

Avaliação de diferentes pré-tratamentos do inóculo para produção de H₂ por bactérias anaeróbias

L. R. V. de Sá*, T. C. de Oliveira**, A. Matos***, E. M. M. Oliveira**, M. C. Cammarota**** e V. S. Ferreira-Leitão*

* Instituto Nacional de Tecnologia, Laboratório de Biocatálise, CEP 20081-312, Rio de Janeiro, RJ, Brasil
(E-mail: livian.sa@int.gov.br; viridiana.leitao@int.gov.br)

** EMBRAPA Agroindústria de Alimentos, Laboratório de Diagnóstico Molecular, CEP 23020-470, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

(E-mail: correa@ctaa.embrapa.br; edna@ctaa.embrapa.br)

*** EMBRAPA Solos, Laboratório de Águas, Solos e Plantas, CEP 22460-000, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

(E-mail: andreams@cnps.embrapa.br)

**** Universidade Federal do Rio de Janeiro, Departamento de Engenharia Bioquímica, CEP 21941-909, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

(E-mail: christe@eq.ufrj.br)

Resumo

A produção de biohidrogênio através do processo de fermentação anaeróbia tem recebido grande destaque nos últimos tempos. O enriquecimento do inóculo através de pré-tratamento elimina e/ou inibi micro-organismos consumidores de H₂ não formadores de esporo e favorece a seleção de micro-organismos produtores de H₂, dentre os quais se destacam os micro-organismos do gênero *Clostridium*. Os efeitos dos diferentes pré-tratamentos do inóculo (ácido, alcalino e térmico) sobre o desempenho das comunidades bacterianas responsáveis pela produção de H₂ foram avaliados através dos níveis de expressão das hidrogenases de *Clostridium* associados aos rendimentos máximos de H₂ obtidos. O pré-tratamento térmico apresentou o maior rendimento de H₂ (4,62 mol de H₂/mol de sacarose) e o maior nível de expressão das hidrogenases, 64 vezes superior ao do inóculo *in natura*, em 72 h de fermentação. Elevados rendimentos de H₂ também foram obtidos pelos inóculos com pré-tratamento alcalino (3,93 mol de H₂/mol de sacarose) e ácido (3,85 mol de H₂/mol de sacarose) em diferentes tempos, 48 e 120 h, respectivamente. A razão dos ácidos acético e butírico (HAc/HBu) auxiliou na avaliação do desempenho das comunidades bacterianas produtoras de H₂.

Palavras-chave

Fermentação anaeróbia, biohidrogênio, pré-tratamento, ácidos orgânicos voláteis, *Clostridium*, hidrogenases

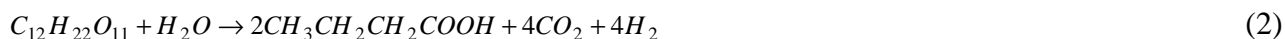
INTRODUÇÃO

O aumento das necessidades energéticas mundiais, a diminuição das reservas de combustíveis fósseis e os problemas ambientais relacionados ao uso contínuo destes combustíveis, têm estimulado o desenvolvimento de pesquisas baseadas em combustíveis alternativos. Dentro deste contexto, o hidrogênio (H₂) vem ganhando grande destaque, visto que a sua combustão direta produz uma quantidade significativa de energia e libera apenas H₂O ($H_2 + 1/2O_2 \rightarrow H_2O$) (Mathews e Wang, 2009). Além disso, o hidrogênio apresenta uma elevada densidade energética (da ordem de 143 KJ.g⁻¹), sendo aproximadamente três vezes superior quando comparada aos combustíveis à base de hidrocarbonetos pesados e pode ser utilizado diretamente como combustível em motores de combustão ou em células a combustível (Das e Veziroglu, 2008).

Os processos biológicos para a produção de H₂ têm despertado grande interesse, devido à possibilidade de utilização de fontes renováveis de energia, bem como o reaproveitamento de materiais residuais, diminuindo assim a quantidade de subprodutos gerados nas indústrias. Além disso, estes processos são geralmente operados à temperatura e pressão ambientes, levando assim a um menor consumo de energia e a balanços energéticos favoráveis (Das e Veziroglu, 2001).

O hidrogênio biológico, também conhecido como biohidrogênio, pode ser produzido através dos seguintes processos: biofotólise direta da água, biofotólise indireta da água, foto-fermentação, fermentação anaeróbia e através de sistemas híbridos (Kirtay, 2011). Dentre estes sistemas, a produção de hidrogênio por fermentação anaeróbia tem se destacado, devido principalmente à maior produção de H₂ quando comparada aos outros processos biológicos e à possibilidade de utilização de diferentes materiais residuais como substrato (Mathews e Wang, 2009).

Durante a fermentação anaeróbia, substratos ricos em matéria orgânica são convertidos em compostos mais simples, tais como ácidos orgânicos voláteis, H₂ e CO₂. A identificação dos ácidos orgânicos voláteis formados durante o processo de fermentação anaeróbia revela informações importantes sobre o caminho metabólico seguido pelos micro-organismos. Além disso, a maior produção teórica de H₂ pode ser associada com a formação de ácido acético como produto da fermentação, visto que neste caso, é possível obter até 8 mol de H₂ por mol de sacarose consumida (reação 1). O mesmo não acontece quando o ácido butírico é obtido como produto, já que o rendimento teórico máximo diminui para até 2 mol de H₂ por mol de sacarose consumida (reação 2). No entanto, na prática, elevados rendimentos de H₂ são obtidos quando se observa a produção da mistura dos ácidos acético e butírico como produtos da fermentação anaeróbia (Levin *et al.*, 2004). Além disso, estudos prévios mostram que a razão entre o ácido acético (HAc) e o ácido butírico (HBu) pode ser relacionada à produção de H₂, visto que um aumento da razão HAc/HBu é acompanhada por um aumento da produção de H₂ (De Sá *et al.*, 2011).



Estudos na literatura mostram que micro-organismos do gênero *Clostridium* são os principais responsáveis pela produção de H₂ no processo de fermentação anaeróbia (Skonieczny e Yargeu, 2009). Estes micro-organismos dispõem de enzimas hidrogenases que catalisam a reação reversível de oxidação do hidrogênio ($2H^+ + 2e^- \leftrightarrow H_2$) (Das *et al.*, 2006). As [FeFe]-hidrogenases normalmente ocorrem em micro-organismos produtores de H₂, como os micro-organismos do gênero *Clostridium*; enquanto as [NiFe] e [NiFeSe]-hidrogenases são frequentemente encontradas em micro-organismos consumidores de H₂, como as arqueias metanogênicas (Das *et al.*, 2006). Recentemente o nível de expressão das hidrogenases tem sido utilizado como indicador da produção de H₂ em diferentes sistemas (Chang *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008).

Na tentativa de inibir as arqueias metanogênicas e maximizar a produção de H₂, vários tipos de pré-tratamento do inóculo têm sido estudados, tais como os pré-tratamentos físicos (térmico, aeração, congelamento/descongelamento) e os químicos (ácido, alcalino, adição de compostos químicos). O pré-tratamento do inóculo possui a finalidade de inibir e/ou eliminar os micro-organismos consumidores de H₂, bem como selecionar os micro-organismos produtores de H₂. O pré-tratamento ótimo para cada sistema vai depender de inúmeros fatores dentre os quais se destacam o tipo e origem do inóculo, o tipo de substrato e as condições empregadas durante o pré-tratamento e durante o processo fermentativo (Ren *et al.*, 2008).

Deste modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes tipos de pré-tratamentos do inóculo na produção de H₂. A razão entre o ácido acético e o ácido butírico (HAc/HBu) e o nível de expressão das hidrogenases funcionaram como importantes ferramentas na avaliação do desempenho das comunidades bacterianas produtoras de H₂.

MATERIAIS E MÉTODOS

Inóculo

Utilizou-se como inóculo, lodo anaeróbio oriundo de Estação de Tratamento de Esgoto Municipal localizada no Rio de Janeiro, Brasil. O teor de sólidos suspensos voláteis (SSV) do inóculo foi obtido de acordo com normas recomendadas por métodos oficiais (Standard Methods, 1998).

Pré-tratamento do inóculo

Neste trabalho foram avaliados três tipos de pré-tratamento do inóculo: térmico (o inóculo foi aquecido a 100°C durante 60 minutos), alcalino (o pH do inóculo foi ajustado para 12 com NaOH 5 mol.L⁻¹, sendo mantido durante 60 minutos, após este tempo o pH foi ajustado a 7 com HCl 10 mol.L⁻¹) e ácido (o pH do inóculo foi ajustado para 2 com HCl 10 mol.L⁻¹, sendo mantido durante 60 minutos, após este tempo o pH foi ajustado a 7 com NaOH 5 mol.L⁻¹).

Meio reacional

Os experimentos foram conduzidos em frascos tipo penicilina de volume de 100 mL. O meio reacional foi composto de 52 mL do inóculo *in natura* ou pré-tratado (térmico, ácido ou alcalino), 36,5 mL do substrato sintético (solução de sacarose 10 g.L⁻¹) e 1,5 mL de uma solução de nutrientes. A solução de nutrientes foi preparada a partir de duas soluções (mg.L⁻¹): solução 1 (KH₂PO₄ 2500, K₂HPO₄ 2500 e NH₄Cl 20000) e solução 2 (FeCl₃ 2000, ZnCl₂ 50, CuCl₂.2H₂O 30, MnCl₂. 4H₂O 500, (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O 50, AlCl₃ 50, CoCl₂.6H₂O 2000, HCl concentrado 1 mL). No momento da utilização da solução de nutrientes, 10 mL da solução 2 foram adicionados à 1000 mL da solução 1, perfazendo uma solução única que foi adicionada ao frasco reacional. O pH do meio reacional foi ajustado para 5,5 ± 0,1 com HCl 10 mol.L⁻¹. Para manutenção das condições de anaerobiose, os reatores anaeróbios foram purgados com nitrogênio por 60 segundos cada e então vedados. Os reatores foram incubados em shaker a 35°C e a 100 rpm de agitação. Os ensaios tiveram duração de 120 horas, com amostragens do meio fermentativo e do biogás produzido realizadas após 24, 48, 72 e 120 h de fermentação. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Análises cromatográficas

As análises dos carboidratos (sacarose, glicose e frutose) e dos ácidos orgânicos voláteis (ácidos acético, propiônico, isobutírico e butírico), presentes no meio fermentativo, foram realizadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE – Shimadzu LC-10AT), empregando metodologia desenvolvida para o presente trabalho (De Sá, 2011). A análise dos componentes do biogás (H₂, CH₄ e CO₂) foi realizada por Cromatografia Gasosa (CG – Agilent CG6890) (De Sá, 2011).

Análises microbiológicas

Extração de DNA e RNA

O DNA genômico do pool bacteriano foi extraído e purificado usando o *Kit DNeasy Blood & Tissue* (Qiagen Sciences, USA). O RNA total do pool bacteriano foi extraído usando o *Kit RNeasy Plant Mini* (Qiagen Sciences, USA). Os procedimentos de ambas as extrações foram realizados de acordo com as instruções dos respectivos kits.

Reação em cadeia de polimerase (PCR)

A análise qualitativa do DNA extraído do pool bacteriano foi realizada através da técnica de PCR empregando-se *primers* específicos para o gene 16S rRNA de *Clostridium* sp. (16S-f: AGCGTTGTCCGGATTACTG e 16S-r: TTCGCCACTGGTATTCTTCC) e para o gene hidrogenase de *Clostridium* sp. (HG-f: AAGAAGCTTTAGAAGATCCTAA e HG-r: GGACAACATGAGGTAACATTG) (De Sá, 2011).

RT-PCR em tempo real

A análise do nível de expressão do gene hidrogenase foi realizada utilizando a RT-PCR em tempo real em dois estágios: a síntese do cDNA seguida da PCR em tempo real (De Sá, 2011).

Contagem de bactérias anaeróbias

A contagem das bactérias anaeróbias do meio fermentativo foi baseada na técnica dos tubos múltiplos para determinação do número mais provável (NMP), empregando-se meio específico (Standard Methods, 1998).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A sacarose, utilizada como substrato para as bactérias fermentativas, foi consumida ao longo de 120 h de fermentação pelos micro-organismos presentes nos inóculos *in natura* e pré-tratados (ácido, alcalino e térmico). A Figura 1 apresenta a cinética de consumo da sacarose no meio fermentativo. O inóculo *in natura* apresentou uma maior velocidade de consumo da sacarose quando comparado aos inóculos pré-tratados, o que pode estar associado ao fato do inóculo *in natura* não passar por nenhum tipo de pré-tratamento para seleção de micro-organismos, o que lhe confere uma maior população microbiana. O inóculo com pré-tratamento ácido apresentou um perfil cinético de consumo da sacarose similar ao do inóculo *in natura*. Possivelmente, há um menor impacto deste tipo de pré-tratamento frente às bactérias fermentativas, pois estas já são habituadas a ambientes ácidos no processo natural de fermentação anaeróbia, devido à etapa de acidogênese. O inóculo pré-tratado termicamente apresentou uma menor velocidade de consumo da sacarose quando comparado aos outros dois inóculos pré-tratados; o que pode estar relacionado ao maior impacto do choque térmico frente a alterações no pH do meio fermentativo. Estes resultados podem ser confirmados pela contagem de bactérias anaeróbias no meio fermentativo: inóculo *in natura* ($> 2,4 \times 10^{10}$ NMP.mL⁻¹), inóculo com pré-tratamento térmico ($2,3 \times 10^4$ NMP.mL⁻¹), inóculo com pré-tratamento alcalino ($4,3 \times 10^7$ NMP.mL⁻¹) e inóculo com pré-tratamento ácido ($> 2,4 \times 10^{10}$ NMP.mL⁻¹).

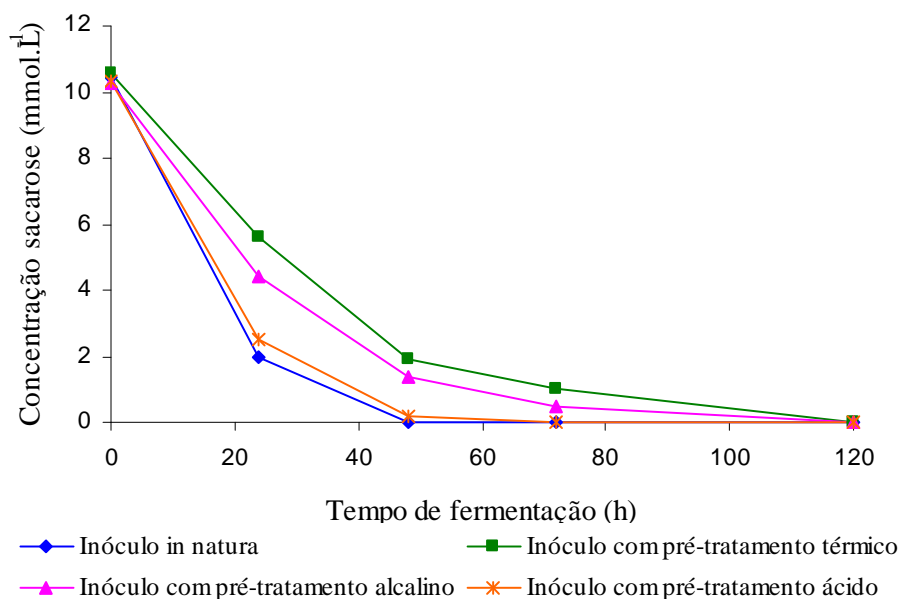


Figura 1: Cinética de consumo da sacarose no meio fermentativo, ao longo de 72 h de fermentação, a partir de diferentes inóculos.

Na avaliação dos metabólitos produzidos durante o processo fermentativo foi possível observar apenas a formação dos ácidos acético e butírico, sugerindo deste modo a fermentação do tipo butírica para todos os inóculos utilizados (*in natura* e pré-tratados). A Tabela 1 apresenta os rendimentos máximos de H₂ e as razões HAC/HBu obtidas no processo fermentativo. É possível observar uma correlação entre as razões HAC/HBu do inóculo *in natura* e as razões HAC/HBu dos inóculos pré-tratados com os respectivos rendimentos de H₂. Os inóculos com pré-tratamento térmico e alcalino apresentam valores de HAC/HBu sempre maiores que os valores de HAC/HBu do inóculo *in natura*, ao longo das 120 h de fermentação. Os valores de HAC/HBu para o inóculo com pré-tratamento ácido em 24 e 48 h são similares aos valores de HAC/HBu do inóculo *in natura*, e

nos tempos de 72 e 120 h os valores são superiores. Comportamentos similares são observados na análise dos rendimentos máximos de H₂.

Tabela 1: Concentração dos metabólitos formados durante 120 h de fermentação utilizando inóculo *in natura* e inóculos pré-tratados (térmico, alcalino e ácido).

Tempo de fermentação (h)	Inóculo <i>In natura</i>				Inóculo com pré-tratamento térmico			
	HAc*	HBu*	HAc/HBu*	H ₂ **	HAc*	HBu*	HAc/HBu*	H ₂ **
24	10,29	9,91	1,04	3,04	16,82	10,31	1,63	3,65
48	10,95	13,40	0,82	3,65	17,48	13,66	1,28	4,22
72	7,14	10,05	0,71	2,30	16,05	14,08	1,14	4,62
120	9,86	10,98	0,90	0,87	13,06	13,96	0,94	1,27

Tempo de fermentação (h)	Inóculo com pré-tratamento alcalino				Inóculo com pré-tratamento ácido			
	HAc*	HBu*	HAc/HBu*	H ₂ **	HAc*	HBu*	HAc/HBu*	H ₂ **
24	16,28	9,38	1,74	3,19	8,02	7,36	1,09	3,05
48	19,03	9,67	1,97	3,93	10,97	13,74	0,80	3,54
72	20,51	11,26	1,82	3,78	13,65	15,81	0,86	2,79
120	16,76	15,08	1,11	2,42	8,99	8,44	1,06	3,85

*Concentração = mmol.L⁻¹; **Rendimento máximo de H₂ = mol de H₂/mol de sacarose

Como pode ser observado na Tabela 1, no tempo de 24 h, não é possível observar diferenças significativas com relação à produção de H₂ pelos inóculos *in natura* e pré-tratados. Todos eles apresentaram perfis similares de aumento de produção de H₂ de 24 a 48 h de fermentação. A partir de 48 h, diferentes comportamentos são observados. O inóculo *in natura* e o inóculo com pré-tratamento alcalino apresentam seus maiores rendimentos em 48 h, 3,65 e 3,93 mol de H₂/mol de sacarose, respectivamente. O inóculo com pré-tratamento ácido apresenta uma queda de 20% na produção de H₂ em 72 h, e um aumento de aproximadamente 30% em 120 h. Este tipo de pré-tratamento talvez seja interessante para processos contínuos, abrindo possibilidades para estudos posteriores. O inóculo pré-tratado termicamente apresenta os maiores rendimentos de produção de H₂ ao longo de 95 h de fermentação, sendo o rendimento máximo (4,62 mol de H₂/mol de sacarose) obtido no tempo de 72 h. Neste tempo, o inóculo pré-tratado termicamente apresenta rendimento de H₂ 46% superior ao observado no inóculo *in natura* no tempo de 48 h. Deste modo, dentro das condições estudadas, o pré-tratamento térmico do inóculo, apresentou-se como o mais promissor na produção de H₂.

Estudos prévios mostram que micro-organismos do gênero *Clostridium* são capazes de esporular quando em condições hostis resistindo deste modo aos diversos tipos de pré-tratamento do inóculo (Chong *et al.*, 2009). O desempenho deste tipo de micro-organismo no sistema fermentativo para produção de H₂ está relacionado ao gene hidrogenase (Baghchehsaraee *et al.*, 2008; Hafez *et al.*, 2010). Dentro deste contexto, um estudo preliminar de biologia molecular através de PCR com primers para detecção do gene 16S rRNA e gene hidrogenase de *Clostridium* foi realizado. A amplificação dos produtos para o gene 16S rRNA (Figura 2A) e para o gene hidrogenase (Figura 2B) mostram qualitativamente a presença de micro-organismos do gênero *Clostridium* e a presença de hidrogenases de *Clostridium* para todas as condições estudadas (inóculo *in natura* e inóculos pré-tratados) após 72 h de fermentação, respectivamente.

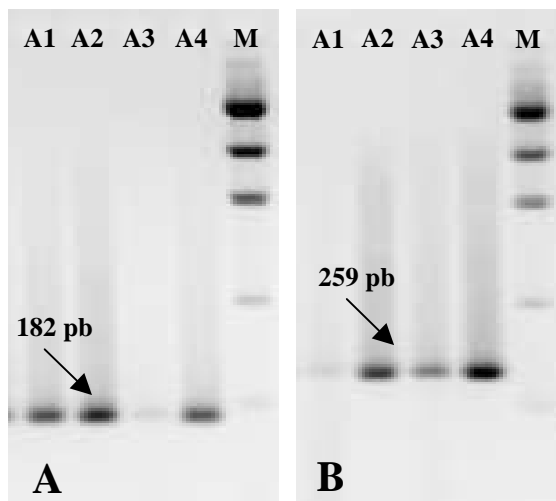


Figura 2: Produtos de PCR para as ampliações dos genes: (A) *Clostridium* sp. 16S rRNA e (B) hidrogenase de *Clostridium* sp.. M = marcador *Low DNA Mass Ladder*; A1 = inóculo *in natura* após 72 h de fermentação; A2 = inóculo com pré-tratamento ácido após 72 h de fermentação; A3 = inóculo com pré-tratamento alcalino após 72 h de fermentação e A4 = inóculo com pré-tratamento térmico após 72 h de fermentação.

Baseado nos resultados obtidos, um estudo subsequente utilizando RT-PCR em tempo real foi realizado, para se determinar o nível de expressão do gene hidrogenase (*hyd*) nas amostras após 72 h de fermentação em todas as condições estudadas (inóculo *in natura* e inóculos pré-tratados). Os dados quantitativos obtidos por RT-PCR em tempo real são apresentados na Figura 3. Todas as amostras dos inóculos pré-tratados após 72 h de fermentação (A2, A3 e A4) apresentaram acentuados níveis de expressão do gene hidrogenase quando comparadas ao inóculo *in natura*. O inóculo pré-tratado termicamente (A4) apresentou o maior nível de expressão, aproximadamente 64 vezes maior que o inóculo *in natura* (A1). Menores níveis de expressão foram observados para o inóculo com pré-tratamento ácido e para o inóculo com pré-tratamento alcalino, 15 e 49 vezes maior que o inóculo *in natura*, respectivamente. Comportamentos semelhantes foram verificados com relação aos rendimentos máximos de H₂ obtidos: térmico (4,62 mol de H₂/mol de sacarose) > alcalino (3,78 mol de H₂/mol de sacarose) > ácido (2,79 mol de H₂/mol de sacarose) > *in natura* (2,30 mol de H₂/mol de sacarose). Estes resultados demonstram a eficiência dos pré-tratamentos efetuados para a seleção de micro-organismos produtores de H₂ e corroboram a relação direta entre a expressão do gene hidrogenase e a produção de H₂. A Tabela 2 apresenta alguns estudos sobre a avaliação de diferentes métodos de pré-tratamento do inóculo para produção de H₂.

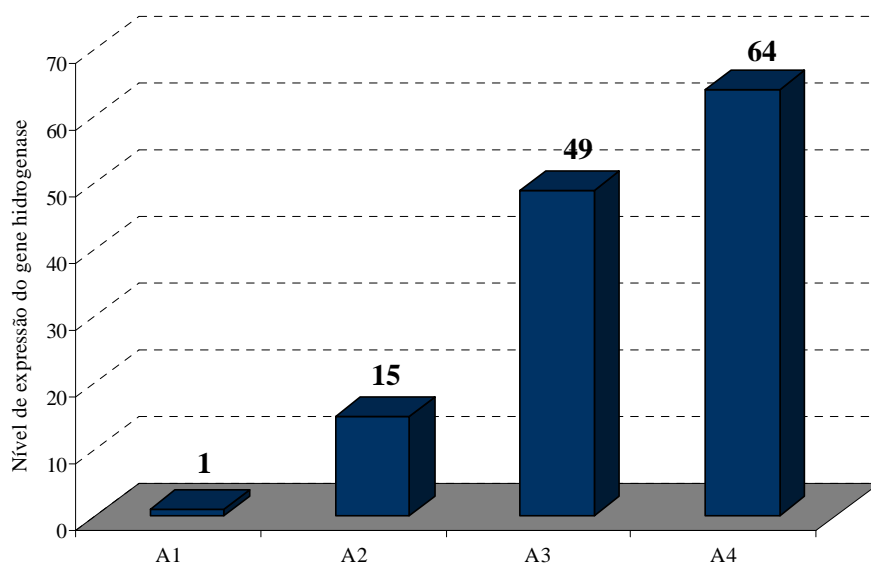


Figura 3: Nível de expressão do gene hidrogenase. A1 = inóculo *in natura* após 72 h de fermentação; A2 = inóculo com pré-tratamento ácido após 72 h de fermentação; A3 = inóculo com pré-tratamento alcalino após 72 h de fermentação e A4 = inóculo com pré-tratamento térmico após 72 h de fermentação.

Tabela 2: Estudos de métodos de pré-tratamento de inóculo para produção de H₂ via fermentação anaeróbia.

Inóculo	Substrato	Modo reator	pH	Temperatura (°C)	Tempo de fermentação (h)	Pré-tratamentos testados	Pré-tratamento ótimo	Rendimento máximo de H ₂	Referências
Lodo de planta de tratamento de águas residuais municipais	Glicose	Batelada	-	35	50	Térmico, ácido, alcalino e aeração	Aeração	1,96 mol de H ₂ /mol de glicose	REN <i>et al.</i> , 2008
Lodo de digestor anaeróbio de tratamento de esgoto	Glicose	Batelada	pH inicial 7	35	36	Térmico, ácido, alcalino, químico, adição de clorofórmio e aeração	Térmico	1,78 mol de H ₂ /mol de glicose	WANG E WAN, 2008
Lodo anaeróbio de reator de produção de biogás de fábrica de óleo de palma	Sacarose	Batelada	pH inicial 5,5	60	-	Alcalino, ácido, adição de BESA*, choque de carga e térmico	Choque de carga	1,96 mol de H ₂ /mol de hexose	O-THONG <i>et al.</i> , 2009
Lodo anaeróbio de reator de tratamento de efluente de processamento de soja	Sacarose	Batelada	pH controlado em 5,5	35	60	Térmico, alcalino e ácido	Térmico	4 mol de H ₂ /mol de sacarose	MU <i>et al.</i> , 2007
Lodo de digestor anaeróbio de tratamento de esgoto	Sacarose	Batelada	-	35	1ª batelada: 120 2ª batelada: 120	Térmico, aeração, ácido, alcalino, adição de iodopropano e adição de BESA*	Alcalino	6,12 mol de H ₂ /mol de sacarose	ZHU E BÉLAND, 2006
Lodo anaeróbio de estação de tratamento de esgoto	Sacarose	Batelada	pH inicial 5,5	35	120	Térmico, alcalino e ácido	Térmico	4,62 mol de H₂/mol de sacarose	NESTE TRABALHO

CONCLUSÕES

Todos os pré-tratamentos testados (ácido, alcalino e térmico) foram eficientes na seleção de microorganismos produtores de H₂ visto a maior produção de H₂ dos inóculos pré-tratados quando comparados ao inóculo *in natura*. O pré-tratamento térmico foi o mais promissor, devido ao maior rendimento obtido no tempo de 72 h, 4,62 mol de H₂/mol de sacarose, frente aos outros pré-tratamentos testados. O elevado nível de expressão do gene hidrogenase no inóculo pré-tratado termicamente, corrobora a relação direta entre a expressão do gene hidrogenase e a produção de H₂.

AGRADECIMENTOS



REFERÊNCIAS

- Baghchehsaraee B., Nakhla G., Karamanev D., Margaritis A., Reid G. (2008) The effect of heat pretreatment temperature on fermentative hydrogen production using mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 4064-4073;
- Chang J-J., Wu J-H., Wen F-S., Hung K-Y., Chen Y-T., Hsiao C-L., Lin C-Y., Huang C-C. (2008) Molecular monitoring of microbes in a continuous hydrogen-producing system with different hydraulic retention time. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 1579-1585;
- Chong M-L., Sabaratnam V., Shirai Y., Hassan A. (2009) Biohydrogen production from biomass and industrial wastes by dark fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34, 3277-3287;
- Das D., Dutta T., Nath K., Kotay S. M., Das A. K., Veziroglu T. N. (2006) Role of Fe hydrogenase in biological hydrogen production. *Current Science*, 90, 1627-1637;
- Das D., Veziroglu T. N. (2008) Advances in biological hydrogen production processes. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 6046-6057;
- Das D., Veziroglu T. N. (2001) Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. *International Journal of Hydrogen Energy*, 26, 13-28;
- De Sá L. R. V., Oliveira T. C., Santos T. F., Matos A., Cammarota M. C., Oliveira E. M. M., Ferreira-Leitão V. S. (2011) Hydrogenase activity monitoring in the fermentative hydrogen production using heat pretreated sludge: a useful approach to evaluate bacterial communities performance. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36, 7543-7549;
- De Sá L. R. V. (2011) Produção Biológica de Hidrogênio por Bactérias Fermentativas Utilizando Diferentes Carboidratos ou Glicerina Como Substrato. MSc thesis, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil;
- Hafez H., Nakla G., Naggat M.H.E., Elbeshbishy E. (2010) Effect of organic loading on a novel hydrogen bioreactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35, 81-92;
- Kirtay E. (2011) Recent advances in production of hydrogen from biomass. *Energy Conversion and Management*, 52, 1778-1789;
- Levin D. B., Pitt L., Love M. (2004) Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29, 173-185;
- Mathews J., Wang G. (2009) Metabolic pathway engineering for enhanced biohydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34, 7404-7416;
- Mu Y., Yu H-Q., Wang G. (2007) Evaluation of three methods for enriching H₂-producing cultures from anaerobic sludge. *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 947-953;
- O-Thong S., Prasertan P., Karakashev D., Angelidaki I. (2008) Thermophilic fermentative hydrogen production by the newly isolated *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* PSU-2. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 1204-1214;
- Ren N-Q., Guo W-Q., Wang X-J., Xiang W-S., Liu B-F., Wang X-Z., Ding J., Chen Z-B. (2008) Effects of different pretreatments methods on fermentation types and dominant bacteria for hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 4318-4324;
- Skonieczny M. T., Yargeu V. (2009) Biohydrogen production from wastewater by *Clostridium beijerinckii*: effect of pH and substrate concentration. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34, 3288-3294;
- Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (1998). 20th edn, American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington DC, USA;
- Wang M-Y., Olson B-H., Chang J-S. (2008) Relationship among growth parameters for *Clostridium butyricum*, *hydA* gene expression, and biohydrogen production in a sucrose-supplemented batch reactor. *Applied Microbiology Biotechnology*, 78, 525-532, 2008.
- Wang J. L., Wan W. (2008) Comparison of different pretreatment methods for enriching hydrogen-producing cultures from digested sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 2934-2941;
- Zhu H.G., Béland M. (2006) Evaluation of alternative methods of preparing hydrogen producing seeds from digested wastewater sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31, 1980-1988;