrogen. **Process Biochemistry**. v. 41, p. 1736-1745, 2006.

CHERNICARO, C.A.L. **Biorreatores Anaeróbios - Princípios do tratamento biológico de águas residuárias**. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental. UFMG, v. 5, 2° edição, 1997.

CHOU, C. H.; WANG, C. W.; HUANG, C. C.; LAY, J. J. Pilot study on the influence of stirring and pH on anaerobes converting high-solid organic wastes to hydrogen. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, p.1550–1558, 2008.

CHOU, C.H.; HAN C.L.; CHANG, J.J.; LAY, J.J. Co-culture of *Clostridium beijerinckii* L9, *Clostridium butyricum* M1 and *Bacillus thermoamylovorans* B5 for converting yeast waste into hydrogen. . **International Journal of Hydrogen Energy**, v.36, p.13972-13983,2011.

CONNERS, S. B.; MONGODIN, E. F.; JOHNSON, M. R.; MONTERO, C. I.; NELSON, K. E.; KELLY, R.M. Microbial biochemistry, physiology, and biotechnology of hyperthermophilic Thermotoga species. **FEMS Microbiol Rev**, v. 30 (6), p. 872–905, 2006.

COSTA, D. P. Descrição da comunidade microbiana associada à rizosfera de cana-de-açúcar. **Dissertação de mestrado**. ESALQ-Piracicaba, 2012.

DAS D, VEZIROGLU N. Advances in biological hydrogen production processes **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, p. 6016–6057, 2008.

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

DEL NERY, V. **Utilização de lodo anaeróbio imobilizado em gel no estudo de partida de biorreatores de fluxo ascendente com manta de lodo**, 215 p. Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de São Carlos, 1987.

DEMIREL, B.; SCHERER, P.; YENIGUN, O.; ONAY, T.T. Production of methane and hydrogen from biomass through conventional and high-rate anaerobic digestion processes. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 40, p. 116–146, 2010.

DICKS, L.M.T., ENDO, A. Taxonomic Status of Lactic Acid Bacteria in Wine and Key Characteristics to Differentiate Species. **South Africa Journal Enology Viticulture**. v. 30, p.72-90, 2009.

DING, J.; LIU, B.F.; REN, N.Q.; XING, D.F.; GUO, W.Q.; XU, J.F.; XIE, G.J. Hydrogen production from glucose by co-culture of *Clostridium butyricum* and immobilized *Rhodospseudomonas faecalis* RLD-53. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34 p. 3647-3652, 2009.

ELBESHISHY, E.; HAFEZ, H.; NAKHLA, G. Enhancement of biohydrogen producing using ultrasonication. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35 (12), p. 6184-6193 , 2010.

ELFERINK, S. J. W. H.; LUPPENS, S.B.I.; MARCELIS,C.L.M; ALFONS J. M. STAMS, A.J.M. Kinetics of acetate oxidation by two

sulfate reducers isolated from anaerobic granular sludge. **Applied and environmental microbiology**, v. 64 p. 2301–2303, 1998.

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

FDZ-POLANCO, F.; FDZ-POLANCO, M.; FERNANDEZ, N.; URUENA, M.A.; GARCIA, P.A.; VILLAVARDE S. New process for simultaneous removal of nitrogen and sulphur under anaerobic conditions. **Water Research**, v. 35, p. 259–262, 2001.

GADHAMSHETTY, V.; ARUDCHELVAM, Y.; NIRMALAKHANDAN, N.; JOHNSON, D.,C. Modeling dark fermentation for biohydrogen production: ADM1-based model vs. Gompertz model. **International Journal of Hydrogen Energy**. v. 35, p. 479-490, 2010.

GARCÍA-MORALES, J.L.; NEBOT, E.; ROMERO, L.I.; SALES, D. Comparison between acidogenic and methanogenic inhibition caused by liner alkylbenzene-sulfonate (LAS). **Chemical e Biochemical Engineering**, v. 15, p. 13-19, 2001.

GINKEL, S.V.; LOGAN, B., E. Inhibition of biohydrogen production by undissociated acetic and butyric acids. **Environmental ScienceTechnology**. v. 39, p. 9351-9356, 2005.

GINKEL, S.V.; OH, S.E.; LOGAN, B.E. Biohydrogen production from food processing and domestic wastewaters. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 30, p.1535–1542, 2005.

GOMES NETO, E. H. Biohidrogênio, Evoluir sem poluir: a era do biohidrogênio, das energias renováveis e das células a combustível. Brasil H<sub>2</sub> Fuel Cell Energy. Curitiba – PR, 2005

GUO, L.; LI, X.; BO, X., QI; Z.; LIAO, D.; LIU, J. Impacts of sterilization, microwave and

ultrasonication pretreatment on hydrogen producing using waste sludge. **Bioresource Technology**, v.99,p.3651-3658,2008.

GUO, Y., KIM, S., SUNG, S., LEE, P., Effect of ultrasonic treatment of digestion sludge on bio-hydrogen production from sucrose by anaerobic fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v 35, p. 3450-3455, 2010.

HAFEZ, H.; NAKHLA, G.; NAGGAR M.H.; ELBESHISHY,E.; BAGHCHEHSARAEE, B. Effect of organic loading on a novel hydrogen bioreactor. **International journal of hydrogen energy**, v. 35, p. 81-92, 2010.

HALLENBECK, P.C., GHOSH, D. Improvements in fermentative biological hydrogen production through metabolic engineering. **Journal of Environmental Management**, 95, S360-S364, 2012.

HASHSHAM, S. A. ; FERNANDEZ, A. S. ; DOLLHOPF, S., L. ; DAZZO, F., B. , HICKEY, R., F. ; TIEDJE, J., M. Parallel processing of substrate correlates with greater functional stability in methanogenic bioreactor communities perturbed by glucose. **Apply Environment Microbiology**. v. 66, p. 4050-4057, 2010.

HAWKES, F.R.; DINSDALE, R.; HAWKES, D.L.; HUSSY, I. Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimization. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 27, p. 1339-1347, 2002.

HE, D., BULTEL, Y., MAGNIN, J.P., WILLISON, J.C. Kinetic analysis of photosynthesis growth and photohydrogen production of two strains of *Rhodobacter capsulatus*. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 38, p. 253-259, 2006.

HERNÁNDEZ, M.; RODRÍGUEZ, M. Hydrogen production by anaerobic digestion of pig manure: Effect of operating conditions. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 53, p. 187-192, 2013.

HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K.; WELLINGTON, E. Analysis of Actinomycete Communities by Specific Amplification of Genes Encoding 16S rRNA and Gel-Electrophoretic Separation in Denaturing Gradients. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 99, p. 3233–3241, 1997.

JAYASINGHEARACHCHI, H., S.; SARMA, P., M.; LAL, B. Biological hydrogen production by extremely thermophilic novel bacterium *Thermoanaerobacter mathranii* A3N isolated from oil producing well. **International Journal of Hydrogen Energy**. p. 1-10, 2012.

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

KANG, J.H.; KIM, D.; LEE, T.J. Hydrogen production and microbial diversity in sewage sludge fermentation preceded by heat and alkaline treatment. **Bioresource Technology**, v.109, p. 239–243, 2012.

KAPDAN, I.; KARGI, F. Bio-hydrogen production from waste materials. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 15, p. 121-34, 2006.

KAVAMURA, V. N.; TAKETANI, R. G.; LANÇONI, M. D.; ANDREOTE, F. D.; MENDES, R.; SOARES DE MELO, I. Water regime influences bulk soil and Rhizosphere of *Cereus jamacaru* bacterial communities in the Brazilian Caatinga biome. **Public Library Of Science**, v. 8, 2013.

KHANAL S. Anaerobic Biotechnology for Bioenergy Production: Principles and Applications. **John Wiley & Sons, Iowa - USA**, 320 p., 2009.

KHANNA, Namita; KUMAR, Kanhaiya; TODI, Sona; DAS, Debabrata. Characteristics of cured and wild strains of *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08 for the improvement of biohydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37 (16), p. 11666-11676, 2012.

KIELING, D.; REGINATTO, V.; SCHMIDELL, W.; TRAVERS, D.; MENES, R.; SOARES, H. Sludge wash-out as strategy for Anammox process start-up. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 1579–1585, 2007.

KIELY, P.D.; CUSICK, R.; CALL, D.F.; SELEMBO, P. A.; REGAN, J.M.; LOGAN. B.L. Anode microbial communities produced by changing from microbial fuel cell to microbial electrolysis cell operation using two different wastewaters. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 388–394, 2011.

KIM M-S, LEE D-Y. Fermentative hydrogen production from tofu-processing waste and anaerobic digester sludge using microbial consortium. **Bioresource Technology**, v.101, p. 48-52, 2010.

KIM, T.H.; LEE, Y.; CHANG, K.; HWANG, S. Effects of initial lactic acid concentration, HRTs, and OLRs on bio-hydrogen production from lactate-type fermentation. **Bioresource Technology**, v.103, p.136-141, 2012.

KIM, D.H.; KIM, M.S. Thermophilic fermentative hydrogen production from various carbon sources by anaerobic mixed cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**, v 37, p. 2021-2027, 2012.

KLEEREBEZEM, R.; LOOSDRECHT, M.C.M. Mixed culture biotechnology for bioenergy production. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, p. 207-212, 2007.

KLENK, H.P.; LAPIDUS, A.; CHERTKOV, O.; COPELAND, A.; DEL RIO, T. G.; NOLAN, M.; LUCAS, S.; CHEN, F.; TICE, H.; CHENG, J. F.; HAN, C.; BRUCE, D.; GOODWIN, L.; PITLUCK, S.; PATI, A.; IVANOVA, N.; MAVROMATIS, K.; DAUM, C.; CHEN, A.;

PALANIAPPAN, K.; CHANG, Y. J.; LAND, M.; HAUSER, L.; JEFFRIES, C. D.; DETTER, J. C.; ROHDE, M.; ABT, B.; PUKALL, R.; GÖKER, M.; BRISTOW, J.; MARKOWITZ, V.; HUGENHOLTZ, P.; EISEN, J. A. Complete genome sequence of the thermophilic, hydrogen-oxidizing *Bacillus tusciae* type strain (T2) and reclassification in the new genus, *Kyrpidia* gen. nov. as *Kyrpidia tusciae* comb. nov. and emendation of the family Alicyclobacillaceae da Costa and Rainey. **Stand Genomic Sci.** v. 5(1), p. 121–134, 2011.

KONDO, T.; ARAKAWA, M.; HIRAI, T.; WAKAYAMA, T.; HARA, M.; MIYAKE, J. Enhancement of hydrogen production by a photosynthetic bacterium mutant with reduced pigment. **Journal of Bioscience and Bioengineering.** v.93, n. 2, p 145-150, 2002.

KÖNIG, H., FRÖHLICH, J. **Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine.** Berlin : Springer-Verlag, 2009.

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

LAY, J.J. Modelling and optimisation of anaerobic digested sludge converting starch to hydrogen. **Journal of Bioscience and Bioengineering.** v. 68, p. 269–78, 2000.

LAY, C.H.; LIN, H.C., SEM, B.; CHU, C.Y.; LIN, C.Y. Simultaneous hydrogen and ethanol production from sweet potato via dark fermentation. **Journal of Cleaner Production,** [v. 27](#), p. 155–164, 2012.

LEMA, J.M. **Curso de digestão anaeróbia aplicada a resíduos sólidos e líquidos.** Recife –CE. 1997.

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

LEVIN, D.B.; ISLAM, R.; CICEK, N.; SPARLING, R. Hydrogen production by *clostridium thermocellum* 27405 from cellulosic biomass substrates. **Internationa l journal of hydrogen energy**, v. 11, p. 1496-1503, 2006.

LI, C.; FANG, H. Fermentative hydrogen production from wastewater and solid waste by mixed cultures. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology** 37:1-39, 2009.

LIANG, S.; MCDONALD, A. G.; COATS, E. R. Lactic acid production with undefined mixed culture fermentation of potato peel waste. **Waste Management**, v. 34(11), p. 2022-7, 2014.

LIANG, T.M.; CHENG, S.S.; WU, K.L. Behavioral study on hydrogen fermentation reactor installed with silicone rubber membrane. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 27, p. 1157-1165, 2002.

LIN, Y.H; ZHENG, H.X.; JUAN, M.L. Biohydrogen production using waste activated sludge as a substrate from fructose-processing wastewater treatment. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 90, p. 221–230, 2012.

LIU, G.; SHEN, J. Effects of culture and medium condition on hydrogen production from starch using anaerobic bacteria. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 98, p. 251–256, 2004.

LUO, G.; XIE, L.; ZOU,,Z.; WANG,W.; ZHOU, Q. Fermentative hydrogen production from cassava stillage by mixed anaerobic microflora: Effects of temperature and pH. **Journal Applied Energy**, v. 87, p. 3710–3717, 2010<sup>a</sup>.

LUO, G.; XIE, L.; ZOU,,Z.; WANG,W.; ZHOU, Q. Evaluation of pretreatment methods on mixed inoculum for both batch and continuous

thermophilic biohydrogen production from cassava stillage. **Bioresource Technology**, v.101, p. 959–964, 2010<sup>b</sup>.

LUO, G.; XIE, L.; ZOU, Z.; WANG, W.; ZHOU, Q Exploring optimal conditions for thermophilic fermentative hydrogen production from cassava stillage. **International journal of hydrogen energy**, v. 35, p. 6161-6169, 2010<sup>c</sup>.

MCCAIG, A.E; GROVER, L.A.; PROSSER, J.I. Numerical analysis of grassland bacterial community structure under different land management regimens by using 16S ribosomal DNA sequence data and denaturing gradient gel electrophoresis banding patterns. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 4554-4559, 2001.

MAGURRAN, A. E. **Measuring Biological Diversity**. Blackwell Publishing, Oxford. 215p., 2004.

MARIAKAKIS, I.; BISCHOFF, P.; KRAMPE, J.; MEYER, C.; STEINMETZ, H. Effect of organic loading rate and solids retention time on microbial population during bio-hydrogen production by dark fermentation in large lab-scale. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, p. 10690-10700, 2011.

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

MISSAGIA, B. **Estudo das comunidades bacterianas em filtros biológicos percoladores utilizados para o pós-tratamento de efluentes de um reator UASB**. Tese de doutorado. Escola de Engenharia de UFMG, Belo Horizonte, 2010.

MOHAN SV, BHASKAR YV, SARMA PN. Biohydrogen production from chemical wastewater treatment in biofilm configured reactor

operated in periodic discontinuous batch mode by selectively enriched anaerobic mixed consortia. **Water Research**, v.41, p. 2652–2664, 2007.

MOHAN, S.V.; BABU, V.L.; SARMA, P.N. Anaerobic biohydrogen production from dairy wastewater treatment in sequencing batch reactor: effect of organic loading rate. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 24, p. 506-515, 2008.

MOHAN, S.V. Harnessing of biohydrogen from wastewater treatment using mixed fermentative consortia: Process evaluation towards optimization. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, p. 7460–7474, 2009.

MOKHAYERI, Y.; NICHOLS, A.; MURTHY, S.; RIFFAT, R.; DOLD, P.; TAKACS, I. Examining the influence of substrates and temperature on maximum specific growth rate of denitrifiers. **Water Science Technology**, v. 54, p.155-62, 2006.

MOLETTA, R.; VERRIER, D.; ALBAGNAC, G. Dynamic modeling of anaerobic digestion. **Water Research**, v. 20, p. 427-434, 1986.

MOMIRLAN, M.; VEZIROGLU, T. The properties of hydrogen as fuel tomorrow in sustainable energy system for a cleaner planet. **Internacional Journal Hydrogen Energy**, v.30, p. 795–802, 2005.

MONLAU, F.; AEMIG, Q.; TRABLY, E.; HAMELIN, J.; STEYER, J.; CARRERE, H. Specific inhibition of biohydrogen-producing *Clostridium* sp. after dilute-acid pretreatment of sunflower stalks. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38 (28), p. 12273-12282, 2013.

MORAIS, M. **Diversidade bacteriana do solo sob cultivo de cana-de-açúcar**. Tese de doutorado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, USP, 2008.

MU, Y.; YU, H.Q.; WANG, G. The role of pH in the fermentative H<sub>2</sub> production from an acidogenic granule-based reactor. **Chemosphere**. v. 64, p. 350-358, 2006.

NAKAGAWA, S., K. TAKAI, F. INAGAKI, K. HORIKOSHI, AND Y. SAKO, *Nitratiruptor tergarcus* gen. nov., sp. nov. and *Nitratifactor salsuginis* gen. nov., sp. nov., nitrate-reducing chemolithoautotrophs of the epsilon-Proteobacteria isolated from a deep-sea hydrothermal system in the Mid-Okinawa Trough. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** v.55, p.925–933, 2005.

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

NCBI - NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Disponível em: [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov). Acesso em: 06 de novembro de 2012.

NING, Y. Y., JIN, D. W., SHENG, G. P., HARADA, H., SHI, X. Y., Evaluation of the stability of hydrogen production and microbial diversity by anaerobic sludge with chloroform treatment. **Internacional. Journal Renewable Energy**, v.38, p. 253-257, 2012.

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

O'BRIEN, R.W.; MORRIS, J.G. Oxygen and the Growth and Metabolism of *Clostridium acetobutylicum*. **Journal of General Microbiology**, v. 68, p. 307-318, 1971.

ONNIS-HAYDEN, A.; GU, A.Z. Comparisons of organic sources for denitrification: biodegradability, denitrification rates, kinetic constants and practical implication for their application in WWTPs. **Water Environment Federation, WEFTEC**, v. 21, p. 253-273, 2008.

ORLYGSSON, J.; SIGURBJORNSDOTTIR, M.A.; BAKKEN, H.E. Bioprospecting thermophilic ethanol and hydrogen producing bacteria from hot springs in Iceland. **Icelandic Agricultural Sciences**, v.23, 73-85, 2010.

O-THONG, S.; PRASERTSAN, P.; INTRASUNGKHA, N.; DHAMWICHUKORN, S. Optimization of simultaneous thermophilic fermentative hydrogen production and COD reduction from palm oil mill effluent by *Thermoanaerobacterium*-rich sludge. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, p. 1221-1231, 2008.

O-THONG, S.; PRASERTSAN, P.; KARAKASHEV, D.; ANGELIDAKI, I. Thermophilic fermentative hydrogen production by the newly isolated *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* PSU-2. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, p. 1204-1214, 2008.

O-THONG; S.; PRASERTSAN, P.; BIRKELAND, N. Evaluation of methods for preparing hydrogen-producing seed inocula under thermophilic condition by process performance and microbial community analysis. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 909-918, 2009.

ÖZKAN, E.; UYAR, B.; ÖZGÜR, E.; YÜCEL, M.; EROGLU, I.; GÜNDÜZ, U. Photofermentative hydrogen production using dark fermentation effluent of sugar beet thick juice in outdoor conditions. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, p. 2044–2049, 2012.

OZMIHCI S, KARGI F, CAKIR A. Thermophilic dark fermentation of acid hydrolyzed waste ground wheat for hydrogen gas production. **Internacional Journal Hydrogen Energy**, v.36, p. 2111-2117, 2011.

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

PRAKASHAM, R.S.; BRAHMAIAH, P.; NAGAIAH, D.; SRINIVASA RAO, P.; REDDY, B.V.S.; SREENIVAS RAO, R.; HOBBS, P.J. Impact of low lignin containing brown midrib sorghum mutants to harness biohydrogen production using mixed anaerobic consortia. **Internacional Journal Hydrogen Energy**, v.37, p. 3186-3190, 2012.

REN, N.; CAO, G.; WANG, A.; LEE, D.; GUO, W.; ZHU, Y. Dark fermentation of xylose and glucose mix using isolated *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* W16. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, p. 6124-6132, 2008.

REN, N.; WANG, A.; CAO, G.; XU, J.; GAO L. Bioconversion of lignocellulosic biomass hydrogen: Potencial and challenges. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 1051–1060, 2009.

REN, N.; XING, D.; RITTMANN, B.E.; ZHAO, L.; XIE, T.; ZHAO, X. Microbial community structure of ethanol type fermentation in biohydrogen production. **Environmental Microbiology**, v. 5, p. 1112-1125, 2007.

RILLING N. IN: REHM H-J, REED G, in cooperation with Puhler A, Stadler P, **Biotechnology: environmental processes III**, v. 11c, 2000. p. 152154, 2000.

RODRIGUES, T.B. **Diversidade metagenômica microbiana de biomas terrestres e marinhos**. Tese de Doutorado. Instituto de Biologia, UFRJ, 2011.

SÁ, L. R. V.; OLIVEIRA, M. A. L.; CAMMAROTA, M. C.; MATOS, A.; LEITÃO, V. S. F. Simultaneous analysis of carbohydrates and volatile fatty acids by HPLC for monitoring fermentative biohydrogen production. **Internacional Journal Hydrogen Energy**, v.36, p. 15177-15186, 2011.

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

SANTOS, S.C. Produção de hidrogênio de reator anaeróbio de leito fluidificado termofílico com vinhaça como substrato orgânico. Tese de doutorado. São Carlos, 2014.

SANTOS, S. C.; ROSA, P. R. F.; SAKAMOTO, I. K.; VARESCHE, M. B. A.; SILVA, E. L. Continuous thermophilic hydrogen production and microbial community analysis from anaerobic digestion of diluted sugar cane stillage. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, p. 9000-9011, 2014.

SCHMIDELL, W. Agitação e aeração em biorreatores. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotechnologia industrial**, Vol. 2, Edgard Blücher Ltda., p. 277-331, 2001.

SHIDA, O.; TAKAGI, H.; KADOWAKI, K.; KOMAGATA, K. Proposal for two new genera, *Brevibacillus* gen. nov. and *Aneurinibacillus* gen. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v. 46, p. 939-946, 1996.

SINGH, S.; SARMA, P. M.; LAL, B. Biohydrogen production by *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* TERI S7 from oil

reservoir flow pipeline. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, p. 4206-4214, 2014.

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

SOGIN, M. L.; MORRISON, H. G.; HUBER, J.; MARK WELCH, D.; HUSE, S. M.; NEAL, P. R.; ARRIETA, J. M.; HERNDL, G. J. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere”. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 103, p. 12115–121120, 2006.

SONG, Z. X., DAI, Y., FAN, Q.L., LI, X.H., FAN, Y.T., HOU, H.W. Effects of pretreatment method of natural bacteria source on microbial community and bio-hydrogen production by dark fermentation. **Internacional Journal Hydrogen Energy**, p.1-6, 2012.

SOUZA, M. F. B. Separação e identificação dos constituintes do bagaço de cana e sua conversão em insumos químicos pelo processo organosolv. **Tese de mestrado, Instituto de Química – UNICAMP**, Campinas, 1984.

SPEECE, R.E. Anaerobic biotechnology for industrial wastewaters. **Vanderbilt University. United States of America**. 1995.

SPEECE, R.E; ENGELBRECHT R. S.; AUKAMP D. R. Cell replication and biomass in the activated sludge process. **Water Research**, v. 7, p. 361-374, 1973.

TANDISHABO, K.; NAKAMURA, K.; TAKAMIZAWA, K. Distribution and role of Coprothermobacter spp. in anaerobic digesters. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 114 (5), p. 518-520, 2012.

TELES, A., I., S. **Inativação Térmica de Bactérias Lácticas em Meio de Elevado Teor de Etanol**, Dissertação de mestrado. Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Lisboa, 2013.

TERRAZAS-HOYOS, H.; PORTUGAL-MARÍN, E.; SÁNCHEZ-SALINAS, E.; ORTIZ-HERNÁNDEZ, M. L. Evaluation of the potential hydrogen production by diazotrophic *Burkholderia* species. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, p. 3142-3151, 2014.

URAMOTO, K.; WALDER, J.J.M.; ZUCCHI, R.A. Análise quantitativa e distribuição de espécies de *Anastrepha* (Dipter:Tephritidae) no campus Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP>. *Notropical Entomology*, v, 34, p. 33-39, 2005.

VAISHAMPAYAN, P.; MIYASHITA, M.; OHNISHI, A.; SATOMI, M.; ROONEY, A.; LA DUC, M. T.; VENKATESWARAN, K. Description of *Rummeliibacillus stabekisii* gen. nov., sp. nov. and reclassification of *Bacillus pycnus* Nakamura et al. 2002 as *Rummeliibacillus pycnus* comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 59, p. 1094-1099, 2009.

VALDEZ-VAZQUEZ, I.; POGGI-VARALDO, H.M. Hydrogen production by fermentative consortia. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 13, p. 1000-1013, 2009.

VALDEZ-VAZQUEZ, I.; RÍOS-LEAL, E.; CARMONA-MARTÍNEZ, A.; MUÑOZ-PÁEZ, K.M.; POGGI-VARALDO, H.M. Improvement of biohydrogen production from solid wastes by intermittent venting and gas flushing of batch reactors headspace. **Environmental Science Technology**, v. 40, p. 3409–3415, 2006.

VALDEZ-VAZQUEZ, I.; RÍOS-LEAL, E.; ESPARZA-GARCIA, F.; CECCHI, F.; POGGI-VARALDO, H.M. Semi-continuous solid substrate anaerobic reactors for H<sub>2</sub> production from organic waste:

mesophilic versus thermophilic regime. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 30, p. 1383-1391, 2005.

VALENTINE, D.L. Biogeochemistry and microbial ecology of methane oxidation in anoxic environments: a review. **Journal Antonie van Leeuwenhoek**, v. 81, p. 271–282, 2002.

VAN HAANDEL, A. C., LETTINGA, G. **Tratamento Anaeróbico de Esgotos: Um Manual para Regiões de Clima Quente**. Campina Grande, p.240, 1994.

VAN HOUTEN, R.T.; HULSHOFF POL, L.W.; LETTINGA, G. Biological sulphate reduction using gas-lift reactors fed with hydrogen and carbon dioxide as energy and carbon source. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 44, p. 586–594, 1994.

VAZOLLER, R.F. **Microbiologia de processos biológicos de tratamento**. IV Curso de Tratamento Biológico de Resíduos. Florianópolis. 1999.

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

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

WEILAND, U. Strategic Environmental Assessment in Germany — Practice and open questions. **Environmental Impact Assessment Review**, v. 30, p. 211–217, 2010.

XING, D.; REN, N.; RITTMANN, B.E. Genetic diversity of hydrogen-producing bacteria in an acidophilic ethanol-H<sub>2</sub>-coproducing system,

analyzed using the [Fe]-hydrogenase gene. Apply Environmental Microbiology, v. 4, p. 1232-1239, 2008.

XU, J.F.; REN, N.Q.; WANG, A.J.; QIU, J.; ZHAO, Q.L.; FENG, Y.J.; LIU, B.F. Cell growth and hydrogen production on the mixture of xylose and glucose using a novel strain of *Clostridium* sp. HR-1 isolated from cow dung compost. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, p. 13467–13474, 2010.

YANG, S.S.; GUO, W.Q.; MENG,Z.H.; ZHOU, X.J.; FENG, X.C.; ZHENG, H.S.; LIU, B.; REN, N.Q.; CUI, Y.S. Characterizing the fluorescent products of waste activated sludge in dissolved organic matter following ultrasound assisted ozone pretreatments. **Bioresource Technology**, in press: [dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.024](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.024), 2013.

YIN, Yanan; HU, Jun; WANG, Jianlong. Enriching hydrogen-producing bacteria from digested sludge by different pretreatment methods. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39 (25), p.13550-13556, 2014.

YU, H.; ZHU, Z.; HU, W.; ZHANG, H. Hydrogen production from rice winery wastewater in an upflow anaerobic reactor by using mixed anaerobic cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**. v. 27, p. 1359-1365, 2002

ZHANG, K.; REN, N.; WANG, A.. Enhanced biohydrogen production from corn stover hydrolyzate by pretreatment of two typical seed sludges. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, p. 14653-14662, 2014.

ZHANG, Y.; SHEN, J. Effect of temperature and iron concentration on the growth and hydrogen production of mixed bacteria. **International Journal of Hydrogen Energy**. v. 31, p. 441-446, 2005.



## APÊNDICE

### Trabalhos publicados

SCRIDELLI A., LAMAISON F. C., REGINATTO V., MORAES L. A. B., ANTÔNIO R. V. Acompanhamento *on line* da produção de biohidrogênio por cultura mista pela técnica MIMS (*Membrane Introduction Mass Spectrometry*). 34<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, de 23 a 26 de maio de 2011 em Florianópolis-SC.

LAMAISON F. C., SCRIDELLI A., MORAES L. A. B., ANTÔNIO R. V., REGINATTO V. Comparação de meios de cultura para a produção de biohidrogênio utilizando a técnica *Membrane Introduction Mass Spectrometry* – MIMS. XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos de 24 a 27 de julho de 2011 em Caxias do Sul-RS.

HIGINO, J.O., LAMAISON F.C., REGINATTO, V. Produção de Biohidrogênio por via biológica a partir de água residuária. XXXV Semana da Química de 19 a 23 de setembro de 2011 em Ribeirão Preto-SP.

LAMAISON F. C., ANTÔNIO R. V., REGINATTO V. Efeitos de diferentes pré-tratamentos sobre um lodo anaeróbio para produção de biohidrogênio. VII Congresso Internacional de Bioenergia a ser realizado entre os dias 30 de outubro a 01 de novembro de 2012 em São Paulo/SP.

LAMAISON F. C., FONTES M. L., ANTÔNIO R. V., REGINATTO V. Biohydrogen production by a bacterial mixed culture with controlled initial substrate/microorganism (So/Xo) ratio. III Congresso Latinoamericano sobre Bio-Refinarias a ser realizado entre os 19 e 21 de novembro de 2012 em Pucón/Chile.

HIGINO, J.O., LAMAISON F.C., REGINATTO, V. Efeito do pré-tratamento térmico sobre um lodo anaeróbio e do pH na produção de biohidrogênio. SIICUSP: Simpósio Internacional de Iniciação Científica de 22 a 26 de outubro de **2012 em São Paulo-SP**.

LAMAISON, F.C., LOSS, R.A., FONTES, M.A., ANTÔNIO, R.V., REGINATTO, V. Efeito da relação substrato/microrganismo sobre um cultura mista produtora de biohidrogênio. 27 Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2013.

LAMAISON, F. C. ; FRAGATA, R ; ANTONIO, R.V. ; AMANTE E. R. ; REGINATTO, V. Comparison between heat and sludge washout as inoculums pretreatment methods for enhancing biohydrogen production from cassava processing wastewater. Acta Scientiarum, 2014.