



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS

QUEZIA MAIA VIANA

**DIVERSIDADE MICROBIOLÓGICA E RENDIMENTO DA PRODUÇÃO
FERMENTATIVA DE HIDROGÊNIO A PARTIR DE GLICEROL**

FORTALEZA – CE

2013

QUEZIA MAIA VIANA

**DIVERSIDADE MICROBIOLÓGICA E RENDIMENTO DA PRODUÇÃO
FERMENTATIVA DE HIDROGÊNIO A PARTIR DE GLICEROL**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ecologia e Recursos Naturais.

Área de Concentração: Conservação e Manejo de Recursos Naturais

Orientadora: Dra. Sandra Tédde Santaella

Co-orientador: Dr. Renato Carrhá Leitão

FORTALEZA - CE

2013

QUEZIA MAIA VIANA

**DIVERSIDADE MICROBIOLÓGICA E RENDIMENTO DA PRODUÇÃO
FERMENTATIVA DE HIDROGÊNIO A PARTIR DE GLICEROL.**

Dissertação de Mestrado submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ecologia e Recursos Naturais Área de concentração Conservação e Manejo de Recursos Naturais.

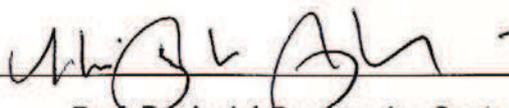
Aprovado em 04 / 06 / 2013.

BANCA EXAMINADORA



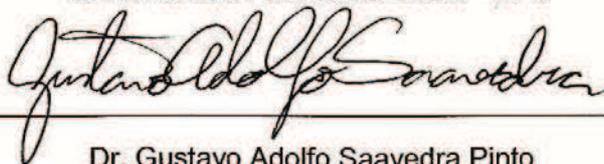
Prof.a. Dra. Sandra Tédde Santaella (Orientadora)

Universidade Federal do Ceará – UFC



Prof. Dr. André Bezerra dos Santos

Universidade Federal do Ceará - UFC



Dr. Gustavo Adolfo Saavedra Pinto

Embrapa Agroindústria Tropical

AGRADECIMENTOS

Quanta alegria em encerrar mais uma etapa da minha vida que me proporcionou tanto aprendizado e me mostrou o melhor de mim. Todo o esforço valeu à pena. É muito gratificante ver um trabalho realizado e encerrado após tanto empenho. Todos sabem que muitas vezes é necessário abrir mão de certas coisas para se dedicar à escrita, aos experimentos, enfim, à pesquisa. Mas todo o esforço é recompensador!

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida e a graça de me proporcionar experiências maravilhosas como esta. Sem Ele, nada sou, nada tenho.

Agradecer, também, ao apoio da minha família, ao amor e compreensão da minha mãe, Celeste e minha irmã, Queren, que estiveram comigo todos os momentos me dando suporte emocional durante todo o mestrado. Às minhas tias (Ana e Socorrinha), verdadeiras mães, sempre me incentivando a crescer intelectualmente e realizadas com meu sucesso. À minha amada tia Teté, não mais presente fisicamente, mas orgulhosa onde quer que esteja. Amo vocês profundamente!

Agradeço especialmente à minha orientadora Dra. Sandra Tédde Santaella pela oportunidade de ter sua orientação e ao meu co-orientador Dr. Renato Carrhá Leitão sempre pronto a ajudar, tirar minhas dúvidas e me instigar a fazer pesquisa, sempre buscando aprender mais e mais. Tenho grande carinho, respeito e admiração por vocês!

À Funcap e Capes pela concessão das bolsas.

Meus queridos amigos do Laboratório de Tecnologia da Biomassa, em especial à equipe dos reatores, que aprendi amar e criei um vínculo de amizade muito forte e verdadeiro!

Um obrigada especial ao meu querido amigo Michael Viana, que não mediu esforços pra me ajudar, atendendo meus telefonemas até de madrugada pra tirar dúvidas, me ensinando os “mistérios” do Excel e me aconselhando sempre que preciso: Muuuito obrigada!

À Elisa e ao Alexandre, sempre prestativos, pela ajuda com as análises de biologia molecular e pelo aprendizado. Muito obrigada!

À profa. Vânia Melo e à pesquisadora Dra. Patrícia Bordallo, pelo suporte físico para as análises de biologia molecular.

À Embrapa Agroindústria Tropical, em especial ao Laboratório de Tecnologia da Biomassa e Laboratório de Biologia Molecular, e ao Labosan pelo suporte físico para realização dos experimentos.

Como não agradecer aos meus queridos amigos do mestrado, especialmente Eva, Vinícius, Nonato e Amanda, o quarteto fantástico. Sempre presentes, mesmo em pesquisas diferentes, a gente sempre dava um jeitinho de se ver e conversar sobre o andamento dos projetos e matar um pouco a saudade. Amo vocês demais!

Enfim, gostaria de agradecer a todos que participaram direta ou indiretamente da minha pesquisa. Gente, estou muito feliz! Foi uma experiência mais que maravilhosa, onde vou guardar só boas recordações e bons amigos. Muito obrigada a todos!

RESUMO

A crescente demanda por energias alternativas torna o hidrogênio (H_2) interessante por possuir alta concentração de energia por unidade de massa. Aliado a isso, futuramente, o glicerol, subproduto da geração de biodiesel, passará de resíduo a passivo ambiental, devido à crescente produção de biodiesel. Unindo as duas perspectivas, a produção fermentativa de hidrogênio a partir de glicerol residual é uma alternativa atraente, pois pode-se gerar energia limpa a partir de um resíduo. A grande questão que envolve a otimização da produção biológica de H_2 é a seleção de inóculos com diversidade microbiana que maximize os rendimentos. Técnicas de pré-tratamento do inóculo selecionam microrganismos específicos para a produção de H_2 e enriquecem a comunidade com bactérias produtoras de H_2 . Por isso, esses distúrbios controlados no ambiente são utilizados amplamente. Com base no que foi exposto, este trabalho teve como objetivos: (i) selecionar uma microbiota com potencial elevado de produção de H_2 e analisar sua diversidade; (ii) avaliar o impacto dos pré-tratamentos sobre a diversidade microbiana e o rendimento da produção de H_2 (ηH_2); (iii) e relacionar diversidade microbiana com ηH_2 (na Ecologia este termo é conhecido como produtividade). Foram testados diferentes inóculos submetidos a diferentes pré-tratamentos (choque de calor, choque ácido e adição de clorofórmio). Pelos resultados, pode-se concluir que a diversidade microbiana tem relação direta com a produtividade em H_2 . Da mesma forma, o impacto do pré-tratamento sobre a microbiota depende do tipo de inóculo. No entanto, as maiores diversidade e produtividade foram alcançadas com lodo proveniente da estação de tratamento de esgoto doméstico sem pré-tratamento. Os pré-tratamentos resultaram em diferentes índices de diversidade, o que mostra que o grau do distúrbio, pode não só afetar os microrganismos metanogênicos, mas também os demais presentes. Concluiu-se que a aplicação de pré-tratamentos se tornou redundante, pois apenas a aplicação de carga orgânica elevada e ausência de solução tampão promovem redução do pH para a faixa ideal das produtoras de H_2 , inibindo a atividade metanogênica.

Palavras chave: Glicerina; bactérias hidrogenogênicas; diversidade microbiana; estresse seletivo; hidrogenogênese.

ABSTRACT

The growing demand for alternative energy makes hydrogen (H_2) an interesting fuel because of its high concentration of energy per unit mass. Moreover, in the future, the glycerol derived from the biodiesel industry can become an environmental liability due to the increasing production of biodiesel. Therefore, the fermentative production of hydrogen from residual glycerol is an attractive alternative because it will be possible to generate clean energy from a waste. The issue on the optimization of biological production of H_2 is the selection of microbial population with an adequate diversity that improves the hydrogen yields. Techniques for pre-treatment of the inoculum select specific microorganisms to produce H_2 and enrich the community with H_2 -producing bacteria. Therefore, these controlled environmental disturbs are widely used. Based on the above, this study aimed to: (i) select a microbiota with high potential for the production of H_2 and analyse its diversity, (ii) evaluate the impact of pre-treatments on microbial diversity and hydrogen yield, (iii) evaluate the relationship between microbial diversity and hydrogen yield. Different inocula were tested at different pre-treatments (heat shock, acid shock and chloroform addition). The results show that the microbial diversity is directly related to hydrogen yield. Likewise, the impact of the pre-treatment depends on the type of inoculum. However, the highest diversity and yield were achieved with sludge withdrawn from a municipal wastewater treatment plant without any pre-treatment. In general, the pre-treatments resulted in different diversity index, which shows that the degree of disturb may not only affect the methanogenic microorganism, but also the remaining in the inoculum. The pre-treatments became redundant because only the imposed high organic load and the absence of buffer promoted reduction of pH to the optimum range for H_2 production, inhibiting the methanogenic activity and improving the hydrogen yield..

Keywords: Glycerine; H_2 -producing bacteria, microbial diversity; selective stress; hydrogenogenesis.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	10
1.1. CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA	10
1.2. OBJETIVOS.....	12
1.3. REFERÊNCIAS	12
2. PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO POR DIGESTÃO ANAERÓBIA DE GLICEROL: REVISÃO	16
2.1. INTRODUÇÃO	18
2.2. BIOQUÍMICA DA DIGESTÃO ANAERÓBIA DE GLICEROL	21
2.3. FATORES QUE AFETAM A PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO EM REATORES ANAERÓBIOS	26
2.3.1. Tipos de reatores.....	26
2.3.2. Inóculo e pré-tratamento.....	29
2.3.3. Concentração do substrato	36
2.3.4. Carga Orgânica Volumétrica	37
2.3.5. pH e Temperatura	38
2.3.6. Nutrientes.....	42
2.3.7. Tampão	43
2.4. DIVERSIDADE MICROBIANA EM REATORES ANAERÓBIOS PRODUTORES DE HIDROGÊNIO.....	43
2.5. DISCUSSÃO FINAL.....	51
2.6. REFERÊNCIAS	53
3. INFLUÊNCIA DO INÓCULO E DO PRÉ-TRATAMENTO NA DIVERSIDADE MICROBIANA E NA PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO A PARTIR DO GLICEROL	70
3.1. INTRODUÇÃO	72
3.2. MATERIAL E MÉTODOS	74
3.2.1. Inóculos e pré-tratamentos.....	74
3.2.2. Substrato	75
3.2.3. Testes de atividade hidrogenogênica específica e η_{H_2}	75
3.2.4. Teste de atividade metanogênica específica	77

3.2.5.	Métodos analíticos	78
3.2.6.	Extração do DNA e amplificação do gene 16S rRNA por PCR.....	78
3.2.7.	Eletroforese em gel de gradiente desnaturante	78
3.2.8.	Cálculo do índice de diversidade	79
3.3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	79
3.3.1.	ηH_2 em função do tipo de inóculo e pré-tratamento.	79
3.3.2.	Efeito das impurezas contidas no glicerol no ηH_2	86
3.3.3.	Produção de ácidos orgânicos.....	87
3.3.4.	Diversidade nos inóculos	91
3.4.	CONCLUSÕES.....	95
3.5.	REFERÊNCIAS	96
4.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	106

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA

A necessidade por energias alternativas surge por diversos fatores, dentre eles: o aumento dos preços do petróleo, as mudanças climáticas devido às grandes emissões de poluentes e as reservas finitas de combustíveis fósseis e seu grande consumo. Para atender a estas demandas, vários tipos de biocombustíveis tem sido produzidos, dentre eles o hidrogênio (H_2), que pode ser gerado por via físico-química ou biológica (HALLENBECK, 2009). O hidrogênio tem inúmeras aplicações, pois é compatível com processos eletroquímicos e de combustão para conversão de energia, e não produz gases causadores do efeito estufa (LEVIN; PITT; LOVE, 2004). Por via biológica, ele pode ser produzido por processo fermentativo, no qual bactérias anaeróbias isoladas ou em consórcio utilizam substrato orgânico para degradação, gerando H_2 em condições ideais (pH, temperatura e concentração de substrato) (LEE; SHOW; SU, 2011; SEN; SHAKDWIPEE; BANERJEE, 2008).

Inúmeros substratos podem ser usados para produção de hidrogênio, mas o uso de resíduos orgânicos como fonte de carbono é atraente, pois agrega valor ao resíduo e elimina um provável passivo ambiental. O glicerol residual se destaca entre os resíduos orgânicos utilizados para a produção fermentativa de H_2 , pois possui concentração elevada de matéria orgânica facilmente biodegradável e é gerado em grandes quantidades como subproduto no processo de produção do biodiesel.

A produção de biodiesel inclui o processo de transesterificação, no qual ocorre uma reação química entre um óleo vegetal ou gordura animal e um álcool (geralmente metanol ou etanol), na presença de um catalisador, gerando além de biodiesel, o glicerol (LEONETI; ARAGÃO-LEONETI; OLIVEIRA, 2012). Estima-se que a cada 100 kg de biodiesel produzido, são gerados 10 kg de glicerol, que têm aplicabilidade industrial restrita devido ao alto teor de impurezas decorrentes do processo de transesterificação (YAZDANI; GONZALEZ, 2007).

Por isso, a aplicação do glicerol residual como fonte de carbono para bactérias torna-se viável, pois não há necessidade de purificação do substrato, ao mesmo tempo em que possui uma quantidade elevada de matéria orgânica - demanda

química de oxigênio (DQO) de 1,2 g/g glicerol) (VIANA *et al.*, 2012) e pode ser convertido em produtos de alto valor agregado (SARMA *et al.*, 2012).

A seleção de inóculos que contenham diversidade elevada é o grande desafio para otimização da produção fermentativa de H₂, pois a diversidade está estritamente relacionada com a produtividade. Apesar de ser possível obter rendimentos mais elevados usando-se culturas puras, o uso de culturas mistas (com diversidade elevada aumenta a estabilidade do sistema, o que resulta em maior resistência a flutuações ambientais e resiliência (capacidade que a comunidade tem de recuperar níveis normais de atividade após um distúrbio ambiental) (JOHNSON, *et al.*, 1996; MACARTHUR, 1955). Além disto, culturas mistas são mais facilmente obtidas e mantidas em um reator alimentado com matéria orgânica residual, onde o controle da contaminação é praticamente impossível. Diversos trabalhos sobre produção de hidrogênio relatam o uso de culturas mistas oriundas de reatores anaeróbios de estações de tratamentos de efluentes domésticos (CHAGANTI; KIM; LALMAN, 2012; PENDYALA *et al.*, 2012; WANG; LIN; CHANG, 2006), industriais (ASSAWAMONGKHOLSIRI; REUNGSANG; PATTRA, 2013; PENDYALA *et al.*, 2012; GIORDANO; CANTÚ; SPAGNI, 2011) e culturas mistas de solos (SELEMBO *et al.*, 2009; LUO *et al.*, 2008).

Para maximizar a produção biológica de H₂, a metanogênese deve ser eliminada, pois algumas arqueias metanogênicas utilizam o H₂ para a produção de metano (CH₄) juntamente com gás carbônico (HULSHOFF POL *et al.*, 2004). Para isso, vários métodos de pré-tratamento (físicos ou químicos) do inóculo são usados a fim de inibir ou eliminar a atividade metanogênica (ASSAWAMONGKHOLSIRI; REUNGSANG; PATTRA, 2013; ROSSI *et al.*, 2011).

Dentre as técnicas de pré-tratamento destacam-se: tratamentos com choque de calor, que estimulam a produção de esporos por bactérias hidrogenogênicas (especialmente os gêneros *Clostridium* e *Bacillus*) e eliminam as não formadoras de esporos, como as arqueias metanogênicas (BAGHCHEHSARAEE *et al.*, 2008; DUANGMANEE *et al.*, 2007); tratamentos químicos com adição de clorofórmio, ácido 2-bromoetano sulfônico (BESA) ou iodopropano, que inibem a atividade da coenzima-M redutase nas arqueias metanogênicas, evitando o consumo de H₂ para a formação de CH₄ (NING *et al.*, 2012; ZHU; BÉLAND, 2006); e tratamentos com ácidos ou bases fortes, que assim como o choque de calor, se baseiam na formação

de esporos por bactérias produtoras de H₂ e eliminação das demais (ASSAWAMONGKHOLSIRI; REUNGSANG; PATTRA, 2013; CHEN; LIN; LIN., 2002).

Segundo Connel (1978), perturbação moderada no ambiente favorece o desenvolvimento de determinadas espécies, aumentando a diversidade geral. Esse estresse ambiental permite a ocorrência de um número maior de espécies sem que haja exclusão por competição. Portanto, dependendo do impacto gerado pelo pré-tratamento, a diversidade do sistema pode aumentar ou diminuir, contribuindo ou não para o aumento da produtividade. Por outro lado, a aplicação de cargas orgânicas volumétricas (COV) elevadas para reduzir o pH pelo acúmulo de ácidos no sistema parece ser suficiente para inibir a atividade metanogênica e promover o aumento da produção de H₂ (OH; VAN GINKEL; LOGAN, 2003).

1.2. OBJETIVOS

O objetivo principal desta pesquisa foi selecionar a microbiota mais apta à produção de H₂ e avaliar sua diversidade. Além disso, o estudo também buscou avaliar a influência dos pré-tratamentos sobre a produtividade e diversidade, e a relação ente esses dois fatores. O capítulo seguinte traz um levantamento dos principais fatores envolvidos na produção fermentativa de H₂ a partir de glicerol, além da bioquímica de digestão do glicerol, das dinâmicas populacionais e da diversidade microbiana envolvida no processo.

1.3. REFERÊNCIAS

ASSAWAMONGKHOLSIRI, T.; REUNGSANG, A.; PATTRA, S., 2013. Effect of acid, heat and combined acid-heat pretreatments of anaerobic sludge on hydrogen production by anaerobic mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 30: 1-8.

BAGHCHEHSARAEI, 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 (15): 4064-4073.

CHAGANTI, S.R.; KIM, D-H.; LALMAN, J.A., 2012. Dark fermentative hydrogen production by mixed anaerobic cultures: Effect of inoculum treatment methods on hydrogen yield. *Renewable Energy*, 48: 117-121.

CHEN, C-C.; LIN, C-Y.; LIN, M-C., 2002. Acid–base enrichment enhances anaerobic hydrogen production process. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58 (2): 224-228.

CONNELL, J.H., 1978. Diversity in tropical rain forests and coral reefs. *Science*, 199: 1302-1310.

DUANGMANEE, T.; PADMASIRI, S. I.; SIMMONS, J. J.; RASKIN, L.; SUNG, S., 2007. Hydrogen production by anaerobic microbial communities exposed to repeated heat treatments. *Water Environmental Research*, 79:975-983.

GIORDANO, A.; CANTÚ, C.; SPAGNI, A., 2011. Monitoring the biochemical hydrogen and methane potential of the two-stage dark-fermentative process. *Bioresource Technology*, 102: 4474–4479.

HALLENBECK, P. C., 2009. Fermentative hydrogen production: Principles, progress, and prognosis. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34 (17): 7379–7389.

HULSHOFF POL, L.W.; CASTRO LOPES, S.I.; LETTINGA, G.; LENS, P.N.L., 2004. Anaerobic sludge granulation. *Water Research*, 38:1376-1389.

JOHNSON, K.H.; VOGT, K.A.; CLARK, H.J.; SCHMITZ, O.J.; VOGT, D.J., 1996. Biodiversity and the productivity and stability of ecosystems. *Tree*, 11 (9): 372-377.

LEE, D-J.; SHOW, K-Y.; SU, A., 2011. Dark fermentation on biohydrogen production: Pure culture. *Bioresource Technology*, 102 (18): 8393-8402.

LEONETI, A. B.; ARAGÃO-LEONETI, V.; OLIVEIRA, S. V. W. B., 2012. Glycerol as a by-product of biodiesel production in Brazil: Alternatives for the use of unrefined glycerol. *Renewable Energy*, 45: 138-145.

LEVIN, D. B.; PITT, L.; LOVE, M., 2004. Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29 (2): 173–185.

LUO, Y.; ZHANG, H.; SALERNO, M.; LOGAN, B. E.; BRUNS, M. A., 2008. Organic loading rates affect composition of soil-derived bacterial communities during continuous, fermentative biohydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33 (22): 6566-6576.

MACARTHUR, R., 1955. Fluctuations of animal populations and a measure of community stability. *Ecology*, 36: 533-536.

NING, Y. Y.; JIN, D. W.; SHENG, G. P.; HARADA, H.; SHI, X.-Y., 2012. Evaluation of the stability of hydrogen production and microbial diversity by anaerobic sludge with chloroform treatment. *Renewable Energy*, 38(1): 253–257.

OH, S-E.; VAN GINKEL, S.; LOGAN, B.E., 2003. The relative effectiveness of pH control and heat treatment for enhancing biohydrogen gas production. *Environmental Science and Technology*, 37 (22): 5186-5190.

PENDYALA, B.; CHAGANTI, S. R.; LALMAN, J. A.; SHANMUGAM, S. R.; HEATH, D. D.; LAU, P. C. K. 2012. Pretreating mixed anaerobic communities from different sources: Correlating the hydrogen yield with hydrogenase activity and microbial diversity. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37 (17): 12175-12186.

ROSSI, D. M., COSTA, J. B.; SOUZA, E. A.; PERALBA, M. D. C. R.; SAMIOS, D.; AYUB, M. A. Z., 2011. Comparison of different pretreatment methods for hydrogen production using environmental microbial consortia on residual glycerol from biodiesel. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(8): 4814–4819.

SARMA, S. J.; BRAR, S. K.; SYDNEY, E. B.; BIHAN, Y. L.; BUELNA, G.; SOCCOL, C. R., 2012. Microbial hydrogen production by bioconversion of crude glycerol: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37 (8): 6473-6490.

SELEMBO, P. A.; PEREZ, J. M.; LLOYD, W. A.; LOGAN, B. E., 2009. Enhanced hydrogen and 1,3-propanediol production from glycerol by fermentation using mixed cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 104(6): 1098-1106.

SEN, U.; SHAKDWIPEE, M.; BANERJEE, R., 2008. Status of biological hydrogen production. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 67: 980-993.

VIANA, M. B.; FREITAS, A. V.; LEITÃO, R. C.; PINTO, G. A. S.; SANTAELLA, S. T., 2012. Anaerobic digestion of crude glycerol: a review. *Environmental Technology Reviews*, 1(1): 81–92.

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

YAZDANI, S. S.; GONZALEZ, R., 2007. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. *Current Opinion in Biotechnology*, 18: 213–219.

YU, J; TAKAHASHI, P., 2007. Biophotolysis-based hydrogen production by cyanobacteria and green microalgae. *Communicating current research and educational topics and trends in applied microbiology*: 79–89.

ZHU, H.; BÉLAND, M., 2006. Evaluation of alternative methods of preparing hydrogen producing seeds from digested wastewater sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31 (14): 1980-1988.

2. PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO POR DIGESTÃO ANAERÓBIA DE GLICEROL: REVISÃO

RESUMO

O hidrogênio é uma alternativa ao uso de combustíveis fósseis que pode ser obtido a partir de resíduos orgânicos, como o glicerol oriundo da indústria do biodiesel, através da digestão anaeróbia. A produção de hidrogênio em reatores anaeróbios depende, não somente dos microrganismos utilizados, mas também de fatores ambientais e operacionais, tais como tipo e configuração do reator, COV, tempo de detenção hidráulica, pH, temperatura etc. Estes fatores, de forma isolada ou conjunta, afetam, não só η_{H_2} , como também a diversidade microbiana do sistema, pois afetam a atividade enzimática dos microrganismos determinando a direção das rotas metabólicas e a produção dos metabólitos formados. Assim, a fonte de microrganismos usados para inocular o reator, bem como o pré-tratamento aplicado a este inóculo, necessário para beneficiar as bactérias produtoras de hidrogênio (BPH), tem papel crucial no potencial de produção de hidrogênio. As técnicas de pré-tratamento do inóculo, apesar de gerarem bons resultados e serem bastante utilizadas, podem ser dispensadas quando o controle dos parâmetros operacionais do reator é efetivo. Manter o pH ácido e aplicar COV elevada parece ser suficiente para inibir a atividade metanogênica e manter no reator uma biomassa rica em BPH. Este trabalho faz um levantamento da literatura e apresenta os principais parâmetros envolvidos na produção biológica de H_2 , além da bioquímica da digestão do glicerol, com foco na diversidade microbiana envolvida nesse processo.

Palavras chave: Fermentação escura, glicerina; fatores ambientais; diversidade microbiana; hidrogenogênese.

ABSTRACT

Hydrogen is an alternative to fossil fuels that can be obtained by anaerobic digestion of organic waste such as glycerol derived from biodiesel industry. Hydrogen production in anaerobic reactors depends not only on the microorganisms used, but also environmental and operational factors such as the type and configuration of the reactor, OLR, hydraulic retention time, pH, temperature etc. These factors, alone or combined, affect not only η_{H_2} , but also the microbial diversity in the system. Moreover, they affect the enzymatic activity of microorganisms, determining the direction of metabolic pathways and the production of metabolites. Therefore, the microorganisms used to inoculate the reactor, and the pre-treatment applied to this inoculum, that benefits the hydrogen producing bacteria (HPB), plays a crucial role in the hydrogen production potential. Despite the techniques for pre-treatment of the inoculum can result in a high hydrogen yield and are widely used, they can be dispensed when the control of the operational parameters of the reactor is effective. Maintaining the pH at an acid range by imposing a high OLR is sufficient to inhibit methanogenic activity and maintain a biomass rich in BPH, which can cope with organic load and temperature variations. This paper presents a survey of the literature with the main parameters involved in fermentative production of H_2 , and the biochemistry of the anaerobic digestion of glycerol, with a focus on microbial diversity involved in this process.

Keywords: Dark fermentation, glycerin, environmental factors, microbial diversity; hydrogenogenesis.

2.1. INTRODUÇÃO

O hidrogênio é uma alternativa ao uso de combustíveis fósseis, já que é uma fonte de energia renovável que pode ser obtido a partir de resíduos orgânicos, possui alta concentração de energia por unidade de massa (122 kJ/g) e não gera gases causadores do efeito estufa, pois a água é o único subproduto resultante de sua combustão (COSTA, 2010). Hidrogênio pode ser utilizado como combustível para turbinas, motores de combustão interna, processos e sínteses industriais, e em células combustíveis para geração de energia limpa (ITO *et al.*, 2005).

A produção de hidrogênio pode ser realizada a partir de processos físico-químicos e biológicos. Dentre os processos físico-químicos, podem ser citados: (i) craqueamento térmico de gás natural usando-se vapor de água a pressão elevada (2,5Mpa) e temperatura entre 850 e 950 °C, produzindo hidrogênio e monóxido de carbono (DICKS, 1996); (ii) oxidação parcial de hidrocarbonetos pesados, carvão ou biomassa, usando-se vapor, ar ou oxigênio aquecidos em temperaturas entre 300 e 400 °C para produzir hidrogênio e outros gases (CO, CH₄, CO₂ e N₂) (KOTHARI; BUDDHI; SAWHNEY, 2008); e (iii) eletrólise da água, na qual hidrogênio e oxigênio são separados pela passagem de corrente elétrica (CRUZ, 2010; FUKUROZAKI, 2011). A desvantagem no uso destas técnicas é o balanço desfavorável de energia, uma vez que é necessária a utilização de grande quantidade de energia para a geração de temperaturas e pressões elevadas (COSTA, 2010).

Por via biológica, H₂ pode ser gerado por algas através da bio-fotólise da água, ou por bactérias pela fermentação anaeróbia (KUMAR; DAS, 2000). No processo de bio-fotólise, a molécula de água é decomposta na presença de luz pela ação de organismos fotoautotróficos, como por exemplo, as microalgas verdes *Chlamydomonas reinhardtii* e cianobactérias *Anabaena variabilis*. O processo de recombinação de prótons e elétrons para formação de H₂ é catalisado pela enzima [Fe]-hidrogenase (YU; TAKAHASHI, 2007).

Na digestão anaeróbia, a matéria orgânica é degradada durante quatro etapas básicas: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese (Figura 2.1). O hidrogênio é produzido na segunda etapa e consumido na terceira, quando bactérias

homoacetogênicas utilizam H_2 para produzir acetato, e na quarta, quando as arqueias metanogênicas hidrogenotróficas utilizam H_2 e CO_2 para a produção de CH_4 (MCCARTY, 1964).

Assim, se o objetivo é produzir H_2 , a metanogênese deve ser inibida por procedimentos operacionais como: diminuição do tempo de detenção hidráulica (WON; LAU, 2011; BRUNSTERMANN; WIDMANN, 2010), aumento da COV (MARIKAKIS *et al.*, 2011; SHEN; BAGLEY; LISS, 2009), redução do pH (WANG; WAN, 2011; SKONIECZNY; YARGEAU, 2009), aumento da temperatura do reator (WU; YANG; GUO, 2010; AKUTSU *et al.*, 2009), ou adição de antibióticos específicos (FORREST; SIERRA; HOLTZAPPLE, 2010).

Além disto, a biomassa ativa deve ser bem selecionada, o que pode ser feito a partir de pré-tratamento do inóculo a fim de diminuir a concentração de microrganismos metanogênicos no reator (ROSSI *et al.*, 2011; BAGHCHEHSARAEE *et al.*, 2008; HU; CHEN, 2007; HAWKES *et al.*, 2002), ou a inoculação do reator com microrganismos específicos (HUNG; CHANG; CHANG, 2011; JEONG *et al.*, 2008).

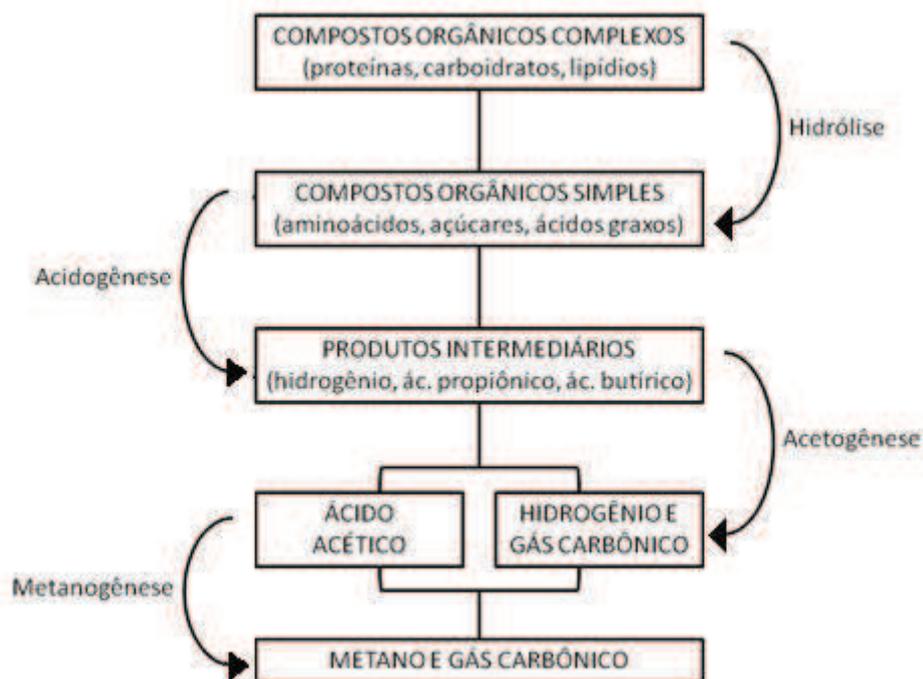


Figura 2.1. Esquema das etapas da digestão anaeróbia. Adaptado de Lettinga, Hulshoff Pol e Zeeman (1999).

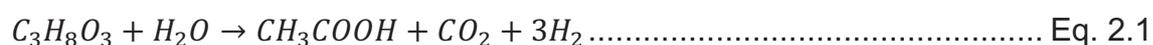
A produção biológica de hidrogênio por via anaeróbia pode ocorrer em temperaturas e pressões muito semelhantes às temperaturas e pressões atmosféricas (entre 25 e 55 °C, 1 atm) (DAS; VEZIROGLU, 2001), simplificando e reduzindo custos com o processo. Além disto, durante a fermentação anaeróbia para produção de hidrogênio, pode-se produzir metabólitos de alto valor agregado utilizados nas indústrias, como os ácidos butírico e láctico, além de apresentar taxa de produção de hidrogênio mais elevada que a produção fotossintética (LEE *et al.*, 2008, DAS; VEZIROGLU, 2001).

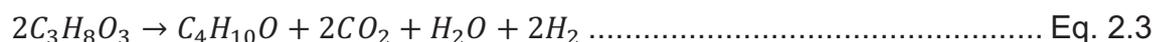
Diversos substratos podem ser usados como fonte de matéria orgânica para a produção de H₂ por via anaeróbia, por exemplo: glicose (YOKOYAMA *et al.*, 2009); sacarose (CHEN; LIN; CHANG, 2001); xilose (MAINTINGUER *et al.*, 2011); e polímeros, como amido ou celulose (LIU *et al.*, 2008).

O uso de resíduos orgânicos como substrato pode agregar valor à cadeia produtiva e eliminar passivos ambientais potenciais. Exemplos de resíduos orgânicos usados são: fração orgânica dos resíduos sólidos urbanos (LAY; LEE; NOYKE, 1999), águas residuárias de laticínios (LIU; CHAN; FANG, 2002), restos de frutas e vegetais (FOUNTOULAKIS; MANIOS, 2009; CHEN *et al.*, 2006; WANG; LIN; CHANG, 2006), bagaço de cana (ARUNSRI; REUNGSANG 2011; PATTRA *et al.*, 2008) e glicerol derivado da produção de biodiesel (SELEMBO *et al.*, 2009; WU *et al.*, 2011).

O glicerol é um subproduto da produção de biodiesel, oriundo da transesterificação de óleos e gorduras de origem animal (LEONETI; ARAGÃO-LEONETI; OLIVEIRA, 2012). De acordo com Yazdani e Gonzalez (2008), a grande quantidade de glicerol gerada durante a reação de transesterificação (1 kg de glicerol para cada 10 kg de biodiesel produzido) e o alto teor de impurezas do glicerol residual faz com que o preço de mercado deste subproduto seja muito baixo. Brevemente, com o aumento da demanda de biodiesel, o glicerol residuale tornará um passivo ambiental (VIANA *et al.*, 2012a).

Estequiometricamente é possível produzir até 3 mol H₂/mol glicerol através da digestão anaeróbia, dependendo da rota metabólica (SARMA *et al.*, 2012) (Equações 2.1 a 2.4).





O glicerol pode ser metabolizado facilmente via piruvato, formando H₂ e CO₂ (YAZDANI; GONZALEZ, 2008; JOHNSON; TACONI, 2007). No entanto, quando originado de biodiesel, ele contém impurezas que podem dificultar a digestão anaeróbia e, conseqüentemente, a produção de hidrogênio (VIANA *et al.*, 2012b; ŠPALKOVÁ *et al.*, 2009; SILES-LÓPEZ *et al.*, 2009).

Outros fatores que interferem no potencial de produção de hidrogênio são: (i) inóculo utilizado no reator (HUNG; CHANG; CHANG, 2011; JEONG *et al.*, 2008), (ii) tipo de reator (BABU; MOHAN; SARMA, 2009; GUO *et al.*, 2008), (iii) parâmetros operacionais do reator (temperatura, pH, COV), (iv) teor de metais, (v) suplementação com nutrientes, (vi) adição de inibidores específicos (LEE *et al.*, 2006; SHEN; BAGLEY; LISS, 2009; LIN; LAY, 2004a; CHO; LEE., 2011).

2.2. BIOQUÍMICA DA DIGESTÃO ANAERÓBIA DE GLICEROL

Poucos microrganismos são hábeis para degradar glicerol pela rota fermentativa devido à especificidade das enzimas que atuam no metabolismo dessa substância (YAZDANI; GONZALEZ, 2008; TORTORA, 2005). Alguns exemplos são os gêneros *Clostridium*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Lactobacillus*, *Anaerobiospirillum*, *Bacillus* e *Propionibacterium* (YAZDANI; GONZALEZ, 2008).

A digestão anaeróbia de glicerol pode ocorrer pelas rotas metabólicas oxidativa ou redutora (Figura 2.1), sendo que o hidrogênio é produzido apenas na primeira. Na rota oxidativa, glicerol é convertido em dihidroxiacetona pela enzima glicerol desidrogenase (GHD) e, em seguida, fosforilado pela enzima dihidroxiacetona quinase (DHA_k). Ao ser convertido em piruvato, entra em ação a oxidoredutase ferredoxina pirúvico (quando atuam apenas microrganismos anaeróbios estritos) e a hidrogenase, quando piruvato é convertido em acetil-CoA ou em formiato.

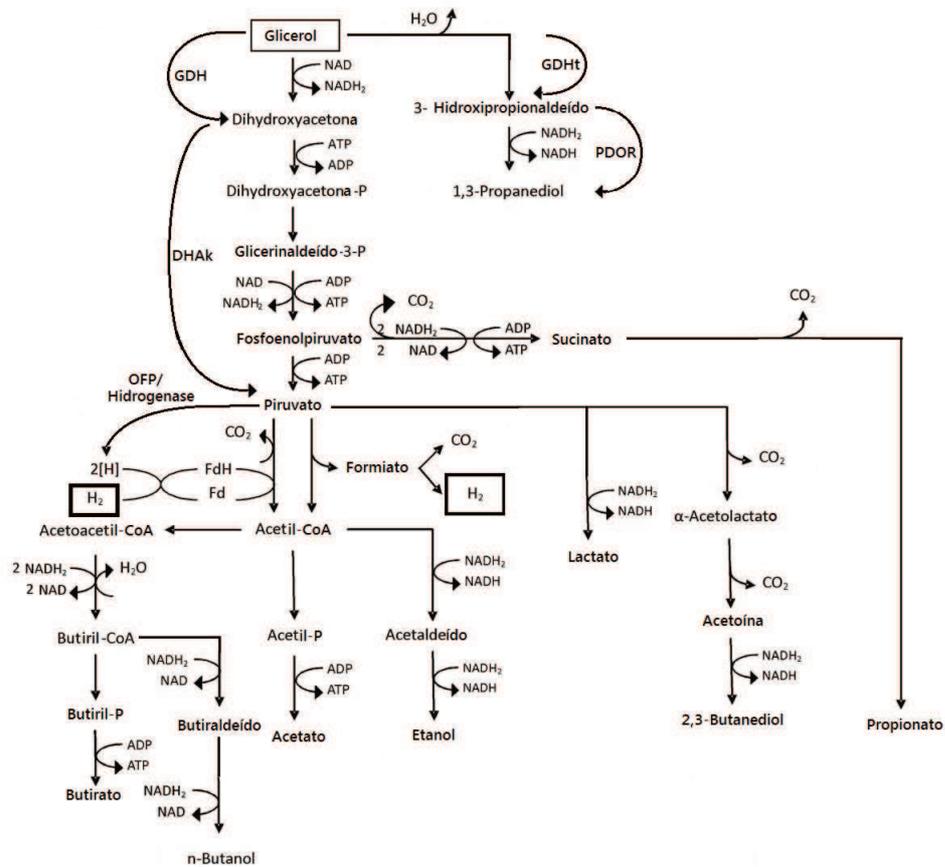


Figura 2.1. Rota metabólica de fermentação do glicerol com produção de hidrogênio e diversos metabólitos. Adaptado de KUBIAK *et al.*, 2012; COSTA, 2010. Principais enzimas envolvidas no processo: GDH-glicerol desidrogenase; DHAK- dihidroxiacetona quinase; OFP- oxirredutase ferredoxina purúvico; hidrogenase; GDHt- glicerol desidratase; PDOR- 1,3-propanediol oxidorredutase.

Quando há geração de formiato, este é convertido em H₂ e CO₂, mas essa conversão é feita apenas por determinadas espécies de bactérias entéricas, como a *Escherichia coli* e *Enterobacter aerogenes*. Nesta última espécie, o hidrogênio é o principal produto final, resultado da atividade da enzima hidrogenioliase formiato, que catalisa a degradação de formiato em hidrogênio. Nos centros ativos dessas enzimas existem grupos ionizáveis que promovem a conexão da enzima com o substrato, catalisando a reação (FABIANO; PEREGO, 2002).

Após a formação de acetil-CoA, as enzimas atuam na produção dos metabólitos finais, como acetato, butirato e etanol. O tipo de metabólito formado dependerá da especificidade do microrganismo e do ambiente. Além disso, a produção geral a partir da conversão de piruvato é considerada baixa, já que apenas uma ou duas

moléculas de H₂ são formadas a partir de uma única molécula de piruvato. Isso ocorre porque parte dele é usada para gerar ATP e, então, excretada na forma de um produto final, como o acetato (HALLENBECK; BENEMANN, 2002).

Na rota redutora, a enzima glicerol desidratase (GDHt) converte o glicerol a 3-hidroxi-propionaldeído, que é, então, convertido a 1,3-propanodiol pela 1,3-propanodiol oxidorreductase. Esta rota foi confirmada por Wu *et al.*(2011), que avaliaram a produção de hidrogênio por uma linhagem específica do gênero *Klebsiella*, conhecida por degradar glicerol, e observaram que o aumento na concentração de glicerol provocava aumento na concentração de 1,3-propanodiol e diminuição de hidrogênio.

Estas tendências opostas entre álcoois e hidrogênio ocorrem porque durante a conversão de piruvato em acetil CoA , com concentração limitante de glicerol, há grande produção de H₂. Por outro lado, o excesso de glicerol provoca aumento na produção de 1,3-propanodiol, pois mais NADH₂ é usado prioritariamente para produção desse metabólito. Mesmo com a diversidade de rotas e enzimas envolvidas neste processo, apenas 1/3 do substrato pode ser usado para a produção de H₂. Os outros 2/3 resultam em produtos finais como acetato, butirato e álcoois (HALLENBECK, 2009).

Caso a fermentação anaeróbia continue, acetato será convertido em metano pelas arqueias metanogênicas acetotróficas, e pelas arqueias metanogênicas hidrogenotróficas, a partir de H₂ e CO₂.

O uso de estratégias de engenharia metabólica possibilita o aumento da produção de hidrogênio na fermentação anaeróbia. As limitações existentes nas rotas metabólicas que comprometem a produção de gás podem ser reduzidas, aumentando a utilização do substrato e o fluxo de carbono para a rota produtora de H₂, pelo estímulo ou inibição da atividade de enzimas específicas (MATHEWS; WANG, 2009).

As técnicas de engenharia metabólica incluem: bloqueio da expressão de um determinado gene, substituindo-o por uma versão modificada do mesmo (*knockout* de genes específicos) (YAZDANI; GONZALEZ, 2008; CAMERON; CHAPLEN, 1997); suplementação com fontes de nitrogênio, como a milhocina, um resíduo gerado pela indústria de beneficiamento do milho, e com fontes de aminoácidos, como a triptona,

para ativar a rota específica que fermenta o glicerol (DHARMADI; MURARKA; GONZALEZ, 2006); e super-expressão do gene hidrogenase que promove o aumento da oxidação de NADH, aumentando a produção de H₂ (MORIMOTO *et al.*, 2005).

No entanto, técnicas de engenharia metabólica têm sido utilizadas para maximizar a produção de H₂ quase que exclusivamente na espécie *Escherichia coli*, que produz hidrogênio apenas pela rota piruvato-formiato, limitando a produção máxima a 2 mol H₂/mol glicose. Apesar disso, essas técnicas também podem ser aplicadas ao gênero *Clostridium*, que tem potencial maior para produção de hidrogênio pela rota piruvato-acetil-CoA, chegando a produzir 4 mol H₂/mol glicose (HALLENBECK; ABO-HASHESH; GHOSH, 2012).

Dinamarca e Bakke (2011) afirmam que, geralmente, as espécies *Clostridium acetobutylicum* e *Escherichia coli* são as mais empregadas nas técnicas de manipulação de rotas metabólicas. De acordo com Ren *et al.* (2008), estimular geneticamente a produção de butirato por determinadas espécies de *Clostridium* (*C. acetobutylicum*) resulta em taxas maiores de acetato que aumentam as taxas de produção de H₂. Apesar de as reações de fermentação produzirem grande variedade de metabólitos (álcoois, acetato, butirato, propionato), a rota de produção de hidrogênio via acetato produz mais ATP por mol de substrato do que via álcoois, e é preferida pelos microrganismos que degradam açúcares (KRAEMER; BAGLEY, 2007).

Na fermentação anaeróbia para produção de hidrogênio, a enzima hidrogenase catalisa a transferência de elétrons para o íon H⁺ formando H₂ (CHEN *et al.*, 2006). Estas enzimas podem ser classificadas em três tipos: [Fe]hidrogenase, [FeNi]hidrogenase e hidrogenase livre de metais. A primeira é cerca de 10 a 100 vezes mais eficiente na produção de H₂ que as demais, pois possui muitos aceptores e doadores de elétrons e, assim, pode catalisar a produção ou consumo de H₂, dependendo das condições ambientais (MATHEWS; WANG, 2009).

A enzima nitrogenase também está associada à produção de H₂ sendo responsável pela redução de N₂ a NH₃. Na ausência de nitrogênio ela pode reduzir H⁺ a H₂, consumindo quatro ATP para cada mol de hidrogênio gerado. Como esta enzima reduz preferencialmente nitrogênio, a presença de NH₄⁺ (em pH menores que 7) inibe o processo de produção de H₂. Segundo Hallenbeck e Benemann

(2002), existem outras nitrogenases capazes de produzir H₂, mas devido às baixas atividades catalíticas e grandes necessidades de ATP, essas nitrogenases não são consideradas eficientes para a produção de H₂.

A atividade da nitrogenase está associada à presença da espécie *Klebsiella pneumoniae*, uma bactéria facultativa fixadora de nitrogênio que, na ausência deste, produz hidrogênio. Mas a produção de um mol de H₂ por esta espécie requer NADH₂, além de necessitar de, no mínimo, quatro moléculas de ATP, diferente de *Clostridium butyricum*, que exige apenas NADH₂, o que facilita a produção de H₂ (CHEN *et al.*, 2006; DAS; VEZIROGLU, 2001).

Song *et al.* (2011) observaram produção de hidrogênio em dois reatores do tipo mistura completa (CSTR) que produziam, principalmente, ácido butírico (R1) e etanol (R2). O controle da produção destes metabólitos finais era feito pelo controle de pH dos reatores, 6,0 a 6,5 no R1 e 4,0 a 4,5 no R2. Ambos os reatores eram alimentados com glicose, tendo os mesmos tempos de detenção hidráulica (TDH) e COV. A produção de hidrogênio foi maior no R2, resultante da alta taxa de utilização de energia pelas bactérias que dominam a rota metabólica do etanol. As diferenças nos produtos dominantes nos reatores foram resultantes da diferença na abundância das espécies (*Clostridium hystolyticum*; *Clostridium lituseburense* e *Enterobacteriaceae*) nos dois reatores.

Mangayil, Karp e Santala (2012) realizaram estudos em reatores alimentados com glicerol residual e inoculados com cultura mista de bactérias com dominância de *Clostridium*. Os autores observaram que a produção de hidrogênio ocorreu simultaneamente com a produção de acetato e butirato, enquanto que o aumento na acumulação de etanol afetou negativamente a produção de H₂. Isto ocorre porque as moléculas de etanol e outros álcoois contêm átomos de hidrogênio que não são liberados como gás, o que resulta em baixa produção de H₂ (LEVIN; PITT; LOVE, 2004; NATH; DAS, 2004).

Penteado (2012) estudou a produção de hidrogênio a partir da sacarose e afirmou que a produção de hidrogênio a partir de hexoses com produção simultânea dos ácidos acético e butírico, aumenta a pressão parcial de H₂, favorece reações que o consomem e diminui sua liberação. Um exemplo disto é a reação entre ácido acético e hidrogênio, termodinamicamente favorável e que produz etanol.

2.3. FATORES QUE AFETAM A PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO EM REATORES ANAERÓBIOS

2.3.1. Tipos de reatores

A configuração do reator é crucial para o desenvolvimento da microbiota, pois influencia diretamente o microambiente, o comportamento hidrodinâmico e a superfície de contato entre o consórcio e o substrato (MOHAN, 2009). Diversos tipos de reatores já foram testados para avaliar a produção biológica de H₂ (Tabela 2.1).

Reatores anaeróbios de leito fluidizado (AFBR) foram utilizados com sucesso, a partir da fermentação de glicose, por vários pesquisadores, sendo que os melhores resultados de produção de hidrogênio foram obtidos quando se aplicou COV entre 25,6 e 192,0 kgDQO/m³.d. Utilizando este tipo de reator com biomassa aderida a um meio suporte, Amorim, Sader e Silva (2012) conseguiram rendimento da produção de H₂(η_{H_2}) de 2,49 mol H₂/mol glicose, aplicando COV de 25,6 kgDQO/m³.d em condições mesofílicas (30 °C). No entanto, Barros *et al.*(2011) obtiveram η_{H_2} semelhante(2,25 mol H₂/mol de glicose) na mesma temperatura mas com COV de 192 kgDQO/m³.d. O bom desempenho do AFBR utilizado nessas pesquisas pode ser explicado pelo fato de estes pesquisadores terem trabalhado com biomassa aderida a um meio suporte que, segundo Babu, Mohan e Sarma (2009), melhora a eficiência de conversão de substrato e, conseqüentemente, a produção de H₂.

Reatores UASB também foram usados para produção de H₂. Na prática, estes reatores têm mostrado desempenho melhor quando operados em temperaturas mesofílicas, com COV que variam entre 20 e 238 kgDQO/ m³.dia (JUNG; KIM; SHIN, 2010; CHANG; LIN, 2004; LEE *et al.*, 2006). No entanto, Dong *et al.*(2011) também operaram um reator UASB termofílico (55 °C; Ph = 7,0; COV=20 kgDQO/m³.d) e conseguiram η_{H_2} de até 3,06 mol H₂/mol sacarose, o que representa cerca de 77% do potencial teórico. Este valor é superior àquele observado por Mu e Yu (2006) (2,88 mol H₂/mol glicose) ao operarem um reator UASB com temperatura, pH e COV menores (38 °C; pH = 4,5; COV = 7 kgDQO/m³.d). Dong *et al.* (2011) afirmam também que em temperaturas termofílicas (55 °C) o sistema se mantém estável mesmo com variações no TDH durante períodos longos de operação devido às propriedades físicas dos grânulos bacterianos.

Tabela 2.1. Tipos de reatores utilizados em pesquisas para produção de hidrogênio (mol H₂/mol substrato) a partir de diferentes substratos.

Tipo de reator	Substrato	COV (kg DQO/m ³ .d)	Produção máxima de hidrogênio (mol H ₂ / mol de substrato)	Referências
EGSB	Sacarose	120	3,47	GUO <i>et al.</i> , 2008
CSTR	Chorume	97	2,4	UENO; FUKUI; GOTO,2007
CSTR	Lactose	138,6	2,8	DAVILA-VAZQUEZ <i>et al.</i> , 2009
CSTR	Sacarose	60	1,22	KIM; HAN; SHIN, 2006
CSTR	Glicose	22	1,8	SHEN; BAGLEY; LISS, 2009
CSTR	Sacarose	20	1,72	MARIAKAKIS <i>et al.</i> , 2011
CSTR	Glicerol	30,0*	0,89	MARKOV; AVERITT; WALDRON, 2010
AFBR	Glicose	44	2,25	BARROS <i>et al.</i> , 2011
AFBR	Glicose	48	2,15	KOTAY; DAS, 2008
CIGSB	Glicose	480	3,88	LEE <i>et al.</i> , 2006
UASB	Sacarose	20	3,06	DONG <i>et al.</i> , 2011
UASB	Sacarose	238	1,62	ZHAO <i>et al.</i> , 2008
IBRCS	Glicose	103	2,8	HAFEZ; NAKHLA; NAGGAR,2010
Batelada	Glicerol	3,7*	0,31	SELEMBO <i>et al.</i> , 2009
Batelada	Glicerol	8,3*	0,07	VLASSIS <i>et al.</i> , 2012
Batelada	Glicerol	24,3*	0,25	CHOOKAEW; O-THONG; PRASERTSAN, 2012
Batelada	Glicerol	1,2*	1,10	MANGAYIL; KARP; SANTALA, 2012

EGSB: Reator granular de leito expandido; CSTR: Reator de mistura completa; AFBR: Reator anaeróbio de leito fluidizado; CIGSB: Reator de leito de lodo granular induzido; UASB: Reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo; IBRCS: *integrated biohydrogen reactor clarifier*. * testes em batelada - concentração de substrato (g DQO/L).

Na fermentação anaeróbia para produção de hidrogênio, ocorre baixa produção de H_2 por massa de substrato. Estequiometricamente é possível produzir até 4 mol H_2 /mol glicose e 3 mol H_2 /mol glicerol (SARMA *et al.*,2012; XIE *et al.*,2008).

Por outro lado, durante o processo de produção de hidrogênio, ocorre a formação de ácidos orgânicos e álcoois que podem ser convertidos em metano em uma etapa posterior. Desta forma, a integração do processo hidrogenogênico a um sistema de produção de metano é uma alternativa que pode aumentar o aproveitamento energético durante a degradação da matéria orgânica complexa (HALLENBECK; ABO-HASHESH; GHOSH, 2012).

O balanço energético resultante do sistema que utiliza dois reatores anaeróbios em série, hidrogenogênico e metanogênico, a partir de um mesmo substrato pode ser maior, pois o hidrogênio possui valor energético muito maior que o metano (14,2 W.h/g para o metano e 33 W.h/g para hidrogênio) (PIELA; ZELANAY, 2004). Luo *et al.* (2011) estudaram dois reatores CSTR em série para produzir H_2 e CH_4 e concluíram que a energia recuperada ao fim do processo é 11% maior que em um sistema metanogênico unitário.

A produção combinada de hidrogênio e metano também foi estudada por Brunstermann e Widmann (2010) em sistema de dois reatores de fluxo contínuo e mistura completa (CSTR) em série. O funcionamento deste tipo de reator baseia-se na separação e recirculação de sólidos para aumentar a concentração de biomassa no reator. Os microrganismos crescem sem meio suporte e um agitador favorece o contato entre o microrganismo e o substrato, ao mesmo tempo em que evita a sedimentação de sólidos. De acordo com os autores, a concentração de hidrogênio pode atingir 60% do total do biogás, com TDH de 15 h, COV de 16 gDQO/L.d, temperatura entre 23 °C e 28 °C e pH entre 4,0 e 5,5.

Trabalhando com reatores CSTR em série, Fountoulakis e Manios (2009) utilizaram glicerol residual como co-substrato para avaliar o desempenho do reator para produção de hidrogênio e metano. O reator foi alimentado com esgoto municipal suplementado com 1% de glicerol residual para avaliar o impacto sobre a produção de H_2 que aumentou de 150 para 263 mL H_2 /d. Hafez, Nakhla e Naggari (2010) utilizaram um reator CSTR seguido de decantador secundário para produzir hidrogênio a partir de glicose. Neste tipo de sistema, o efluente do reator CSTR segue para o decantador para sedimentação do lodo que é recirculado para o reator,

para manter concentração elevada de biomassa ativa. Os autores reportaram produção de até 2,8 mol H₂/mol glicose, aplicando uma COV de 103 gDQO/L.d.

2.3.2. Inóculo e pré-tratamento

Durante a fermentação anaeróbia, o hidrogênio pode ser produzido por microrganismos dos domínios arqueias e bactéria (VERHAART *et al.*, 2010). Bactérias anaeróbias estritas ou anaeróbias facultativas tais como *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium pasteurianum*, *Enterobacter aerogenes*, e *Enterobacter cloacae*, e bactérias fotossintéticas representadas por *Rhodobacter sphaeroides* e *Rhodobacter capsulatus* são capazes de produzir hidrogênio de forma isolada ou em consórcio (LIU; GROT; LOGAN, 2005; NATH; DAS, 2004).

A vantagem no uso de culturas puras é que é possível selecionar uma linhagem específica que maximize a produção de H₂, como o gênero *Clostridium*, alcançando rendimentos muito superiores aos que utilizam culturas mistas (HILIGSMANN *et al.*, 2011). As desvantagens incluem a sensibilidade deste gênero à presença de O₂ no sistema e a necessidade de nutrientes específicos (KOSKINEN; KAKSONEN, 2007; YOKOI *et al.*, 1998). Por isso, o uso de bactérias em consórcio dispensa a necessidade de isolamento e purificação de uma cultura específica ou substrato específico, minimizando custos e facilitando a aplicação desses microrganismos em escala real (MOHAN, 2009).

Diferentes inóculos são utilizados em estudos que visam a produção de hidrogênio por fermentação anaeróbia (PENDYALA *et al.*, 2012; HILIGSMANN *et al.*, 2011; MOHAN, 2009; UENO; FUKUI; GOTO, 2007), mas estudos relatam a presença predominante de bactérias do gênero *Clostridium sp.* e *Enterobacter sp.*, bem como microrganismos que estão filogeneticamente relacionados a estes, em reatores anaeróbios para produção de H₂ a partir de resíduos orgânicos, como esgotos domésticos, industriais, resíduos alimentares e industriais, como o glicerol (SARMA *et al.*, 2012; LUO *et al.*, 2011; SKONIECZNY; YARGEAU, 2009; JO; TACONI, 2008; MOHAN; BABU; SARMA, 2008; ITO *et al.*, 2005; SHIN, 2004).

Além desses, outros microrganismos têm sido identificados em vários sistemas como produtores potenciais de hidrogênio, como *Selenomonas sp.*,

Coprothermobacter sp. e *Thermoanaerobacterium* sp. (HUNG; CHANG; CHANG, 2011). A presença ou não desses microrganismos está diretamente relacionada ao tipo de inóculo utilizado nas pesquisas.

A concentração do inóculo no meio também influencia a produção de hidrogênio e a taxa de degradação do substrato. De acordo com Ren *et al.* (2006), na produção de H₂, a concentração inicial do inóculo pode variar entre 2,6 e 23,7 g (sólidos voláteis – SV)/L. Seifert *et al.* (2009) trabalharam com lodo anaeróbio degradando glicerol, e observaram que o aumento da concentração do inóculo de 1,2 para 11,6 gSV/L diminuiu a produção de H₂ e de metabólitos como 1,3-propanodiol, ácido butírico e láctico. Os autores conseguiram η_{H₂} de 0,41 mol H₂/mol glicerol usando a menor concentração de lodo anaeróbio, independentemente da concentração de glicerol no reator. Provavelmente, o aumento na concentração do inóculo, diminuiu a atividade hidrogenogênica específica pela diminuição da carga orgânica aplicada ao lodo (COL).

Os microrganismos anaeróbios usados na produção de hidrogênio podem ser encontrados em diversas fontes, as quais podem, ou não, necessitarem de pré-tratamento antes de servirem como inóculo de reatores hidrogenogênicos. A eficiência do pré-tratamento é função do tipo de inóculo, devido a variações na diversidade das arqueias metanogênicas.

Para favorecer a produção de hidrogênio, a etapa de metanogênese deve ser interrompida (MCCARTY, 1964). Isso pode ser feito pelo controle dos parâmetros operacionais, ou pela manipulação do lodo usado como inóculo no reator. Diversos tipos de pré-tratamento do lodo são propostos para eliminar a atividade de microrganismos produtores de metano, como choque térmico (WANG; WAN, 2008), adição de ácidos ou bases, congelamento seguido de descongelamento (ROSSI *et al.*, 2011), aeração (ZHU; BELAND, 2006), adição de produtos químicos, como o clorofórmio (NING *et al.*, 2012) ou ácido 2-bromoetano sulfônico (BESA) (KOSKINEN; KAKSONEN; PUHAKKA, 2007; CHEONG; HANSEN, 2006). A Tabela 2.2 mostra diversos estudos que utilizaram diferentes inóculos e os tipos de pré-tratamento utilizados para maximizar a produção de hidrogênio.

Alguns tipos de pré-tratamento do inóculo induzem a formação de esporos de algumas bactérias produtoras de hidrogênio e elimina a atividade de microrganismos que consomem hidrogênio para produção de metano (LEE; SONG; HWANG, 2009,

ROSSI *et al.*, 2011). Na maioria das espécies, a formação de esporos demora de seis a oito horas, enquanto a germinação demora, em média, de 60 a 90 min e envolve três etapas: ativação, germinação e desenvolvimento (TALARO; TALARO, 1996).

Quando condições adversas, como temperaturas elevadas, limitação de nutrientes, concentração elevada de produtos químicos, solventes orgânicos e radiação, são impostas a um meio contendo cultura mista de microrganismos, apenas os formadores de esporos sobrevivem, que são justamente os que produzem hidrogênio (DUANGMANEE *et al.*, 2007). Assim, em condições favoráveis, os esporos formados sob estresse ambiental, germinarão e formarão células vegetativas, voltando à sua atividade metabólica (CHEONG; HANSEN, 2006; KAPDAN; KARGI, 2006).

As principais formas de elevação de temperatura do lodo são fervura em banho-maria, auto-clavagem, secagem em estufa e aquecimento em forno (SONG *et al.*, 2012; OH; VAN GINKEL; LOGAN, 2003; AMORIM; BARROS; SILVA, 2010; AKUTSU *et al.*, 2009; SELEMBO *et al.*, 2009; VAN GINKEL; SUNG; LAY, 2001). A faixa de temperatura reportada na literatura para inativação das arqueias metanogênicas varia entre 85 e 150 °C (SUNG *et al.*, 2002; COSTA, 2010; BARROS *et al.*, 2011; AZBAR *et al.*, 2009) para tempo de contato entre 10 min e 2 h (KIM; HAN; SHIN, 2006; AKUTSU *et al.*, 2009; WU *et al.*, 2009). Apesar da discrepância encontrada nas pesquisas, a faixa de temperatura mais utilizada e com maior eficiência na produção de H₂ está entre 90 e 100 °C, com tempo de aquecimento de aproximadamente 15 min.

Sung *et al.* (2002) conduziram um estudo no qual o inóculo pré-tratado termicamente (100 °C durante 15 min) foi submetido a choques de calor repetidos ao longo da operação do reator (90 °C durante 20 min). O reator submetido aos choques de calor repetitivos alcançou η_{H_2} superior ao controle (2,2 e 1,8 mol H₂/mol sacarose, respectivamente), comprovando a eficiência deste método.

Tabela 2.2.Principais pré-tratamentos utilizados em consórcios anaeróbios para produção de hidrogênio.

Origem do inóculo	Pré-tratamento	Método	Referência
Lodo de digestor anaeróbio de uma ETE.	Choque de calor	Aquecimento do lodo a 90 °C por 10 min.	KIM; HAN; SHIN,2006.
Lodo de digestor anaeróbio primário de uma ETE.	Choque de calor	Aquecimento do lodo a 100 °C por 15 min.	WANG; WAN, 2008.
Lodo de reator UASB de ETAR (processamento de batata).	Choque de calor	Aquecimento do lodo a 105 °C por 4 h em forno.	GIORDANO; CANTÚ; SPAGNI,2011.
Lodo de reator UASB de uma ETAR (beneficiamento da soja).	Congelamento/descongelamento	Congelamento do lodo a - 10 °C por 24 h, seguido de descongelamento por 6 h em temperatura ambiente (30 °C).	ROSSI <i>et al.</i> , 2011.
Lodo de reator UASB de uma ETAR (beneficiamento da soja).	Secagem	Aquecimento do lodo em estufa por 2 h a 105 °C seguido de secagem em dessecador por 2 h.	ROSSI <i>et al.</i> , 2011.
Lodo de reator UASB de uma ETAR (beneficiamento da soja).	Ácido	Redução do pH para 3,0 (mantido por 24 h) usando HCl 2 M, seguido de correção do pH para 5,5.com NaOH 2 M	ROSSI <i>et al.</i> ,2011.
Lodo do decantador secundário de um sistema de lodos ativados tratando esgoto sanitário.	Alcalino	Aumento do pH para 13,0 com solução de KOH (mantido por 2 h), seguido de correção do pH para 5,5.	KANG; KIM; LEE,2012.
Lodo de reator anaeróbio de uma ETAR (produção de citrato).	Clorofórmio	Adição de clorofórmio (0,05%) à solução contendo o inóculo.	NING <i>et al.</i> ,2012.
Líquido do trato intestinal de ruminantes.	Clorofórmio	Adição de clorofórmio (0,9g/L) à solução contendo o inóculo.	BAUCHOP, 1967.
Lodo de reator UASB de uma ETAR (efluente químico).	Solução salina ácida	cultivo em solução de ácido sulfônico 2-bromoetano (BESA, 0,2 g/L) por 24 h.	MOHAN; BABU; SARMA,2008.

Obs.: ETE - estação de tratamento de esgoto doméstico; ETAR – Estação de tratamento de água residuária).

O tempo de partida dos reatores UASB hidrogenogênicos pode ser minimizado quando se utiliza pré-tratamento térmico do lodo (JUNG; KIM; SHIN,2011). Para

confirmar isto, o lodo proveniente de um digestor anaeróbio de uma estação de tratamento de esgoto sanitário foi pré-tratado termicamente (90 °C durante 20 min), e aclimatado em um reator CSTR por sete dias. Após esse período, o lodo foi transferido para um reator UASB. Foi observado que esse pré-tratamento térmico e a aclimação prévia no reator CSTR provocou granulação em duas semanas, enquanto que em outro reator UASB, inoculado com o mesmo lodo sem pré-tratamento, o tempo médio para formação de grânulos foi de aproximadamente 24 semanas.

Outra forma de eliminar a atividade metanogênica do inóculo e que também induz à formação de esporos, é a variação do pH da mistura de lodo. Com este método, é possível selecionar microrganismos formadores de esporos quando a cultura mista é exposta a valores de pH fora da faixa de valores que eles estão adaptados.

Segundo Penteado (2012), reatores com inóculos submetidos a tratamento ácido têm operação mais estável e alcançam η_{H_2} maiores em comparação aos que foram inoculados com lodo tratados termicamente. Os principais ácidos utilizados para este fim são o ácido clorídrico e o ácido sulfúrico, e como base, se utiliza hidróxido de sódio (LEE; SONG; HWANG,2009; HU; CHEN, 2007; ROSSI *et al.*,2011).

Lee, Song e Hwang (2009) avaliaram a influência do pré-tratamento ácido na produção de H_2 com lodo de uma estação de tratamento de esgoto doméstico. Após o pré-tratamento, foi observada a predominância da linhagem *Clostridium* no inóculo, que resultou em uma produção 2,3 vezes maior de H_2 do que no inóculo sem pré-tratamento ácido. O método empregado por esses autores baseou-se na adição de solução de ácido clorídrico (35%) ao lodo anaeróbio até pH = 2. Após 24 h, o pH foi corrigido para 5,5 com uma solução de NaOH 2 N. Com essa estratégia, os autores mostraram que houve seleção de bactérias mais hábeis à produção de hidrogênio, como as do gênero *Clostridium*, que é uma das linhagens mais predominantes para produção de H_2 (BARROS *et al.*, 2011; HUNG; CHANG; CHANG, 2011; LEE; SONG; HWANG, 2009).

Rossi *et al.* (2011) estudaram pré-tratamento com choque de pH alcalino em um lodo de um reator UASB de uma indústria de processamento de soja para produção de H_2 . No método utilizou-se uma base forte (NaOH) para elevar o pH de 7 para 10

por 24 h. Os resultados não foram satisfatórios, pois o pH elevado suprimiu tanto a atividade das bactérias consumidoras de H₂, como das BPH. Isso porque, apesar de a linhagem *Clostridium* ser tolerante a estas variações de pH, outras bactérias hidrogenogênicas, como *Klebsiella* e *Enterobacter*, são muito sensíveis a valores de pH acima de 6 (VAN GINKEL; SUNG; LAY, 2001).

Além disto, tanto as bactérias homoacetogênicas, como as espécies *Clostridium aceticum* e *Clostridium autotrophicum* também são formadoras de esporos e, em ambiente com condições favoráveis, podem consumir H₂ para produzir acetato (CHEONG; HANSEN, 2006). Este fato também foi observado por Oh, Van Ginkel e Logan (2003), que afirmam que a acetogênese causa queda da produção de H₂, e que este tipo de pré-tratamento não inibe o metabolismo.

Além de ácidos e bases fortes, a adição de outras substâncias químicas ao lodo anaeróbio também pode selecionar a biomassa produtora de H₂ pela inibição da atividade de microrganismos metanogênicos (CHEONG; HANSEN, 2006). Clorofórmio (CHCl₃) e o ácido 2-bromoetano sulfônico (BESA) podem ser usados para este fim, em concentrações que podem variar entre 0,025 e 0,200% para CHCl₃ (NING *et al.*, 2012), e 0,2 g/L para BESA (LIU *et al.*, 2008), dependendo do tipo de inóculo, condições de cultivo e substrato utilizado. Tanto o BESA quanto o clorofórmio possuem estrutura semelhante à da coenzima M, presente nas arqueias metanogênicas, que inibe a atividade dessa enzima, bloqueando a etapa da metanogênese.

Ning *et al.* (2012), estudando bactérias dos gêneros *Clostridium*, *Megasphaera* e *Janthinobacterium*, observaram que a concentração de clorofórmio não pode exceder 0,125%, visto que concentrações superiores a esta inativam essas bactérias. Esses pesquisadores investigaram concentrações diferentes de CHCl₃ (entre 0,025 e 0,200%) para promover a produção de H₂ a partir de glicose e concluíram que os melhores resultados são atingidos com proporção de 0,05%, com produção máxima de H₂ de 0,03 L H₂/L.h, produção molar máxima de H₂ de 2,02 mol H₂/ mol glicose e 99,9% de eficiência de utilização do substrato.

Concentrações maiores de clorofórmio inibem o processo de produção de hidrogênio e reduzem a produção molar. Isso foi confirmado no estudo de Wang e Wan (2008), que utilizaram clorofórmio (2%) para tratar o inóculo oriundo de um

digestor de uma estação de tratamento de esgoto doméstico e conseguiram η_{H_2} de, apenas, 0,69 mol H_2 /mol glicose.

A redução de pH pode atuar de forma combinada com a adição de compostos químicos inibidores de arqueias metanogênicas, promovendo a produção de H_2 , como proposto por Mohan, Babu e Sarma (2008). Estes pesquisadores operaram reatores em batelada alimentados com resíduos da indústria de laticínios. O pré-tratamento do inóculo consistiu de ajuste do pH do lodo para 5,0 com ácido ortofosfórico e adição de solução BESA de 0,2 g/L, por 24 h. Com isso, obtiveram um η_{H_2} 16 vezes maior que o do controle. Estes pesquisadores também concluíram que, nesse caso, somente a redução de pH não inibe completamente a atividade metanogênica, sendo necessária a adição de BESA para inativação da coenzima M responsável pela produção de metano.

Apesar de as técnicas de pré-tratamento de lodo serem bastante eficientes, alguns pesquisadores utilizaram processo de fermentação natural para produzir hidrogênio (PENTEADO, 2012; JUNG; KIM; SHIN, 2010; LEITE *et al.*, 2008), e se detiveram em controlar as condições operacionais do reator, como o pH, TDH e COV, sem pré-tratamento do inóculo.

A fermentação natural ocorre quando se deixa a solução contendo substrato em repouso e os microrganismos presentes no meio se multiplicam, levando à formação de ácidos orgânicos e hidrogênio (LEITE *et al.*, 2008). Com isso, a produção de H_2 pode ocorrer, dispensando o uso de culturas puras e minimizando os custos relacionados com o pré-tratamento e aquisição do inóculo.

Penteado (2012) testou a fermentação natural de uma solução à base de sacarose, comparando-a com diferentes inóculos pré-tratados termicamente e com ácido, e concluiu que quando a fermentação natural foi usada, o η_{H_2} foi semelhante àqueles nos quais os inóculos foram pré-tratados (2,1 mol H_2 /mol sacarose).

Outros autores também inibiram a atividade metanogênica de um inóculo sem o uso de pré-tratamentos, controlando as condições operacionais do reator, de forma a favorecer o crescimento de BPH (WON; LAU, 2011; LUO *et al.*, 2011). Demirel e Yenigun (2006) mostraram que a atividade de organismos produtores de metano diminuiu drasticamente quando o TDH dos reatores CSTR foi reduzido de 16 para

12 h devido ao fato de que a velocidade de crescimento das arqueias ser cerca de quatro vezes menor do que a de BPH (PAVLOSTATHIS; GIRALDO-GOMEZ, 1991).

Na biomassa presente em reatores UASB para produção de H₂, os grânulos bacterianos são compostos, principalmente, por bactérias acidogênicas produtoras de hidrogênio, que crescem rapidamente, e, dessa forma, mantêm pH abaixo do ideal para a metanogênese (entre 6,5 e 8,0) (JUNG; KIM; SHIN, 2010).

2.3.3. Concentração do substrato

A concentração do substrato afeta a produção de hidrogênio, o que pode estimular, inibir, ou ser tóxica para os microrganismos. Amorim, Sader e Silva (2012) e Van Ginkel, Sung e Lay (2001) verificaram que um aumento na concentração de substrato no meio provocou queda na produção de hidrogênio, porque o metabolismo das BPH foi inibido devido à acumulação de ácidos graxos voláteis (AGV). O melhor η_{H_2} foi alcançado com 30 gDQO/L.

Concentrações muito elevadas do substrato podem inibir a atividade microbiana pela queda brusca no pH provocada pelo acúmulo de ácidos produzidos, que também aumenta a pressão parcial de hidrogênio. Por outro lado, utilizando sacarose como substrato, a produção de hidrogênio diminui quando a concentração de substrato diminui (KIM; HAN; SHIN, 2006).

A concentração de substrato também é fundamental para determinar o ponto ótimo de germinação dos esporos, e prevenir re-esporulação de bactérias por limitação de substrato (TORTORA, 2005). A concentração ideal para a produção de hidrogênio varia com o tipo de substrato, e esses dois fatores (tipo e concentração de substrato) devem ser avaliados de forma conjunta (WICHER; THIEL; LANIECKI, 2010).

Como o glicerol residual possui concentração elevada de matéria orgânica facilmente biodegradável (1,2 gDQO/g glicerol) ele é considerado uma fonte excelente e pode ser utilizado como substrato na digestão anaeróbia (VIANA *et al.*, 2012a). Ito *et al.* (2005) conseguiram produzir 1,05 mol H₂/mol glicerol, enquanto que Seifert *et al.* (2009) e Selembo *et al.* (2009) obtiveram 0,41 e 0,28 mol H₂/mol glicerol, respectivamente.

Estudos em batelada conduzidos por Wu *et al.* (2011), utilizando solução de glicerol com 60,9 gDQO/L, a 35 °C, pH = 6,0 e uma cultura isolada de *Klebsiella* sp. resultaram em η_{H_2} de 0,345 mol H₂/mol glicerol. Os autores também testaram uma concentração maior de glicerol (85,2 gDQO/L), mas o rendimento caiu para 0,152 mol H₂/mol glicerol, com aumento na produção de 1,3-propanodiol (1,3-PDO). Isso ocorreu porque o excesso de glicerol no metabolismo de *Klebsiella* faz com que mais NADH₂ seja usado para produção de 1,3-PDO, no lugar de produzir H₂.

Akutsu *et al.* (2009) conduziram uma série de estudos para avaliar o η_{H_2} a partir de diferentes tipos de substrato (amido, glicerol residual, óleo e peptona). De todos os substratos testados, o glicerol e o amido foram os mais eficientes para a produção de H₂, com η_{H_2} variando entre 0,10 e 0,34 mol H₂/mol glicerol e 0,17 e 1,50 mol H₂/mol amido, enquanto que os demais não produziram quantidade significativa de H₂.

Algumas impurezas como sais e catalisadores contidos no glicerol residual podem afetar negativamente a biodigestão, pois inibem o crescimento bacteriano (CHATZIFRAGKOU; PAPANIKOLAOU, 2012). Apesar disso, nos experimentos de Mangayil, Karp e Santala (2012) o η_{H_2} a partir do glicerol residual foi três vezes maior que o do glicerol puro quando utilizado como substrato. Estes autores sugeriram que isso ocorreu devido ao cultivo dos microrganismos em um meio feito à base de glicerol puro, antes do início do teste, o que indicaria adaptação prévia.

2.3.4. Carga Orgânica Volumétrica

A COV aplicada ao reator anaeróbio influencia diretamente os processos bioquímicos da comunidade microbiana, uma vez que pode inibir ou estimular a atividade da biomassa (MARIKAKIS *et al.*, 2011; SHEN; BAGLEY; LISS, 2009). Existem divergências sobre a COV que proporciona maiores rendimentos de produção de H₂, podendo variar desde 6 a 480 kgDQO/m³.d (VAN GINKEL; LOGAN, 2005; WU *et al.*, 2006).

O estudo da influência da COV sobre a produção de hidrogênio foi realizado por Mariakakis *et al.* (2011) em um reator anaeróbio de mistura completa (CSTR) em escala de laboratório, utilizando sacarose e nutrientes como substrato. Os reatores foram operados com COV entre 10 e 30 kgDQO/m³.d e, de acordo com os

resultados obtidos, aplicando COV de 22,5 kgDQO/m³.d, obtiveram-se os maiores η_{H_2} (1,72 mol H₂/mol sacarose).

Resultado semelhante foi encontrado por Shen, Bagley e Liss (2009), que alcançaram as maiores taxas de produção de H₂ em um experimento que comparou um reator CSTR com um biorreator de membrana (MBR). A produção foi de 1,78 mol H₂/mol glicose nos dois reatores sob COV de aproximadamente 22 kgDQO/m³.d. No entanto, analisando os reatores isoladamente, quando COV foi aumentada para 30 kgDQO/m³.d, o desempenho do reator CSTR foi melhor, mantendo a mesma produção molar, enquanto que a produção de gás no MBR diminuiu para 1,49 mol H₂/mol glicose.

Porém, outras pesquisas mostram que a produção de H₂ por massa de substrato é maior em COV's elevadas. Isso foi confirmado por Davila-Vazquez *et al.* (2009) utilizando soro de queijo como substrato. A COV foi aumentada de 62 até 207 kgDQO/m³.d em um reator CSTR e a maior produção molar de hidrogênio (2,8 mol/mol lactose) ocorreu com COV igual a 155,6 kgDQO/m³.d. Acima desse valor houve sobrecarga no sistema, havendo um decréscimo no η_{H_2} de 2,8 para 2,0 mol H₂/mol lactose. De qualquer forma, a microbiota apresentou melhor rendimento com uma alta carga comparada a sistemas convencionais.

Ao contrário das pesquisas que mostram bons rendimentos quando são aplicadas COV elevadas, Van Ginkel e Logan (2005) demonstraram que a produção de hidrogênio é maior quando se diminui a COV. Eles utilizaram glicose como substrato e produziram, no máximo, 2,8 mol/mol glicose com COV de 6 kgDQO/m³.d, enquanto que com as maiores COV's aplicadas (48, 72, 96 kgDQO/m³.d) os autores obtiveram 1,9 mol H₂/mol glicose. Eles afirmaram que o acúmulo excessivo de gás hidrogênio no líquido provocou inibição dos produtos finais e comprometeu a atividade da enzima hidrogenase, como foi sugerido por Ruzicka (1996).

2.3.5. pH e Temperatura

Qualquer método de produção biológica de hidrogênio é dependente de enzimas produtoras de H₂ (hidrogenases) produzidas pelos microrganismos presentes no processo. Temperatura e pH exercem influência direta sobre o desenvolvimento das

bactérias produtoras de hidrogênio, pois afetam a atividade de suas enzimas essenciais, e têm influência especialmente sobre a atividade do ferro contido nas enzimas hidrogenases [FeFe] e hidrogenases [NiFe] (KAPDAN; KARGI, 2006).

Temperaturas próximas à da digestão anaeróbia mesofílica (25 a 40° C) e estudos reportam a uma temperatura ótima na faixa de 30 a 37° C (WON; LAU, 2011). No entanto, dependendo da especificidade do microrganismo, temperaturas elevadas podem provocar desnaturação das enzimas, comprometendo o metabolismo, e também aumentam a fluidez das membranas, causando hidrólise da célula (RAMPELOTTO, 2010).

O aumento da temperatura em reatores anaeróbios pode aumentar a taxa de hidrólise de partículas complexas além de ser ambientalmente viável, pois a energia requerida para a operação de reatores termofílicos é menor que a energia convertida e recuperada na forma de hidrogênio, o que torna o processo sustentável (DINAMARCA; BAKKE, 2011).

Temperaturas termofílicas também promovem aumento da taxa metabólica, além de modificar a estrutura da comunidade, pois, segundo Liu, Chan e Fang(2002), em reatores acidogênicos, bactérias termofílicas têm taxa de crescimento maior que as mesofílicas.

Diversos pesquisadores avaliaram a produção de hidrogênio em reatores termofílicos (AZBAR *et al.*, 2009; KARGI; EREN; OZMIHCI, 2012). Azbar *et al.* (2009) alcançaram η_{H_2} de 1,17 mol H₂/mol glicose enquanto Kargi, Eren e Ozmihci (2012) alcançaram valor próximo (1,03 mol H₂/mol glicose) a uma temperatura de 55 °C. Todos os autores utilizaram soro de queijo como substrato. Azbar *et al.* (2009) afirmam que temperaturas termofílicas aumentam os rendimentos da produção de H₂ e eliminam possíveis consumidores de H₂.

Kim e Kim (2012) também avaliaram a produção de H₂ em condições termofílicas (aproximadamente 60° C) com bactérias da linhagem *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* em reatores CSTR. O estudo mostrou que nestas condições esses microrganismos produziram hidrogênio a partir de diferentes substratos (amido, sacarose, celbiose, xilose, galactose e glicose), com η_{H_2} que pode variar entre 1,31 e 2,69 mol H/mol hexose, a depender do substrato.

Dong *et al.* (2011) observaram que em um reator UASB mesofílico alimentado com glicose era possível obter η_{H_2} de 1,09 mol/mol glicose, enquanto que em condições termofílicas o η_{H_2} aumentava para 1,53 mol/mol glicose. De acordo com os autores, em temperaturas de, aproximadamente, 55°C, a produção de lodo é menor e a eficiência de remoção de DQO é alta (98%), o que justifica a preferência pelo uso de sistemas anaeróbios termofílicos. Além disto, devido à temperatura elevada, os grânulos apresentaram propriedades físicas (alta densidade e velocidade de sedimentação) que proporcionaram boa retenção do lodo no reator e alta resistência às flutuações ambientais.

O pH também exerce grande influência sobre o desempenho das bactérias em reatores para produção de hidrogênio, pois, mantém a atividade dos microrganismos hidrogenogênicos, enquanto que suprime a atividade dos microrganismos que não estão envolvidos no processo (MOHAN, 2009).

A concentração de íons H^+ no ambiente extracelular controla a direção das rotas metabólicas e o estado de ionização de grupos funcionais de enzimas envolvidas na catálise, afetando as taxas de produção de H_2 (FABIANO; PEREGO, 2012). As bactérias acidogênicas, que são determinantes para a produção de H_2 , tem atividade metabólica mais elevada em pH na faixa entre 4,0 e 6,0 (HWANG *et al.*, 2004), enquanto que as metanogênicas têm atividade ótima na faixa entre 6,0 e 7,5 (VAN GINKEL; SUNG; LAY, 2001).

Bactérias anaeróbias dificilmente conseguem suportar ambientes com pH abaixo de 5,0. Devido a isso, elas reduzem a quantidade de ácidos orgânicos presentes no meio por reações bioquímicas que diminuem a concentração de prótons externos à célula, proporcionalmente ao pH da cultura ou impedem a formação desses ácidos redirecionando as rotas metabólicas (NATH; DAS, 2004; FANG; LIU, 2002).

Wang e Wan (2011) avaliaram os efeitos combinados de temperatura e pH sobre a produção de hidrogênio em reatores em batelada utilizando culturas mistas com a proposta de obter parâmetros ótimos para a produção fermentativa de H_2 . Os resultados mostraram que pH inicial de 6,9 a 37,4 °C, resultou na maior taxa de produção de H_2 (9,61 mL/g glicose). Porém, a eficiência máxima de degradação do substrato ocorreu a 37,8 °C e pH 7,1. Won e Lau (2011) também realizaram uma série de estudos com o mesmo reator, mas utilizando sacarose como substrato com o objetivo de analisar o efeito dos principais parâmetros na produção de H_2 ,

incluindo o pH. Segundo esses autores, pH 4,5 resultou no maior η_{H_2} (2,16 mol H_2 /mol hexose) pois permitiu o desenvolvimento de bactérias hidrogenogênicas e inibiu o crescimento das metanogênicas. Os autores afirmam que o controle de pH tem papel determinante nas rotas metabólicas dos microrganismos produtores de hidrogênio e pode afetar a composição do efluente.

Mesmo em condições ideais para o desenvolvimento das bactérias hidrogenogênicas, a produção de H_2 ainda é baixa comparada à de metano, porque, mesmo com inibição das metanogênicas, ainda há consumo de H_2 pelas bactérias homoacetogênicas que podem ser encontradas em pH entre 4,0 e 8,0. Essas bactérias utilizam hidrogênio para formação de acetato, formiato ou metanol. Entretanto, a atividade das arqueias metanogênicas acetoclásticas é completamente inibida em pH abaixo de 6,0 (DINAMARCA; BAKKE, 2011).

Apesar de várias pesquisas mostrarem que o pH ótimo para produção de hidrogênio está na faixa de 5,0 a 5,5, outros estudos relatam a produção de H_2 fora dessa faixa. Davila-Vazquez *et al.* (2008) afirmam que um pH próximo da neutralidade (7,5) estimula a adaptação e crescimento das BPH em sistemas controlados a 37 °C. Para isso, os autores estudaram reatores em batelada alimentados com glicose (5,3 gDQO/L), soro de queijo (16,8 gDQO/L) e lactose (5,6 gDQO/L), com valores de pH entre 3,88 e 8,12 e observaram maior η_{H_2} (3,6 mol H_2 /mol lactose) em pH neutro.

Skonieczny e Yargeau (2009) também avaliaram a influência do pH inicial sobre a produção de H_2 com bactérias da espécie *Clostridium beijerincki*, utilizando água residuária sintética como substrato. A eficiência máxima de conversão do substrato e produção diária de hidrogênio (10,3 mL H_2 / gDQO.L e 86,4 mL H_2 /d, respectivamente) ocorreu em pH de 6,3.

A influência da temperatura e do pH também foi avaliada por Lee *et al.* (2008) na produção biológica de hidrogênio a partir de amido de mandioca. Para isso os autores testaram diferentes valores de pH (entre 5,5 e 7,0) em temperaturas mesofílica e termofílica (37 e 55 °C). O maior η_{H_2} em condições mesofílicas (37° C), foi obtido com pH de 5,5 (10,9 mmol H_2 /gDQO), bem como o melhor aproveitamento do substrato (98%), crescimento celular e formação de metabólitos. Isso indica que nessa faixa de pH as células bacterianas utilizam melhor o amido para seu crescimento e que a população microbiana era predominantemente mesofílica.

Mangayil, Karp e Santala (2012) também avaliaram o potencial de bioconversão do glicerol residual a hidrogênio em função do pH inicial e da temperatura do cultivo dos microrganismos. Eles concluíram que o pH inicial de 6,5 e temperatura de 40 °C resultou na maior produção de H₂ e utilização do substrato (rendimento de 1,1 mol H₂/mol glicerol e conversão de 36,7% da matéria orgânica). O aumento da temperatura para 46 °C resultou na diminuição do crescimento celular e da utilização do substrato. A maior produção de hidrogênio em pH = 6,5 também foi comprovada por Fabiano e Perego (2002) que avaliaram a influência do pH sobre a produção de H₂ por culturas puras de *Enterobacter aerogenes* utilizando amido hidrolisado como substrato e obtiveram rendimento de 1,09 mol H₂/mol substrato.

2.3.6. Nutrientes

A suplementação de nutrientes auxilia na composição da estrutura celular, na síntese de enzimas, no crescimento e na atividade bacteriana, suprindo possíveis carências durante a produção de hidrogênio a partir de diferentes substratos (LIU *et al.*, 2011; FOUNTOULAKIS; MANIOS, 2009).

Elementos como, K, Mg, Ca e Fe atuam como cofatores de algumas enzimas e estão presentes na composição de exoenzimas e de paredes celulares. Nas células bacterianas, o íon Na⁺ participa dos processos de transporte intracelulares e o fósforo, na forma de H₃PO₄, participa da composição dos ácidos nucleicos, fosfolípidios e nucleotídeos (GOTTSCHALK, 1986).

Elementos como S, Fe e Ni são componentes indispensáveis para a ação da enzima hidrogenase, que atua na produção de H₂, pois participam da composição dessa e de outras enzimas (GOTTSCHALK, 1986).

Argun *et al.* (2008) estudaram a influência da concentração de N e de P e as relações C/N e C/P na produção de hidrogênio a partir de farinha de trigo. A farinha de trigo é rica em carboidratos, mas deficiente em nutrientes como nitrogênio, fósforo e outros minerais. Os autores concluíram que as melhores relações foram C/N= 200 e C/P= 1000, obtendo-se η_{H₂} máximo de 2,02 mol H₂/mol amido. Além disto, N e P devem ser adicionados na razão N/P=5 para alcançar atividade hidrogenogênica e rendimento máximos.

2.3.7. Tampão

Carbonatos (CO_3^{2-}) e fosfatos (PO_4^{3-}), além, de desempenharem a função de nutrientes, também têm a capacidade de tamponar o meio. O íon carbonato tem relação direta com o CO_2 , que é um dos produtos gasosos da digestão anaeróbia. Portanto, um aumento na concentração de carbonatos resulta em aumento da fração de CO_2 no biogás, devido à dissolução de CO_3^{2-} no meio.

O íon bicarbonato dissolvido no meio também pode reagir com ácidos orgânicos gerando CO_2 adicional e diminuindo a capacidade de tamponamento (DAVILA-VAZQUEZ *et al.*, 2011). De acordo com Lin e Lay (2004b), uma alternativa para aumentar a fração de H_2 no biogás é diminuir a concentração de carbonatos no afluente ou utilizar fosfatos em substituição ao carbonato. Os pesquisadores analisaram o efeito de vários compostos (NH_4HCO_3 , NaHCO_3 , Na_2CO_3 , K_2HPO_4 , KH_2PO_4 e Na_2HPO_4) com diferentes concentrações e correlacionaram à produção de hidrogênio. Observaram que o maior η_{H_2} (56ml H_2 /g sacarose) ocorreu com o uso de NH_4HCO_3 , mas que concentrações elevadas de NH_4HCO_3 promovem o aumento da concentração do íon amônio, que pode causar toxicidade em pH elevado.

O fosfato de sódio (Na_2HPO_4) é alcalinizante e doador de íons fosfato e, em concentrações muito altas ou muito baixas diminui a produção de H_2 . Lin e Lay (2004a) compararam diferentes concentrações de fosfato de sódio em um reator CSTR inoculado com lodo proveniente de uma estação de tratamento de esgoto sanitário, e concluíram que para COV de 10 kgDQO/ m^3 .d, a melhor concentração de Na_2HPO_4 foi 30 mg/L, obtendo-se produção de até 1,68 mol H_2 /mol sacarose). Essa concentração também resultou num decréscimo da fase *lag* da microbiota. Um aumento ou decréscimo de 30% na concentração desse composto causou uma queda de até 40% na produção de hidrogênio. Os autores também estudaram a influência da relação C/N na produção de hidrogênio, e encontraram que o máximo η_{H_2} foi alcançado em uma relação C/N igual a 47 (LIN; LAY, 2004b).

2.4. DIVERSIDADE MICROBIANA EM REATORES ANAERÓBIOS PRODUTORES DE HIDROGÊNIO

As mudanças na composição da microbiota de sistemas controlados ocorrem em função das condições ambientais. Diversos autores estudaram as mudanças nas

comunidades microbianas e a diversidade em reatores anaeróbios para produção de hidrogênio em função de parâmetros como, configuração do reator, pH, temperatura, COV e pré-tratamento do inóculo (HAFEZ; NAKHLA; NAGGAR, 2010; KIM *et al.*, 2010; BABU; MOHAN; SARMA, 2009; MARIAKAKIS *et al.*, 2011; MOHAN; BABU; SARMA, 2008; WON; LAU, 2011).

Em sistemas controlados, como os reatores anaeróbios, as mudanças nas condições operacionais e ambientais, até que se atinja o estabelecimento de uma comunidade de microrganismos adaptados, corresponde ao período de partida do reator. As condições ambientais no reator podem ser controladas por pH, temperatura, concentração do substrato, vazão afluente, adição de microrganismos, inibidores específicos, etc. Portanto, dados sobre o desempenho do reator e evolução microbiana durante este período obtidos por técnicas moleculares, são indispensáveis pois podem revelar a correlação entre a produção de H₂ e a comunidade bacteriana em diferentes estágios durante o período de partida (CASSERLY; ERIJMAN., 2003; BUZZINI *et al.*, 2006; REN *et al.*, 2010).

Apesar de os reatores UASB serem amplamente usados para remoção de matéria orgânica, sua aplicação para outros fins requer maior conhecimento sobre vários aspectos de funcionamento e interdependência das populações de microrganismos na estrutura da comunidade microbiana (VERONEZ *et al.*, 2005; CASSERLY; ERIJMAN, 2003). De acordo com Ren *et al.* (2010), algumas espécies inoculadas no reator podem desaparecer ou permanecer, bem como novas espécies podem surgir. Portanto, o período de partida do reator é importante para o estabelecimento da comunidade clímax (DEMIREL; YENIGUN, 2006; LIU; CHAN; FANG, 2002).

Segundo Xing *et al.* (2005), a eficiência de produção de H₂ depende de outras populações, que contribuem para o equilíbrio da comunidade, além das bactérias hidrogenogênicas. Culturas mistas de bactérias promovem interações ecológicas (cooperação e competição), sendo que cada população possui características funcionais que são importantes a cada estágio de operação do reator, contribuindo para o bom desempenho deste e para o estabelecimento da sucessão. Xing *et al.* (2005) estudaram a sucessão ecológica em reatores anaeróbios, e observaram que somente após 21 dias de operação, houve aumento da atividade dos microrganismos e da produção de gás com até 59% de H₂ (9,1 L/d). Isso ocorreu

devido ao aumento da população de BPH e estabelecimento de outras populações devido ao controle dos parâmetros, como TDH (6 h), COV (27 kgDQO/m³.d), temperatura (35 °C) e pH (4,0 a 4,5), o que ocasionou o estabelecimento da comunidade clímax. Os autores afirmam que até o 21º dia, a diversidade dentro do reator era constantemente alterada devido a mudanças populacionais por competição. Isso foi comprovado pelas mudanças frequentes dos produtos metabólicos finais durante esse período e pelo fato de o reator não haver, ainda, entrado em estado estacionário (*steady-state*), que corresponde ao estágio no qual os parâmetros operacionais, eficiência de conversão do substrato, produção de biogás, pH, alcalinidade, e tempo de retenção celular, não sofrem grandes variações.

As mudanças na dinâmica da comunidade microbiana dentro de um reator de leite fluidizado em modo contínuo ou em batelada, também foram estudadas por Koskinen, Kaksonen e Puhakka (2007) em função do TDH e COV. Nos dois modos de operação foi observada a presença de *Clostridium butyricum*, no entanto ela esteve mais presente durante a operação em modo contínuo, quando ocorreu produção elevada de hidrogênio e de ácido butírico. Por outro lado, as concentrações elevadas de propionato no efluente estavam relacionadas à baixa produção deste gás e à presença de *Desulfuvibrio desulfuricans*, redutora de sulfato e consumidora de hidrogênio.

Também segundo os autores, o biofilme aderido ao meio suporte continha concentrações elevadas de bactérias produtoras de propionato, que estão relacionadas com a baixa produção de H₂. Por isso o processo baseado em crescimento aderido não é vantajoso para a produção de H₂, pois o biofilme agrega mais consumidores ao invés de produtores de hidrogênio. De acordo com Koskinen, Kaksonen e Puhakka (2007) e Li, Song e Hwang (2009), a produção de propionato resulta em decréscimo da produção de hidrogênio, porque esta rota metabólica não tem H₂ como subproduto.

Algumas bactérias não estão diretamente ligadas à produção de hidrogênio, mas são essenciais ao equilíbrio do sistema. Um exemplo disto é a espécie *Escherichia coli*, anaeróbia facultativa, que consome traços de O₂ no meio e cria um ambiente propício para que os anaeróbios obrigatórios possam produzir hidrogênio (CHENG *et al.*, 2011).

Isso também foi confirmado por Huang *et al.* (2010) em estudos de sucessão microbiana em um reator CSTR, que não utilizou atmosfera de N₂ para eliminar o oxigênio no reator. Durante a fase *lag*, foi observada a dominância do gênero *Bacillus* sp. anaeróbio facultativo. Com o crescimento de bactérias desse gênero, o oxigênio presente no meio se esgotou e o ambiente tornou-se favorável ao desenvolvimento dos anaeróbios estritos, como as espécies *C. beijerinckii* e *C. perfringers*, que dominaram a fase exponencial e estacionária do experimento, sendo *C. perfringers*, a maior produtora de H₂ de acordo com os autores.

No entanto, outros estudos mostraram que a redução gradativa do TDH diminui a diversidade da comunidade bacteriana por perda da biomassa (CHEN; LIN; CHANG, 2001; DEMIREL; YENIGUM, 2006). No trabalho de Chen, Lin e Chang(2001), a redução gradativa do TDH, resultou na diminuição do número de células dos gêneros *Pseudomonas* e *Streptococcus* sp. Segundo os autores, isso ocorreu devido à lavagem do lodo pela redução do TDH, que diminui o tempo de residência de algumas espécies devido ao baixo tempo de contato com o substrato, fato observado também em estudos posteriores realizados por Mariakakis *et al.*(2011).

Demirel e Yenigum (2006) afirmam que as velocidades ascendentes elevadas no reator anaeróbio, provocadas pela redução do TDH (de 20 para 12 h), dificultam a sedimentação da biomassa inicial devido à morfologia da microbiota presente no sistema, que era composta principalmente por bactérias filamentosas. Assim, a redução do TDH também é uma forma de eliminar a comunidade de arqueias metanogênicas do reator, pois um TDH entre 2 e 4 h implica em uma carga hidráulica mais elevada, com velocidades ascendentes maiores, o que provoca o arraste das bactérias filamentosas do gênero *Methanosaeta* (PENTEADO, 2012; FANG; LIU; ZHANG, 2002).

Lin, Wu e Hung (2008) avaliaram a influência da temperatura sobre as mudanças na comunidade bacteriana e na utilização de xilose. De modo geral, o metabolismo aumentou quando houve aumento da temperatura de 35 para 40° C. No entanto as comunidades nessas duas faixas de temperaturas apresentaram composições diferentes: as espécies *Clostridium intestinale* e *Klebsiella pneumoniae* dominaram a comunidade em temperatura de 35° C, e *Bacillus* sp. em temperatura de 40° C, com bactérias produtoras de butirato também presentes nessa

temperatura. Nessa faixa de temperatura, o η_{H_2} foi de, apenas, 0,08 mol H_2 /mol xilose a 35° C e de 0,07 mol H_2 /mol xilose a 40 °C.

Com a mudança de temperatura para a faixa termofílica (entre 50 e 55° C) houve nova mudança na comunidade com o surgimento de espécies termofílicas (*Clostridium* sp.), com produção elevada de butirato e produção mínima de propionato, que ocorreram simultaneamente com o maior η_{H_2} (0,2 mol H_2 /mol xilose), quando comparada à faixa mesofílica.

Essa influência da temperatura sobre a diversidade da comunidade microbiana está diretamente ligada à especificidade das enzimas presentes em cada tipo de bactéria, que funciona de forma ótima em uma determinada faixa de temperatura e que controla a direção das rotas metabólicas (DINAMARCA; BAKKE, 2011).

Em condições termofílicas, utilizando glicerol puro como substrato, Sittijunda e Reungsang (2012) observaram a dominância do gênero *Thermoanaerobacterium* sp. com condições ótimas de operação e exatamente quando a produção de hidrogênio foi mais alta. A produção desse gás aumentou com o aumento da concentração de fosfato na solução de nutrientes.

Provavelmente isso ocorreu porque o íon PO_4^{3-} é fundamental para a síntese de RNA, DNA e ATP dos microrganismos produtores de H_2 . Quando a concentração de glicerol aumentou de 19 para 28 g/L, houve o surgimento de *Geobacillus* e *Bacillus* sp., *Alicyclobacillus pohliae* e *Eubacteriaceae bacterium*. Quando a concentração do substrato foi menor (15 g de glicerol/L), *Geobacillus* sp. e *Alicyclobacillus pohliae* não foram mais detectados, enquanto novos gêneros surgiram, como *Thermoanaerobacterium* e *Alicyclobacillus* sp. Foi observada a permanência de *Lactobacillus hilgardii* em várias concentrações de glicerol (15, 19, 20 e 28 g/L), o que mostra a resistência dessa espécie às variações de carga orgânica.

Apesar de a produção de hidrogênio estar mais comumente relacionada ao gênero *Clostridium* sp., durante os estudos dirigidos por Xing *et al.* (2005) as mudanças na comunidade indicaram que *Ethanoligenbacterium* sp. tornou-se o gênero dominante quando a produção de H_2 aumentou rapidamente. Esse gênero é estritamente acidofílico e, o fato de o reator ter sido mantido em pH baixo (4,0 a 4,5), foi crucial para a dominância desse gênero.

Além disso, ambientes com pH abaixo da neutralidade permitem alta eficiência no uso de ATP por parte das acidofílicas (TEMUDO *et al.*, 2008). Segundo Xing *et al.* (2005), após 28 d de experimento, a composição da comunidade se tornou estável, alcançando o clímax, com bactérias dos gêneros *Clostridium*, *Acidovorax* e *Kiuvera* sp. Entre o 7º e 14º dia, algumas espécies desapareceram gradativamente, provavelmente em função do aumento da COV de 12 para 17 kgDQO/m³.d. Outras linhagens, como a espécie *Clostridiaceae bacterium*, surgiram ao fim do período de partida, mas não desempenharam papel importante na produção de hidrogênio, mantendo o equilíbrio da comunidade.

Mudanças no tipo e concentração de substrato afetam a dinâmica de uma comunidade microbiana (TEMUDO *et al.*, 2008; JO *et al.*, 2007). Temudo *et al.* (2008) observaram a estabilidade de determinadas populações em três diferentes substratos: glicose, glicerol e xilose. O inóculo foi extraído de efluente de uma destilaria e de efluente de reator acidogênico de uma indústria de processamento de amido de batata. Pelo fato de o glicerol ser o composto com maior grau de redução dentre os três estudados, e, dessa forma, uma fração maior ser convertida a diferentes compostos, foi observada uma maior diversidade utilizando esse substrato.

Nesse experimento, as principais espécies encontradas no glicerol foram: *Pectinatus frisingensis*, *Clostridium intestinale* e *Klebsiella oxytoca*, conhecidas pela habilidade de degradação de glicerol. Com o aumento da concentração de glicerol (de 4 para 23 g/L) houve pequena mudança na composição da comunidade: a espécie entérica *C. intestinale* desapareceu, enquanto aumentou a biomassa de *K. oxytoca*, mostrando tolerância a concentrações elevadas desse substrato como já reportado por Homann *et al.* (1990).

Essa pequena mudança na composição da comunidade sugere que algumas populações mudam seu metabolismo, resultando em diferentes produtos metabólicos formados, Cheng *et al.* (2011) observaram uma relação simbiótica entre essas espécies, já que *Klebsiella* sp. consome o oxigênio presente no meio, favorecendo o surgimento dos anaeróbios obrigatórios (*Clostridium*) para produção de H₂.

Jo *et al.* (2007) analisaram mudanças no consórcio microbiano em um reator que produzia hidrogênio. Inicialmente os pesquisadores operaram um reator anaeróbio

inoculado com bactérias do gênero *Clostridium*, utilizando como substrato, resíduo de alimentos de um refeitório de uma universidade local. Ao longo do experimento foram adicionados restos de vegetais fermentados por uma variedade de bactérias lácticas. Essa mudança na composição do substrato provocou o crescimento de bactérias lácticas que inibiram a produção de hidrogênio pelo excesso de ácido láctico no meio. Provavelmente, *Lactobacillus* sp. entrou no sistema juntamente com o efluente, provocando efeitos negativos na atividade de produção de hidrogênio pelo gênero *Clostridium* sp (LEVIN; PITT; LOVE,2004).

A variação na diversidade também pode ocorrer em função da COV aplicada ao sistema (MARIKAKIS *et al.*, 2011; KAWAGOSHI *et al.*, 2005). Mariakakis *et al.* (2011) observaram que o aumento da COV de 11 para 34 kg DQO/m³.d promoveu mudanças na comunidade do reator. No início da operação foram detectadas bactérias homoacetogênicas (consumidoras de H₂) que logo em seguida desapareceram do sistema. Isso pode ter ocorrido devido ao acúmulo de alguns metabólitos produzidos pelas bactérias acidogênicas, que crescem mais rapidamente que as bactérias homoacetogênicas (SOLERA; ROMERO; SALES,2002). Ao fim do experimento (com COV de 34 kgDQO/m³.d) foi detectado o gênero *Selenomonas* sp., bactérias que produzem os ácidos propiônico e acético. Como, nestas condições, a formação de ácido propiônico consome hidrogênio, a produção de H₂ é mínima. A maior produção deste gás foi alcançada em COV de 22 kgDQO/m³.d, com predominância do gênero *Clostridium*. Provavelmente *Clostridium* sp. foi sensível ao aumento da COV e não foi mais detectado no sistema com COV de 34 kgDQO/m³.d.

Estudos também relacionam a diversidade microbiana ao tipo de pré-tratamento aplicado ao inóculo (NING *et al.*, 2012; PENDYALA *et al.*, 2012). Os pré-tratamentos aplicados aos inóculos têm o objetivo de alterar a diversidade bacteriana, inibindo e estimulando algumas espécies do consórcio, de forma a aumentar a formação de metabólitos específicos, como por exemplo, o hidrogênio (NING *et al.*,2012; PENDYALA *et al.*,2012).

Enquanto tratamentos como o choque de calor e pH se baseiam na formação de esporos e eliminação de microrganismos não formadores de esporos (DUANGMANEE *et al.*, 2007), tratamentos com adição de químicos tem como objetivo apenas inibir a atividade metanogênica pela inibição da coenzima-M

redutase (ABREU; DANKO; ALVES,2008), o que resulta em diferentes índices de diversidade.

Após observarem a influência de diversos pré-tratamentos (térmico, choque de carga, ácido, alcalino, ácido linoleico, BESA), Pendyala *et al.* (2012) afirmam que o pré-tratamento térmico é o mais eficiente e gera maior diversidade de bactérias hidrogenogênicas. Enquanto que no tratamento com ácido linoleico, a atividade das bactérias homoacetogênicas foi reduzida, mas estas não desapareceram completamente, o que demonstra menor eficiência na produção de H₂. Apesar das diferenças após todos os pré-tratamentos as populações dominantes foram dos gêneros *Clostridium* e *Enterococcus*, mostrando eficiência dos tratamentos na bioaumentação de microrganismos produtores de H₂.

Ning *et al.* (2012) buscaram estratégia diferente, utilizando clorofórmio para o pré-tratamento. Estes pesquisadores conseguiram inibir completamente a atividade das homoacetogênicas no inóculo. Por meio da técnica de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE), os autores obtiveram diversas bandas que variavam conforme a concentração de clorofórmio mudava. À medida que aumentava a concentração deste composto, observou-se o aumento da intensidade de algumas bandas enquanto outras diminuía. Esses resultados sugerem que é possível selecionar populações específicas a partir do controle da concentração de clorofórmio no pré-tratamento. Durante os experimentos, houve estabilidade da produção de H₂ em diferentes concentrações desse reagente, o que indica boa adaptação das bactérias hidrogenogênicas a diversas concentrações de CHCl₃.

Chang *et al.* (2008) conduziram estudos que analisavam o impacto do TDH sobre a diversidade microbiana em um reator CSTR alimentado com melaço. À medida que o TDH era reduzido de 12 para 3 h, a produção de hidrogênio aumentava. No entanto, apesar de a maior taxa de produção de hidrogênio (aproximadamente 390 mmol H₂/L.d) ocorrer quando o reator era operado com o menor TDH (3 h), o maior η_{H_2} (2,1 molH₂/mol hexose) foi encontrada com TDH de 12 h. Algumas espécies, como *Olsenella uli* foram encontradas apenas quando o reator foi operado com TDH de 6 h, e *Chryseobacterium meningosepticum* em TDH de 12 h. No entanto, espécies como, *Bifidobacterium pseudocatenulatum*, *Neisseria subflava*, e *Alcaligenes sp.* permaneceram em diferentes valores de TDH. Isto ocorreu provavelmente porque essas espécies podem ter diferentes taxas de

crescimento e estruturas morfológicas, o que não permite aumento da biomassa microbiana dependendo do TDH (PENTEADO, 2012).

Os autores também observaram que as espécies *Bifidobacterium adolescentis* e *Suterella stercoricanis* que estavam presentes apenas no substrato, desapareceram ao entrarem no sistema, além de outras espécies que permaneceram ao longo de toda a operação. Isso mostra a resistência de certas espécies às variações e estresses ambientais. Os autores concluíram que apesar das mudanças em função das variações das condições operacionais, as linhagens detectadas (*C. meningosepticum*, *B. pseudocatenulatum*, *N. subflava* e *Alcaligenes sp.*) não mostraram relação direta com a produção de hidrogênio.

2.5. DISCUSSÃO FINAL

A produção de hidrogênio em reatores anaeróbios depende da configuração e do tipo do reator. Reatores UASB operados com cargas orgânicas elevadas e pH ácido são mais eficientes que reatores CSTR devido à alta concentração de biomassa rica em BPH na zona do leito de lodo, que impede o desenvolvimento de bactérias não produtoras de H₂ pela limitação do substrato. Os reatores de leito fixo também podem ser utilizados para geração de hidrogênio, mas grande variedade de espécies pode ficar aderida ao meio suporte, inclusive as consumidoras de H₂ e isso pode reduzir a produção de hidrogênio quando o leito é fixo.

Fatores operacionais e ambientais como temperatura, pH, concentração do substrato, tipo e pré-tratamento do inóculo, e suplementação com nutrientes, afetam a atividade de enzimas específicas para produção de hidrogênio. O controle desses parâmetros deve ser feito de forma a se obter o melhor η_{H_2} .

Temperaturas muito altas podem inativar enzimas envolvidas na produção de hidrogênio e no crescimento celular. Por outro lado, temperaturas muito baixas reduzem a atividade metabólica. O pH pode variar de 4,0 a 7,0 dependendo do inóculo e substrato utilizados, pois atua sobre enzimas específicas de cada microrganismo. O tipo de inóculo e de pré-tratamento utilizado vai determinar a diversidade contida nos sistemas. Essa diversidade, ligada à produção de H₂, é representada, principalmente, por diferentes espécies do gênero *Clostridium*, conhecidos por sua capacidade de resistir a estresses ambientais como

temperaturas elevadas, deficiência de carbono e nitrogênio e outros tipos de perturbações ambientais impostas pelos pré-tratamentos.

Além desses fatores, cada tipo de substrato tem uma degradabilidade específica, que pode facilitar ou dificultar a geração de H₂ por microrganismos específicos. Além da necessidade por fonte de carbono, os microrganismos necessitam de suplementação com nutrientes específicos que auxiliam na composição da estrutura celular, na síntese de enzimas e no crescimento, além de auxiliar a atividade metabólica suprindo possíveis carências durante o processo de produção de H₂.

A maneira como cada parâmetro afeta a atividade enzimática dos microrganismos, determina a rota metabólica e a produção dos metabólitos formados, incluindo hidrogênio. As rotas metabólicas estão estreitamente ligadas à diversidade microbiana do consórcio, sendo que os gêneros mais indicados para a produção fermentativa de H₂ são *Clostridium*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter* e outros filogeneticamente relacionados a estes.

Entender a influência de todos estes fatores na fermentação anaeróbia é fundamental para o desenvolvimento de processos industriais de produção de H₂. A questão é otimizar a produção por meio de técnicas de manipulação genética, como super-expressão de enzimas específicas; manter o controle de parâmetros cruciais, como pH entre 5,0 e 5,5; e buscar fontes de inóculos (lodo de esgotos sanitários, por exemplo) e substratos (resíduos orgânicos) que sejam viáveis do ponto de vista técnico e econômico. Técnicas como a fermentação natural parecem ser eficientes para produção de H₂ e dispensam o uso de culturas puras ou linhagens inviáveis pelo alto custo.

As técnicas de pré-tratamento do inóculo, apesar de mostrarem bons resultados e serem bastante utilizadas, podem ser dispensadas, quando o controle dos parâmetros operacionais do reator é efetivo. Manter o pH ácido e aplicar COV elevada é suficiente para inibir a atividade metanogênica e manter, no reator, biomassa rica em BPH, que suporta variações de carga orgânica e temperatura. Apesar da grande variedade de métodos alternativos para a produção de H₂, a fermentação anaeróbia a partir de resíduos orgânicos, como o glicerol, subproduto da indústria do biodiesel, pode ser uma alternativa promissora, aliada ao uso de

inóculos oriundos de fontes de fácil acesso e com grande disponibilidade na natureza, o que torna a produção, além de viável, ambientalmente sustentável.

2.6. REFERÊNCIAS

ABREU, A.A.; DANKO, A.S.; ALVES, M.M., 2008. Biohydrogen production with an EGSB reactor using chloroform and 2-bromoethanesulfonate as inhibitors of hydrogen consuming bacteria. *Book of Abstracts of the 10th International Chemical and Biological Engineering Conference – CHEMPOR 2008*: 205-206.

ABREU, A.A.; DANKO, A.S.; ALVES, M.M., 2007. Bio-hydrogen production in an EGSB reactor under mesophilic, thermophilic and hyperthermophilic conditions. *11th IWA World Congress on Anaerobic Digestions*, Brisbane, Australia.

AKUTSU, Y.; LEE, D.-Y.; LI, Y.-Y.; NOIKE, T., 2009. Hydrogen production potentials and fermentative characteristics of various substrates with different heat-pretreated natural microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34 (13): 5365–5372.

AMORIM, E. L. C.; SADER, L. T.; SILVA, E. L., 2012. Effect of Substrate Concentration on Dark Fermentation Hydrogen Production Using an Anaerobic Fluidized Bed Reactor. *Applied biochemistry and biotechnology*, 166(5): 1248-1263.

AMORIM, E. L. C.; BARROS, A. R.; SILVA, E. L., 2010. Effect of alkalinity and organic loading rate in the fermentative H₂ production from an anaerobic fluidized bed reactor. *18th World Hydrogen Energy Conference 2010 - WHEC 2010*.

ANTONOPOULOU, G.; GAVALA, H. N.; SKIADAS, I. V.; LYBERATOS, G., 2011. Effect of substrate concentration on fermentative hydrogen production from sweet sorghum extract. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36 (8): 4843-4851.

ARGUN, H.; KARGI, F.; KAPDAN, I. K.; ZTEKIN, R., 2008. Biohydrogen production by dark fermentation of wheat powder solution: Effects of C/N and C/P ratio on hydrogen yield and formation rate. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33 (7): 1813–1819.

ARUNSRI, F.; REUNGSANG, A., 2011. Biohydrogen production from sugarcane bagasse hydrolysate by elephant dung: effects of initial pH and substrate concentration. *International Journal of Hydrogen Energy* 2011, 36: 8687-8696

AZBAR, N.; DOKGOZ, F. T. C.; KESKIN, T.; KORKMAZ, K. S.; SYED, H. M., 2009. Continuous fermentative hydrogen production from cheese whey wastewater under thermophilic anaerobic conditions. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34 (17): 7441–7447.

BABU, V. L.; MOHAN, S. V.; SARMA, P. N., 2009. Influence of reactor configuration on fermentative hydrogen production during wastewater treatment. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34 (8): 3305–3312.

BAGHCHEHSARAEI, 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 (15): 4064-4073.

BARROS, A. R.; ADORNO, M. A. T.; SAKAMOTO, I. K.; MAINTINGUER, S. I.; VARESCHE, M. B. A.; SILVA, E. L., 2011. Performance evaluation and phylogenetic characterization of anaerobic fluidized bed reactors using ground tire and pet as support materials for biohydrogen production. *Bioresource Technology*, 102 (4): 3840–3847.

BRUNSTERMANN, R.; WIDMANN R., 2010. Development of a combined bio-Hydrogen and methane production unit using dark fermentation. *18th World Hydrogen Energy Conference 2010 - WHEC 2010*.

BUZZINI, A. P.; SAKAMOTO, I. K.; VARESCHE, M. B.; PIRES, E.C., 2006. Evaluation of the microbial diversity in an UASB reactor treating wastewater from an unbleached pulp plant. *Process Biochemistry*, 41 (1): 168–176.

CAI, G.; JIN, B.; SAINT, C.; MONIS, P., 2011. Metabolic flux network and analysis of fermentative hydrogen production. *Biotechnology Advances*, 29 (4): 375–387.

CAI, M.L.; LIU, J.X.; WEI, Y.S., 2004. Enhanced biohydrogen production from sewage sludge with alkaline pretreatment. *Environmental Science and Technology*, 38: 3195–3202.

CAMERON, D. C.; CHAPLEN, F. W. R., 1997. Developments in metabolic engineering. *Biochemical Engineering*, 8: 175-180.

CASSERLY, C.; ERIJMAN, L., 2003. Molecular monitoring of microbial diversity in an UASB reactor. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 52: 7–12.

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 (5): 1579–1585.

CHANG, F.-Y.; LIN, C.-Y., 2004. Biohydrogen production using an up-flow anaerobic sludge blanket reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29 (1): 33–39.

CHATZIFRAGKOU, A.; PAPANIKOLAOU, S., 2012. Effect of impurities in biodiesel-derived waste glycerol on the performance and feasibility of biotechnological processes. *Applied Microbiology Biotechnology*, 95:13–27.

CHEN, X.; SUN, Y.; XIU, Z.; LI, X.; ZHANG, D., 2006. Stoichiometric analysis of biological hydrogen production by fermentative bacteria. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31 (4): 539–549.

CHEN, C. C.; LIN, C. Y.; CHANG, J. S., 2001. Kinetics of hydrogen production with continuous anaerobic cultures utilizing sucrose as the limiting substrate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57 (1-2): 56-64.

CHENG, C.-H.; HSU, S.-C.; WU, C.-H.; CHANG, P.-W.; LIN, C.-Y.; HUNG, C.-H., 2011. Quantitative analysis of microorganism composition in a pilot-scale fermentative biohydrogen production system. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36 (21): 14153-14161.

CHEONG, D.-Y.; HANSEN, C. L., 2006. Bacterial stress enrichment enhances anaerobic hydrogen production in cattle manure sludge. *Applied Microbiology Biotechnology*, 72: 635–643.

CHO, Y.; LEE, T., 2011. Variations of hydrogen production and microbial community with heavy metals during fermentative hydrogen production. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 17 (2) 340–345.

CHONG, M. L.; SABARATNAM, V.; SHIRAI, Y.; HASSAN, M. A., 2009. Biohydrogen production from biomass and industrial wastes by dark fermentation. *International Journal of hydrogen Energy*, 34: 3277–3287.

CHOOKAEW, T.; O-THONG, S.; PRASERTSAN, P., 2012. Fermentative production of hydrogen and soluble metabolites from crude glycerol of biodiesel plant by the newly isolated thermotolerant *Klebsiella pneumoniae* TR17. *International Journal of hydrogen Energy*, 37 (18): 13314-13322.

COLLET, C. 2004. Hydrogen production by *Clostridium thermolacticum* during continuous fermentation of lactose. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29 (24): 1479-1485.

COSTA, J. B. 2010. Produção biotecnológica de hidrogênio, etanol e outros produtos a partir do glicerol da reação de formação do biodiesel. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

CRUZ, F. E. 2010. Produção de hidrogênio em refinarias de petróleo: avaliação exérgica e custo de produção. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

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

DAVILA-VAZQUEZ, G.; LEÓN-RODRÍGUEZ, A.; ALATRISTE-MONDRAGÓNA, F.; RAZO-FLORES, E., 2011. The buffer composition impacts the hydrogen production and the microbial community composition in non-axenic cultures. *Biomass and Bioenergy*, 35 (7): 3174-3181.

DAVILA-VAZQUEZ, G.; COTA-NAVARRO, C. B.; ROSALES-COLUNGA, L. M.; LEÓN-RODRÍGUEZ, A.; RAZO-FLORES, E., 2009. Continuous biohydrogen production using cheese whey: Improving the hydrogen production rate. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34 (10): 4296–4304.

DAVILA-VAZQUEZ, G.; ALATRISTE-MONDRAGÓNA, F.; LEÓN-RODRÍGUEZ, A.; RAZO-FLORES, E., 2008. Fermentative hydrogen production in batch experiments using lactose, cheese whey and glucose: Influence of initial substrate concentration and pH. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33 (19): 4989-4997.

DEMIREL, B.; YENIGUN, O., 2006. Changes in microbial ecology in an anaerobic reactor. *Bioresource Technology*, 97 (10): 1201–1208.

DHARMADI, Y.; MURARKA, A.; GONZALEZ, R., 2006. Anaerobic fermentation of glycerol by *Escherichia coli*: a new platform for metabolic engineering. *Biotechnology and Bioengineering*, 94 (5): 821-829.

DICKS, A.L., 1996. Hydrogen generation from natural gas for the fuel cell systems of tomorrow. *Journal of Power Sources*, 61: 113.

DINAMARCA, C.; BAKKE, R., 2011. Process parameters affecting the sustainability of fermentative hydrogen production: A short-review. *International Journal of Energy and Environment*, 2 (6): 1067-1078.

DONG, F.; LI, W.-W.; SHENG, G.-P.; TANG, Y.; YU, H.-Q.; HARADA, H., 2011. An online-monitored thermophilic hydrogen production UASB reactor for long-term stable operation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36 (21):13559–13565.

DUANGMANEE, T.; PADMASIRI, S. I.; SIMMONS, J. J.; RASKIN, L.; SUNG, S., 2007. Hydrogen production by anaerobic microbial communities exposed to repeated heat treatments. *Water Environmental Research*, 79:975-983.

FABIANO, B.; PEREGO, P., 2002. Thermodynamic study and optimization of hydrogen production by *Enterobacter aerogenes*. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27: 149–156.

FAN, Y. 2004. Optimization of initial substrate and pH levels for germination of sporing hydrogen-producing anaerobes in cow dung compost. *Bioresource Technology*, 91(2): 189–193.

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

FANG, H. H. P.; LIU, H.; ZHANG, T. 2002. Characterization of a hydrogen-producing granular sludge. *Biotechnology & Bioengineering*, 78: 44-52.

FERCHICHI, M.; CRABBEA, E.; GIL, G.-H.; HINTZ, W.; ALMADIDYA, A., 2005. Influence of initial pH on hydrogen production from cheese whey. *Journal of Biotechnology*, 120 (4): 402–409.

FORREST, A. K.; SIERRA, R.; HOLTZAPPLE, M. T., 2010. Effect of biodiesel glycerol type and fermentor configuration on mixed-acid fermentations. *Bioresource Technology*, 101: 9185–9189.

FOUNTOULAKIS, M. S.; MANIOS, T., 2009. Enhanced methane and hydrogen production from municipal solid waste and agro-industrial by-products co-digested with crude glycerol. *Bioresource Technology*, 100 (12): 3043–3047.

FUKUROZAKI, S. H. 2011. Avaliação do ciclo de vida de potenciais rotas de produção de hidrogênio: estudos dos sistemas de gaseificação da biomassa e de energia solar fotovoltaica. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

GIORDANO, A.; CANTÚ, C.; SPAGNI, A. 2011. Monitoring the biochemical hydrogen and methane potential of the two-stage dark-fermentative process. *Bioresource Technology*, 102: 4474–4479.

GOTTSCHALK G. 1986. *Bacterial metabolism*. 2nd ed.: Springer. 359p..

GUO, W.-Q.; REN, N.-Q.; WANG, X.-J.; XIANG, W.-S.; MENG, Z.-H.; DING, J.; QU, Y.-Y.; ZHANG, L.-S., 2008. Biohydrogen production from ethanol-type fermentation of molasses in an expanded granular sludge bed (EGSB) reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(19): 4981-4988.

HAFEZ, H.; NAKHLA, G.; NAGGAR, H. E., 2010. A Novel Biological Hydrogen Production System : Impact of Organic Loading. *18th World Hydrogen Energy Conference 2010 - WHEC 2010*.

HALLENBECK, P. C.; ABO-HASHESH, M.; GHOSH, D., 2012. Strategies for improving biological hydrogen production. *Bioresource Technology*, 110: 1–9.

HALLENBECK, P. C., 2009. Fermentative hydrogen production: Principles, progress, and prognosis. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34 (17): 7379–7389.

HALLENBECK, P. C.; BENEMANN, J. R., 2002. Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes. *International Journal of Hydrogen Energy* 27: 1185–1193.

HAWKES, F. R.; HUSSY, I.; KYAZZE, G.; DINSDALE, R.; HAWKES, D. L., 2007. Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: Principles and progress. *International Journal of Hydrogen Energy*, 32 (2): 172–184.

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

HILIGSMANN, S.; MASSET, J.; HAMILTON, C.; BECKERS, L.; THONART, P., 2011. Comparative study of biological hydrogen production by pure strains and consortia of facultative and strict anaerobic bacteria. *Bioresource Technology*, 102: 3810–3818.

HOMANN, T.; TAG, C.; BIEBL, H.; DECKWER, W. D.; SCHINK, B., 1990. Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol by *Klebsiella* and *Citrobacter* strains. *Applied Microbiology Biotechnology*, 33(2):121–126.

HU, B.; CHEN, S., 2007. Pretreatment of methanogenic granules for immobilized hydrogen fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 32: 3266-3273.

HUANG, Y.; ZONG, W.; YAN, X.; WANG, R.; HEMME, C. L.; ZHOU, J.; ZHOU, Z., 2010. Succession of the bacterial community and dynamics of hydrogen producers in a hydrogen-producing bioreactor. *Applied and Environmental Microbiology*, 76 (10): 3387–3390.

HUNG, C.-H.; CHANG, Y.-T.; CHANG, Y.-J., 2011. Roles of microorganisms other than Clostridium and Enterobacter in anaerobic fermentative biohydrogen production systems – A review. *Bioresource Technology*, 102 (18): 8437–8444.

HWANG, M.H.; JANG, N.J.; HYUN, S.H.; KIM, I.S., 2004. Anaerobic bio-hydrogen production from ethanol fermentation: the role of Ph. *Journal of Biotechnology*, 111 (3): 297-309.

ITO, T.; NAKASHIMADA, Y.; SENBA, K.; MATSUI, T.; NISHIO, N., 2005. Hydrogen and Ethanol Production from Glycerol-Containing Wastes Discharged after Biodiesel Manufacturing Process. *Journal of bioscience and bioengineering*, 100 (3): 260–265.

JEONG, T.-Y.; CHA, G.-C.; YEOM, S. H.; CHOI, S. S., 2008. Comparison of hydrogen production by four representative hydrogen-producing bacteria. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 14 (3): 333–337.

JO, J. H.; LEE, D. S.; PARK, D.; CHOE, W.-S.; PARK, J. M., 2008. Optimization of key process variables for enhanced hydrogen production by *Enterobacter aerogenes* using statistical methods. *Bioresource Technology*, 99 (6): 2061–2066.

JO, J. H.; JEON, C. O.; LEE, D. S.; PARK, J. M., 2007. Process stability and microbial community structure in anaerobic hydrogen-producing microflora from food waste containing kimchi. *Journal of Biotechnology*, 131 (3): 300–308.

JOHNSON, D. T.; TACONI, K. A., 2007. The Glycerin glut: options for the value-added conversion of crude glycerol resulting from biodiesel production. *Environmental Progress*, 26(4): 338-348. 2007.

JUNG, K-W.; KIM, D-H.; SHIN, H-S., 2011. A simple method to reduce the start-up period in a H₂-producing UASB reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36 (2): 1466-1473.

JUNG, K.-W.; KIM, D.-H.; SHIN, H.-S., 2010. Continuous fermentative hydrogen production from coffee drink manufacturing wastewater by applying UASB reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35 (24): 13370–13378.

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

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

KARGI, F.; EREN, N. S.; OZMIHCI, S., 2012. Hydrogen gas production from cheese whey powder (CWP) solution by thermophilic dark fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37 (3): 2260-2266.

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

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

KOTHARI, R.; BUDDHI, D.; SAWHNEY, R.L., 2008. Comparison of environmental and economic aspects of various hydrogen production methods. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, 12:553–63.

KIM, D.-H.; KIM, M.-S., 2012. Thermophilic fermentative hydrogen production from various carbon sources by anaerobic mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37 (2): 2021-2027.

KIM, W.; HWANG, K.; SHIN, S. G.; LEE, S.; HWANG, S., 2010. Effect of high temperature on bacterial community dynamics in anaerobic acidogenesis using mesophilic sludge inoculum. *Bioresource Technology*, 101 (1): 517-522.

KIM, S.-H.; HAN, S.-K.; SHIN, H.-S., 2006. Effect of substrate concentration on hydrogen production and 16S rDNA-based analysis of the microbial community in a continuous fermenter. *Process Biochemistry*, 41 (1): 199–207.

KOSKINEN, P. E. P.; KAKSONEN, A. H.; PUHAKKA, J. A., 2007. The Relationship Between Instability of H₂ production and compositions of bacterial communities within a dark fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 97 (4): 742-758.

KOTAY, S. M.; DAS, D., 2008. Biohydrogen as a renewable energy resource: prospects and potentials. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33: 258–263.

KRAEMER, J. T.; BAGLEY, D. M., 2007. Improving the yield from fermentative hydrogen production. *Biotechnology Letters*, 29 (5): 685-695.

KUBIAK, P.; LEJA, K.; MYSZKA, K.; CELÍNSKA, E.; SPYCHAŁA, M.; SZYMANOWSKA-POWAŁOWSKA, D.; CZACZYK, K.; GRAJEK, W., 2012. Physiological predisposition of various *Clostridium* species to synthesize 1,3-propanediol from glycerol. *Process Biochemistry*, 47: 1308–1319.

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

LAY, S.S.; LEE, Y.-J.; NOIKE, T., 1999. Feasibility of biological hydrogen production from organic fraction of municipal solid waste. *Water Research*, 33 (11): 2579-2586.

LEE, M.-J.; SONG, J.-H.; HWANG, S.-J., 2009. Effects of acid pre-treatment on biohydrogen production and microbial communities during dark fermentation. *Bioresource Technology*, 100 (3): 1491–1493.

LEE, K.-S.; HSU, Y.-F.; LO, Y.-C.; LIN, P.-J.; LIN, C.-Y.; CHANG, J.-S., 2008. Exploring optimal environmental factors for fermentative hydrogen production from starch using mixed anaerobic microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33 (5): 1565–1572.

LEE, K.-S.; LO, Y.-C.; LIN, P.-J.; CHANG, J.-S., 2006. Improving biohydrogen production in a carrier-induced granular sludge bed by altering physical configuration and agitation pattern of the bioreactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31 (12): 1648–1657.

LEE, K.-S.; LIN, P.-J.; CHANG, J.-S., 2006. Temperature effects on biohydrogen production in a granular sludge bed induced by activated carbon carriers. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31 (4): 465–472.

LEITE, J. A. C.; FERNANDES, B. S.; POZZI, E.; BARBOZA, M.; ZAIAT, M., 2008. Application of an anaerobic packed-bed bioreactor for the production of hydrogen and organic acids. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33 (2): 579-586.

LEONETI, A. B.; ARAGÃO-LEONETI, V.; OLIVEIRA, S. V. W. B., 2012. Glycerol as a by-product of biodiesel production in Brazil: Alternatives for the use of unrefined glycerol. *Renewable Energy*, 45: 138-145.

LETTINGA, G; HULSHOFF POL, L. W.; ZEEMAN, G., 1999. *Lecture notes: Biological wastewater treatment*. Department of Environmental Technology, Wageningen University.

LEVIN, D. B.; PITT, L.; LOVE, M., 2004. Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29 (2): 173–185.

LI, J.; ZHENG, G.; HE, J.; CHANG, S.; QIN, Z., 2009. Hydrogen-producing capability of anaerobic activated sludge in three types of fermentations in a continuous stirred-tank reactor. *Biotechnology Advances*, 27 (5): 573–577.

LIN, C.-Y.; WU, C.-C.; HUNG, C.-H., 2008. Temperature effects on fermentative hydrogen production from xylose using mixed anaerobic cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33 (1): 43–50.

LIN, C. Y.; LAY, C. H., 2004. Effects of carbonate and phosphate concentrations on hydrogen production using anaerobic sewage sludge microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29 (3): 275–281.

LIN, C. Y.; LAY, C. H., 2004. Carbon/nitrogen-ratio effect on fermentative hydrogen production by mixed microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29 (1): 41-45.

LIU, Q.; ZHANG, X.; ZHOU, Y.; ZHAO, A.; CHEN, S.; QIAN, G.; XU, Z. P., 2011. Optimization of fermentative biohydrogen production by response surface methodology using fresh leachate as nutrient supplement. *Bioresource Technology*, 102 (18): 8661–8668.

LIU, Y.; YU, P.; SONG, X.; QU, Y., 2008. Hydrogen production from cellulose by co-culture of *Clostridium thermocellum* JN4 and *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* GD17. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33 (12): 2927–2933.

LIU, H.; GROT, S.; LOGAN, B. E., 2005. Electrochemically assisted microbial production of hydrogen from acetate. *Environmental Science & Technology*, 39 (11): 4317-4320.

LIU, W.-T.; CHAN, O.-C.; FANG, H. H. P., 2002. Microbial community dynamics during start-up of acidogenic anaerobic reactors. *Water Research*, 36 (13): 3203–3210.

LUO, G.; XIE, L.; ZHOU, Q.; ANGELIDAKI, I., 2011. Enhancement of bioenergy production from organic wastes by two-stage anaerobic hydrogen and methane production process. *Bioresource Technology*, 102 (18): 8700–8706.

MAINTINGUER, S. I.; FERNANDES, B. S.; DUARTE, I. C. S.; SAAVEDRA, N. K.; ADORNO, M. A. T.; VARESCHE, M. B. A., 2011. Fermentative hydrogen production with xylose by *Clostridium* and *Klebsiella* species in anaerobic batch reactors. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(21): 13508-13517.

MANGAYIL, R.; KARP, M.; SANTALA, V., 2012. Bioconversion of crude glycerol from biodiesel production to hydrogen. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37 (17): 1-7.

MARIAKAKIS, I.; BISCHOFF, P.; KRAMPEA, J.; MEYERA, C.; STEINMETZ, H., 2011. 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*, 36(17): 10690-10700.

MARKOV, S.A.; AVERITT, J.; WALDRON, B., 2011. Bioreactor for glycerol conversion into H₂ by bacterium *Enterobacter aerogenes*. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36 (1): 262-266.

MATHEWS, J.; WANG, G., 2009. Metabolic pathway engineering for enhanced biohydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34 (17): 7404–7416.

MCCARTY, P.L. 1964. Anaerobic waste treatment fundamentals, Part 3, toxic materials and their control. *Public works* 95: 91–94.

MOHAN, S. V. 2009. Harnessing of biohydrogen from wastewater treatment using mixed fermentative consortia: Process evaluation towards optimization. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34 (17): 7460–7474.

MOHAN, S. V.; BABU, V. L.; SARMA, P. N., 2008. Effect of various pretreatment methods on anaerobic mixed microflora to enhance biohydrogen production utilizing dairy wastewater as substrate. *Bioresource Technology*, 99 (1): 59–67.

MOHAN, S. V.; MOHANAKRISHNA, G.; RAGHAVULU, S. V.; SARMA, P. N., 2007. Enhancing biohydrogen production from chemical wastewater treatment in anaerobic sequencing batch biofilm reactor (AnSBBR) by bioaugmenting with selectively enriched kanamycin resistant anaerobic mixed consortia. *International Journal of Hydrogen Energy*, 32 (15): 3284-3292.

MORIMOTO, K.; KIMURA, T.; SAKKA, K.; OHMIYA, K., 2005. Overexpression of a hydrogenase gene in *Clostridium paraputrificum* to enhance hydrogen gas production. *FEMS Microbiology Letters*, 246: 229–234.

MU, Y.; ZHENG, X-J.; YU, H-Q., 2009. Determining optimum conditions for hydrogen production from glucose by an anaerobic culture using response surface methodology (RSM). *International Journal of Hydrogen Energy*, 34 (19): 7959-7963.

MU, Y.; YU, H-Q., 2006. Biological hydrogen production in a UASB reactor with granules. I: physicochemical characteristics of hydrogen-producing granules. *Biotechnology and Bioengineering*, 94 (5): 980-987.

NATH, K.; DAS, D., 2004. Improvement of fermentative hydrogen production: various approaches. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65 (5): 520–529.

NING, Y. Y.; JIN, D. W.; SHENG, G. P.; HARADA, H.; SHI, X.-Y., 2012. Evaluation of the stability of hydrogen production and microbial diversity by anaerobic sludge with chloroform treatment. *Renewable Energy*, 38(1): 253–257.

OH S. E.; VAN GINKEL S.; LOGAN B. E., 2003. The relative effectiveness of pH control and heat treatment for enhancing biohydrogen gas production. *Environmental Science Technology*, 37(22):5186–5190.

PATTRA, S.; SANGYOKA, S.; BOONMEE, M.; REUNGSANG, A., 2008. Bio-hydrogen production from the fermentation of sugarcane bagasse hydrolysate by *Clostridium butyricum*. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33 (19): 5256-5265.

PAVLOSTATHIS, S. G.; GIRALDO- GOMEZ, E., 1991. Kinetics of anaerobic treatment: a critical review. *Critical Review in Environmental Control*, 21: 411-490.

PENDYALA, B.; CHAGANTI, S. R.; LALMANA, J. A.; SHANMUGAM, S. R.; HEATH, D. D.; LAU, P. C. K. 2012. Pretreating mixed anaerobic communities from different sources: Correlating the hydrogen yield with hydrogenase activity and microbial diversity. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37 (17): 12175-12186.

PENTEADO, E. D. 2012. Influência da origem e do pré-tratamento do inóculo na produção de hidrogênio a partir de águas residuárias em biorreatores anaeróbios. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP.

PIELA, P.; ZELANAY, P., 2004. Researchers redefine the DMTC roadmap, *Fuel Cell Review 1*: 17-23.

RAMPELOTTO, P.H., 2010. Resistance of microorganisms to extreme environmental conditions and its contribution to astrobiology. *Sustainability*, 2: 1602-1623.

REN, L.; WU, Y.; REN, N.; ZHANG, K.; XING, D., 2010. Microbial community structure in an integrated A/O reactor treating diluted livestock wastewater during start-up period. *Journal of Environmental Sciences*, 22(5): 656–662.

REN, N.; WANG, A.; GAO, L.; XIN, L.; LEE, D-J.; SU, A., 2008. Bioaugmented hydrogen production from carboxymethyl cellulose and partially delignified corn stalks using isolated cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33 (19): 5250–5255.

REN N. Q.; LI, J. Z.; LI, B.; WANG, Y.; LIU, S. R., 2006. Biohydrogen production from molasses by anaerobic fermentation with a pilot-scale bioreactor system. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31: 2147–57.

ROSSI, D. M., COSTA, J. B.; SOUZA, E. A.; PERALBA, M. D. C. R.; SAMIOS, D.; AYUB, M. A. Z., 2011. Comparison of different pretreatment methods for hydrogen production using environmental microbial consortia on residual glycerol from biodiesel. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(8): 4814–4819.

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

SARMA, S. J.; BRAR, S. K.; SYDNEY, E. B.; BIHAN, Y. L.; BUELNA, G.; SOCCOL, C. R., 2012. Microbial hydrogen production by bioconversion of crude glycerol: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37 (8): 6473-6490.

SEIFERT, K.; WALIGORSKA, M.; WOJTOWSKI, M.; LANIECKI, M., 2009. Hydrogen generation from glycerol in batch fermentation process. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34 (9): 3671–3678.

SELEMBO, P. A.; PEREZ, J. M.; LLOYD, W. A.; LOGAN, B. E., 2009. Enhanced hydrogen and 1,3-propanediol production from glycerol by fermentation using mixed cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 104(6): 1098-1106.

SHEN, L.; BAGLEY, D. M.; LISS, S. N., 2009. Effect of organic loading rate on fermentative hydrogen production from continuous stirred tank and membrane bioreactors. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34 (9): 3689–3696.

SHIN, H. 2004. Hydrogen production from food waste in anaerobic mesophilic and thermophilic acidogenesis. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29(13): 1355–1363.

SILES-LOPEZ; J. A.; MARTIN, S. M. L.; CHICA, P. A. F.; MARTIN, M. A., 2009. Anaerobic digestion of glycerol derived from biodiesel manufacturing. *Bioresource Technology*, 100 (23):5609–5615.

SILVA, G. M.; SILVA, L. G. M.; OIKNINE, L.; DASSOLER, T. S., 2009. Produção biotecnológica de hidrogênio. Relatório de atividades, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.

SITTIJUNDA, S.; REUNGSANG, A., 2012. Media optimization for biohydrogen production from waste glycerol by anaerobic thermophilic mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37 (20): 15473-15482.

SKONIECZNY, M. T.; YARGEAU, V., 2009. Biohydrogen production from wastewater by *Clostridium beijerinckii*: Effect of pH and substrate concentration. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34 (8): 3288–3294.

SOLERA, R.; ROMERO, L. I.; SALES, D., 2002. The evolution of biomass in a two-phase anaerobic treatment process during start-up *Chemical and Biochemical Engineering*, 16 (1): 25-29.

SONG, Z-X.; DAI, Y.; FAN, Q-L.; LI, X-H.; FAN, Y-T.; HOU, H-W., 2012. Effects of pretreatment method of natural bacteria source on microbial community and biohydrogen production by dark fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37 (7): 5631-5636.

SONG, J.; AN, D.; REN, N.; ZHANG, Y.; CHEN, Y., 2011. Effects of pH and ORP on microbial ecology and kinetics for hydrogen production in continuously dark fermentation. *Bioresource Technology*, 102 (23): 10875–10880.

ŠPALKOVÁ, V., HUTŇAN, M., KOLESÁROVÁ, N., 2009. Selected problems of anaerobic treatment of maize silage. 36th *International Conference of Slovak Society of Chemical Engineering*, Tatranské Matliare.

SUNG, S.; RASKIN, L.; DUANGMANEE, T.; PADMASIRI, S.; SIMMONS, J. J., 2002. Hydrogen production by anaerobic microbial communities exposed to repeated heat treatments. *US DOE Hydrogen Program Review*.

TALARO, K.; TALARO, A. 1996. *Foundations of Microbiology*. 10th ed.: A Times Mirror Company. Dubuque, Iowa. 534p..

TEMUDO, M. F.; MUYZER, G.; KLEEREBEZEM, R.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M., 2008. Diversity of microbial communities in open mixed culture fermentations: impact of the pH and carbon source. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80 (6): 1121-1130.

TORTORA, G.R. 2005. *Microbiologia*. 8ª Ed. Porto Alegre: Artmed. 920p..

UENO, Y.; FUKUI, H.; GOTO, M., 2007. Operation of a two-stage fermentation process producing hydrogen and methane from organic waste. *Environmental Science & Technology*, 41 (4): 1413-1419.

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

VAN GINKEL, S. W.; SUNG, S.; LAY, J.-J., 2001. Biohydrogen production as a function of pH and substrate concentration. *Environmental Science & Technology*, 35(24): 4726-4730.

VERHAART, M. R. A.; BIELEN, A. A. M.; OOST, J. V. D.; STAMS, A. J. M.; KENGEN, S. W. M., 2010. Hydrogen production by hyperthermophilic and extremely thermophilic bacteria and archaea: mechanisms for reductant disposal. *Environmental Technology*, 31(8-9): 993-1003.

VERONEZ, R. G.; ORRA, A. A.; RIBEIRO, R.; ZAIAT, M.; RATUSZNEI, S. M.; RODRIGUES, J. A. D., 2005. A simplified analysis of granule behavior in asbr and uasb reactors treating low-strength synthetic wastewater. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 22 (3): 361-369.

VLASSIS, T.; ANTONOPOULOU, G.; STAMATELATOU, K.; LYBERATOS, G., 2012. Anaerobic treatment of glycerol for methane and hydrogen production. *Global NEST Journal*, 14 (2): 149-156.

VIANA, M. B.; FREITAS, A. V.; LEITÃO, R. C.; PINTO, G. A. S.; SANTAELLA, S. T., 2012. Anaerobic digestion of crude glycerol: a review. *Environmental Technology Reviews*, 1(1): 81–92.

- VIANA, M. B.; FREITAS, A. V.; LEITÃO, R. C.; SANTAELLA, S. T., 2012. Biodegradability and methane production potential of glycerol generated by biodiesel industry. *Water Science & Technology*, 66(10): 2217-2222.
- WANG, J.; WAN, W., 2011. Combined effects of temperature and pH on biohydrogen production by anaerobic digested sludge. *Biomass and Bioenergy*, 35 (9): 3896-3901.
- WANG, J.; WAN, W., 2008. Comparison of different pretreatment methods for enriching hydrogen-producing bacteria from digested sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33: 2934– 2941.
- WANG, C-H.; LIN, P-J.; CHANG, J-S., 2006. Fermentative conversion of sucrose and pineapple waste into hydrogen gas in phosphate-buffered culture seeded with municipal sewage sludge. *Process Biochemistry*, 41: 1353-1358.
- WICHER, E.; THIEL, M.; LANIECKI, M., 2010. Hydrogen generation from waste glycerol in dark fermentation process. *18th World Hydrogen Energy Conference 2010 - WHEC 2010*.
- WON, S. G.; LAU, A. K., 2011. Effects of key operational parameters on biohydrogen production via anaerobic fermentation in a sequencing batch reactor. *Bioresource Technology*, 102 (13): 6876–6883.
- WU, K-J.; LIN, Y-H.; LO, Y-C.; CHEN, C-Y.; CHEN, W-M.; CHANG, J-S., 2011. Converting glycerol into hydrogen, ethanol, and diols with a *Klebsiella* sp. HE1 strain via anaerobic fermentation. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 42 (1): 20–25.
- WU, X.; YANG, H.; GUO, L., 2010. Effect of operation parameters on anaerobic fermentation using cow dung as a source of microorganisms. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35 (1): 46–5.
- WU, X.; ZHU, J.; DONG, C.; MILLER, C.; LI, Y.; WANG, L.; YAO, W., 2009. Continuous biohydrogen production from liquid swine manure supplemented with glucose using an anaerobic sequencing batch reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34 (16): 6636–6645.
- WU, S. Y.; HUNG, C. H.; LIN, C. N.; CHEN, H. W.; LEE, A. S.; CHANG, J. S., 2006. Fermentative hydrogen production and bacterial community structure in high-rate

anaerobic bioreactors containing silicone-immobilized and self-flocculated sludge. *Biotechnology & Bioengineering*, 93: 934–946.

XIE, B. CHENG, J.; ZHOU, J.; SONG, W.; CEN, K., 2008. Cogeneration of hydrogen and methane from glucose to improve energy conversion efficiency. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(19): 5006-5011.

XING, D.; REN, N.; GONG, M.; LI, J.; LI, Q., 2005. Monitoring of microbial community structure and succession in the biohydrogen production reactor by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Science in China Series C Life Sciences*, 48 (2): 155—162.

YAZDANI, S. S.; GONZALEZ, R., 2008. Engineering *Escherichia coli* for the efficient conversion of glycerol to ethanol and co-products. *Metabolic Engineering*, 10 (6): 340–351.

YOKOI, H.; MORIS, S.; HIROSE, J.; HAYASHI, S.; TAJASAKI, Y., 1998. H₂-production from starch by a mixed culture of *Clostridium butyricum* and *Rhodobacter* sp. M-19. *Biotechnology Letters*, 20:895–899.

YOKOYAMA, H.; OHMORI, H.; WAKI, M.; OGINO, A.; TANAKA, Y., 2009. Continuous hydrogen production from glucose by using extreme thermophilic anaerobic microflora. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 107 (1): 64–66.

YU, J; TAKAHASHI, P., 2007. Biophotolysis-based hydrogen production by cyanobacteria and green microalgae. *Communicating current research and educational topics and trends in applied microbiology*: 79–89.

ZHAO, B-H.; YUE, Z-B.; ZHAO, Q-B.; MU, Y.; YU, H-Q.; HARADA, H.; LI, Y-Y., 2008. Optimization of hydrogen production in a granule-based UASB reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33: 2454–2461.

ZHU, H.; BÉLAND, M., 2006. Evaluation of alternative methods of preparing hydrogen producing seeds from digested wastewater sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31 (14): 1980-1988.

ZOETEMEYER, R. J.; VAN DEN HEUVEL, J. C.; COHEN, A., 1982. pH Influence on acidogenic dissimilation of glucose in an anaerobic digester. *Water Research*, 16: 303–311.

3. INFLUÊNCIA DO INÓCULO E DO PRÉ-TRATAMENTO NA DIVERSIDADE MICROBIANA E NA PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO A PARTIR DO GLICEROL

RESUMO

A produção fermentativa de hidrogênio pode ser maximizada pela escolha da microbiota mais adequada e aplicação de técnicas para inibição de possíveis consumidores de H_2 . Neste trabalho, avaliou-se a influência de diferentes pré-tratamentos (choque de calor, adição de clorofórmio e choque ácido) e diferentes inóculos (lodo de uma estação de tratamento de esgoto doméstico, lodo de uma estação de tratamento de efluentes de uma indústria de alimentos e líquido ruminal de caprinos) sobre a diversidade microbiana e sobre a produção de hidrogênio. Pelas análises de biologia molecular concluiu-se que os pré-tratamentos são determinantes na composição da comunidade microbiana e que a produtividade (η_{H_2}) está diretamente relacionada à diversidade. O lodo de uma estação de tratamento de esgoto doméstico sem pré-tratamento foi o que apresentou maior diversidade e maior rendimento da produção de H_2 (0,37 mol H_2 /mol glicerol). A produção de ácidos orgânicos (acético, butírico e propiônico) ocorreu de forma variada e não mostrou relação direta com a produção de H_2 . O impacto dos distúrbios (pré-tratamentos) foi diferente e resultou em índices de diversidade diferentes. O pré-tratamento térmico reduziu a diversidade e a riqueza de espécies por ser um distúrbio considerado mais forte que os demais. Isto mostra que um distúrbio moderado, como a diminuição do pH, que ocorre devido à elevada carga orgânica aplicada durante os ensaios, é suficiente para aumentar a diversidade e inibir a atividade metanogênica, evitando o consumo do H_2 produzido.

Palavras chave: Dinâmicas populacionais; distúrbio ambiental; digestão anaeróbia; rendimento da produção de H_2 .

ABSTRACT

The fermentative production of hydrogen can be maximized by inoculating the reactors with appropriate microorganisms and application of techniques for inhibiting possible H₂ consumers. In this study, the effect of different pre-treatments (heat shock, addition of chloroform and acid shock) and different inoculum (sludge from a municipal wastewater treatment plant, sludge from a wastewater treatment plant of an food industry and rumen fluid of goats) on the microbial diversity and on the hydrogen production were evaluated. The results show that the pre-treatments are crucial in the composition of the microbial community, and the η_{H_2} is directly related to the microbial diversity. The sludge from a municipal wastewater treatment plant without any pre-treatment showed the highest diversity and η_{H_2} (0.37 mol H₂/mol glycerol). The production of organic acids (acetic, butyric and propionic) had no direct relationship with the production of H₂. The impact of the disturbances (pre-treatment) was different and resulted in different levels of diversity. The thermal pre-treatment reduced the diversity and richness of the species, as it caused the higher impact on the microbiota. This shows that a moderate disturbance, such as the decrease in pH, which occurs due to the high organic load imposed during the specific hydrogen activity assays is sufficient to increase diversity and inhibit methanogenic activity, avoiding the consumption of the produced H₂.

Keywords: Populational dynamics, environmental disturbance; anaerobic digestion; H₂ yield

3.1. INTRODUÇÃO

A produção fermentativa de H₂ pode ser boa alternativa ao uso de combustíveis fósseis, pois possui baixo custo comparada a outros processos de produção, não gera gases substâncias causadoras do efeito estufa, possui alta energia por unidade de massa (122 kJ/g), além de poder utilizar resíduos orgânicos como fonte de carbono (ZHANG *et al.*, 2012; ANTONOPOULOU *et al.*, 2011).

O fator-chave do processo de produção de H₂ é a seleção adequada dos microrganismos envolvidos. O tipo de inóculo deve ser escolhido tendo em vista a viabilidade econômica, a composição e a diversidade. Isso porque a diversidade de espécies em alguns ecossistemas aumenta a produtividade (MACARTHUR, 1955). A diversidade também contribui para o equilíbrio do sistema e o torna mais resistente a variações nos parâmetros ambientais, aumentando a sua resiliência (MACARTHUR, 1955). Em um reator anaeróbio, por exemplo, diversas espécies de bactérias coexistem e estão associadas para degradação de um substrato orgânico, produzindo hidrogênio. Todavia, quando diferentes populações de microrganismos são introduzidas em um ambiente com o mesmo substrato, ocorrem interações biológicas que provocam mudanças no grau de diversidade e na composição da comunidade presente no meio (ODUM, 2004). Kalia e Purohit (2008) afirmam que a manutenção da diversidade aumenta a produção de H₂.

Durante a digestão anaeróbia, diversas técnicas podem ser aplicadas para inibir o consumo de hidrogênio produzido, seja pela seleção dos microrganismos que serão inoculados no reator biológico (LEE; SHOW; SU, 2011), seja durante a operação dos reatores anaeróbios, como o controle de parâmetros como pH e COV (AMORIM; BARROS; SILVA, 2010; KAWAGOSHI *et al.*, 2005). Os reatores hidrogenogênicos podem ser inoculados com culturas puras, como por exemplo bactérias dos gêneros *Enterobacter* e *Clostridium* (MARKOV; AVERITT; WALDRON, 2011; COLLET, 2004), ou podem ser inoculados com culturas mistas. Neste caso, a seleção dos microrganismos pode ser feita por técnicas de pré-tratamento do inóculo, já que por possuir alta diversidade, tem em sua composição diversas espécies consumidoras de H₂ (KANG; KIM; LEE, 2012; WANG; WAN, 2008).

O pré-tratamento aplicado ao inoculo (estresse seletivo) determina quais grupos de bactérias terão sua atividade inibida ou estimulada durante o processo de fermentação (SONG *et al.*, 2012), sendo que os mais utilizados são: térmicos (KIM; HAN; SHIN, 2006) e químicos com clorofórmio (NING *et al.*, 2012) ou choque de pH (KANG; KIM; LEE, 2012).

Os pré-tratamentos térmicos, como choque de calor, e os que utilizam ácidos ou bases fortes para alterar o pH, eliminam microrganismos não adaptados a estas condições de estresse, como as arqueias metanogênicas e outros microrganismos consumidores de H₂ (ROSSI *et al.*, 2011). No entanto, microrganismos hidrogenogênicos formadores de esporos, representados principalmente pelo gênero *Clostridium*, podem suportar os efeitos dos pré-tratamentos, e germinam quando as condições voltam a ser propícias para crescimento e atividade metabólica (VAN GINKEL; SUNG; LAY, 2001).

Estes endósporos são estruturas de sobrevivência que surgem quando as condições de sobrevivência se tornam desfavoráveis (temperaturas extremas, deficiência de carbono ou nitrogênio, toxicidade por químicos). Alguns gêneros específicos (*Clostridium* e *Bacillus*) formam então um tipo de camada que os protege contra ataques físicos e químicos, guardando um cromossomo e parte do citoplasma, garantindo sua sobrevivência (TORTORA, 2005)

Os tratamentos químicos com adição de clorofórmio, iodopropano ou ácido 2-bromoetanosulfônico (BESA), apenas inativam o metabolismo das arqueias metanogênicas. Isto ocorre porque estes compostos químicos possuem uma estrutura muito semelhante à da coenzima-M (HU; CHEN, 2007) ou funcionam como antagonistas corrinóides que impedem o funcionamento de enzimas B₁₂ (NING *et al.*, 2012; ABREU; DANKO; ALVES, 2008; ZHU; BÉLAND, 2006).

Segundo Connell (1978), o distúrbio ambiental, como no caso do estresse seletivo, é uma dos principais fatores que afetam a diversidade de espécies. Apesar de haver diversos estudos sobre a diversidade microbiana e a estrutura da comunidade em reatores anaeróbios, as mudanças na composição da comunidade microbiana em função do pré-tratamento aplicado ao inóculo para a produção de H₂ foram pouco relatadas e ainda são contraditórias. Kang, Kim e Lee (2012) aplicaram uma combinação de pré-tratamentos (choque de calor seguido de aumento de pH) no lodo de uma estação de tratamento de esgoto doméstico e observou que, após

os pré-tratamentos, bactérias dos gêneros *Enterobacter* e *Clostridium* ainda estavam presentes e ativas, aumentando, cerca de seis vezes, a produção de H₂.

No entanto, Luo *et al.* (2011) avaliaram a influência de três pré-tratamentos diferentes (ácido, choque de calor e choque de carga orgânica) sobre a diversidade microbiana de uma mistura de lodo digerido de esgoto sanitário mesofílico e esterco digerido em condições termofílicas, visando a produção de hidrogênio. Ao contrário do reportado na maior parte da literatura, foi observado que os pré-tratamentos não aumentaram os η_{H_2} , mostrando que apenas o decaimento do pH promovia a inibição da atividade metanogênica. A comunidade microbiana foi mais afetada pelas condições operacionais (temperatura e pH) que pelo pré-tratamentos aplicados.

Neste estudo, avaliou-se o efeito de três tipos de estresses seletivos (pré-tratamentos), aplicados a três fontes de microrganismos, sobre a diversidade das comunidades microbianas e sobre o η_{H_2} a partir de glicerol oriundo da indústria de biodiesel, a fim de selecionar a microbiota mais adequada à produção de H₂.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1. Inóculos e pré-tratamentos

Os inóculos utilizados no experimento eram provenientes de diferentes fontes: lodo de um reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket* – UASB) tratando efluentes de uma indústria de alimentos (IA); lodo de reator UASB usado no tratamento de esgoto doméstico (ED); e líquido ruminal de caprinos (RC). Os inóculos foram acondicionados em frascos plásticos de 5 L a temperatura ambiente. A concentração de biomassa nos inóculos era a seguinte: 48,8gSV/L para o inóculo IA; 46,5gSV/L para o inóculo ED; e 17,5gSV/L para o inóculo RC.

Os três inóculos passaram por três tipos de pré-tratamento: térmico com choque de calor (PTT), químico com adição de clorofórmio (PTQ), e choque de pH ácido (PTA), com o objetivo comum de inibir ou eliminar a atividade metanogênica e estimular a produção de esporos de algumas espécies de BPH.

Para o pré-tratamento térmico, o inóculo foi aquecido em banho-maria a 90°C por 10 min, conforme descrito por Kim, Han e Shin (2006).

O pré-tratamento químico foi realizado pela adição de clorofórmio de forma a atingir concentração de 0,05% em cada frasco de reação (NING *et al.*, 2012).

O pré-tratamento com choque de pH foi realizado com a redução do pH para 3,0 com HCl 2 M e a manutenção deste por 24 h, seguida, de adição de NaOH 2 M até pH=5,5 (Rossi *et al.*, 2011).

Os inóculos que obtiveram as melhores produções de H₂ foram avaliados em termos de atividade metanogênica específica para comprovar a eficiência dos pré-tratamentos na inibição das arqueias metanogênicas (Item 3.2.4).

3.2.2. Substrato

Utilizou-se glicerol residual gerado em uma usina de biodiesel da empresa Petróleo Brasileiro S.A. – Petrobrás – na unidade denominada UBQ (Usina de Biodiesel de Quixadá), localizada no município de Quixadá, Ceará. A matéria-prima utilizada na produção do biodiesel que gerou o glicerol, foi sebo bovino e soja, com concentração de matéria orgânica equivalente à 1374 mgDQO/L. As características físico-químicas do glicerol eram: matéria orgânica não glicerídea (MONG) 1%; pH 5,5; pureza 81,5%; cinzas 4,8%; umidade 12,71%; metanol 0,03%; teor de NaCl 5,3%; densidade 1255,9 kg/m³.

3.2.3. Testes de atividade hidrogenogênica específica e η_{H_2}

Os ensaios de atividade hidrogenogênica específica (AHE) e η_{H_2} foram conduzidos em frascos com volume útil de 0,2 L selados borracha e tampas metálicas. Adicionou-se inóculo em quantidade suficiente para que cada frasco contivesse 4,5 g (sólidos voláteis – SV)/L. Glicerol residual foi adicionado de forma a atingir 20 gDQO/L. O pH inicial foi corrigido para 8,12 com solução de NaOH 2 M (DAVILA-VAZQUEZ *et al.*, 2008). A atmosfera de cada frasco foi substituída por N₂ antes do início dos testes. Todos os ensaios foram realizados em triplicata, a 37 °C, com agitação orbital de 120 rpm e duração de 10 d (Figura 3.1).

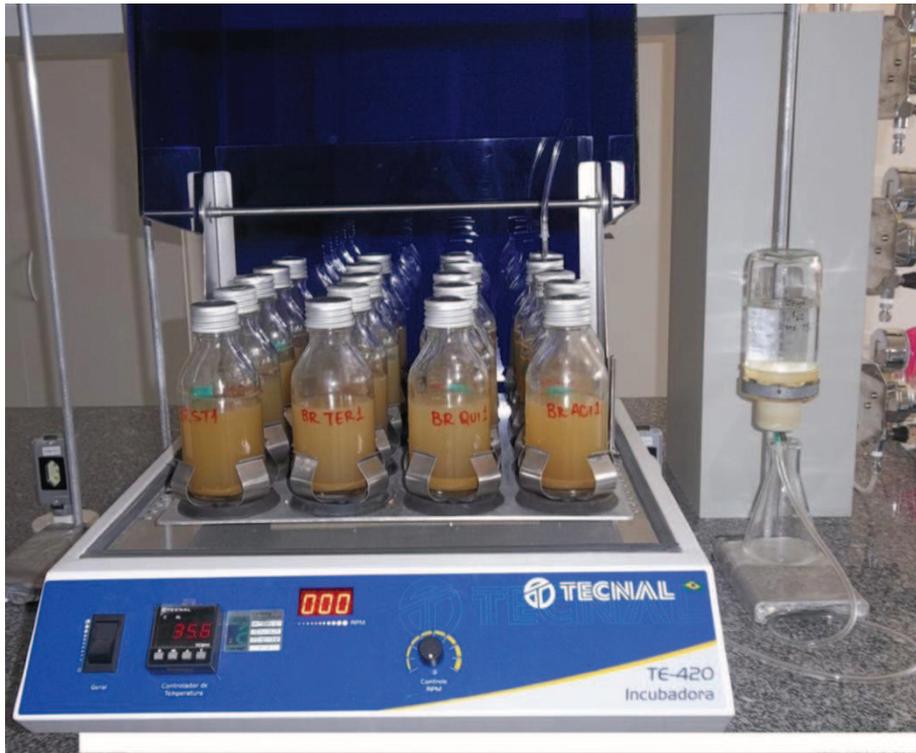


Figura 3.1 Testes em batelada de atividade hidrogenogênica específica (AHE) e rendimento da produção de H₂ (ηH₂).

A adição de nutrientes foi feita de acordo com Davila-Vazquez *et al.* (2008) e continha (g/L): NH₄H₂PO₄ (291,2), KH₂PO₄ (100), NaCl (1), MgSO₄.7H₂O (10), Na₂MoO₄.2H₂O (5,15), CaCl₂.2H₂O (1), MnSO₄.7H₂O (1,5), FeCl₂.4H₂O (0,465), ZnCl₂ (0,06), NiCl₂.6H₂O (0,12), CoCl₂.6H₂O (0,21).

Para cálculo da produção de biogás por endogenia utilizaram-se frascos de reação controle contendo o inóculo sem adição de substrato. Diariamente eram feitas medições do volume de biogás produzido nos reatores por deslocamento de líquido (SOTO; MÉNDEZ; LEMA,1993). A concentração de H₂ no biogás era determinada por cromatografia gasosa. Foram realizados testes de AHE e ηH₂ com glicerol P.A. para avaliar o efeito das impurezas contidas no glicerol residual na produção de H₂. O cálculo do ηH₂ foi feito com a Equação 1 (adaptada de Chookaew, O-Thong e Prasertsan,2012).

$$H_2 = \frac{V_{H_2 \text{ produzido}}}{V_{\text{molar } H_2} \cdot n_s} \quad \text{Eq.(3.1)}$$

Onde, ηH₂ é o rendimento da produção de H₂ (mol H₂/mol substrato); V_{H₂ produzido} é o volume de H₂ produzido (L); V_{molar H₂} é o volume ocupado por um mol de

H₂, em condições normais de temperatura e pressão (CNTP) (L/mol); e n_s é o número de mols de substrato adicionados em cada frasco (mol).

3.2.4. Teste de atividade metanogênica específica

Os testes de atividade metanogênica específica máxima (AME) foram feitos nos inóculos que obtiveram os melhores η_{H_2} submetidos aos melhores pré-tratamentos, com o objetivo de avaliar a inibição do metabolismo metanogênico ou eliminação das arqueias metanogênicas.

A determinação da AME seguiu os procedimentos descritos por Soto, Méndez e Lema.(1993). Foram utilizados frascos schott com volume útil de 0,2 L, vedados com borracha e tampa plástica, preenchidos com inoculo (3 gSV/L); glicose como substrato (1,5 gDQO/L), água destilada e bicarbonato de sódio (1,0 g/L) como tampão. Adicionaram-se nutrientes utilizando (mg/L): NH₄Cl (0,28), K₂HPO₄ (0,25), MgSO₄.7H₂O (0,10), CaCl₂.2H₂O (0,01), e CaCO₃ (0,60). Também foi adicionado 1 mL/L de uma solução contendo micronutrientes (mg/L): FeCl₂.4H₂O (2000), H₃BO₃ (50), ZnCl₂ (50), CuCl₂.2H₂O (38), MnCl₂.4H₂O (500), (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O (50), AlCl₃.6H₂O (90), e CoCl₂.6H₂O (2000). Os testes foram realizados a 35 °C, com agitação orbital de 120 rpm e em triplicata. Utilizaram-se frascos de “controle”, sem a adição de substrato, para subtração do volume de biogás produzido por endogenia. Os ensaios foram realizados em respirômetro anaeróbico automático, Micro-Oximax (Columbus Instruments, USA) (Figura 3.2), onde a produção de biogás foi monitorada automaticamente em tempo real com sensores de pressão e a concentração de metano foi determinada em um sensor de infravermelho.



Figura 3.2. Respirômetro anaeróbico automático Micro-Oximax utilizado nos testes de atividade metanogênica específica (AME).

3.2.5. Métodos analíticos

A concentração de hidrogênio no gás gerado durante os ensaios de AHE foi determinada em um cromatógrafo gasoso (Varian 450 CG) equipado com um detector de condutividade térmica e uma coluna capilar de aço inoxidável (10 m x 0,5 mm). As temperaturas do injetor, do forno e do detector eram 100, 45 e 120 °C, respectivamente. As determinações de (DQO) no início e ao fim de cada teste e a concentração de SV foram feitas seguindo os métodos titulométrico e gravimétrico, respectivamente, de acordo com APHA (2005). As concentrações de ácidos graxos voláteis (ácido acético - HAC; ácido butírico - HBU; ácido propiônico - HPr) foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em cromatógrafo Varian Polaris com coluna Agilent Zorbax C18 (150 x 4,6 mm²) com 0,01% de ácido sulfúrico e fase móvel com fluxo de 0,4 mL/min.

3.2.6. Extração do DNA e amplificação do gene 16S rRNA por PCR

O DNA das amostras foi extraído utilizando o conjunto de material de extração Fast® DNA Spin Kit for Soil (MP Biomedicals, LLC) de acordo com o protocolo do fabricante, com ajustes na temperatura e rotação da centrífuga, para aderência do DNA à matriz de sílica. Após a extração, o DNA foi armazenado a -20 °C.

O DNA foi amplificado usando a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). Para o domínio *Bacteria*, foram amplificadas as regiões V6 e V8 do gene 16S rRNA, utilizando *primers* específicos (338-F-GC e 518-R) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA; (Nübel et al., 1996)). A amplificação foi conduzida em um termociclador (TECHNE-TC-512) seguindo o protocolo: desnaturação inicial a 95 °C por 4 min, 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 60 s, anelamento a 55 °C por 60 s e extensão a 72 °C por 2 min, seguido de extensão final a 72 °C por 5 min.

3.2.7. Eletroforese em gel de gradiente desnaturante

A técnica de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* – DGGE) foi utilizada para estimar a diversidade das comunidades presentes nos inóculos (SAKAI, 2008). A DGGE foi conduzida em um *D-Code Universal Mutation Detection System* (Bio Rad Laboratories, Inc.), com tampão TAE 0,5x a 75 °C por 18 h para as amplificações do domínio *Bacteria*. Após

a eletroforese, o gel foi corado com corante SYBR *Green* (diluição 1:10000; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) por 1 h, e então visualizada em um transiluminador UV (Bio Rad Laboratories, Inc.).

3.2.8. Cálculo do índice de diversidade

Os perfis do DGGE foram comparados usando o *software* BioNumerics (Applied Maths BVBA, Sint-Martens-Latem, Belgium). Após o ajuste de imagem, as bandas foram definidas. A similaridade dos perfis de cada amostra foi calculada pelas curvas de densitometria digitalizadas utilizando o coeficiente de correlação de Pearson (HANE *et. al.*, 1993). O cálculo do índice de diversidade foi feito baseado no índice de diversidade de Shannon-Wiener (H) utilizando as alturas dos picos das curvas densiométricas de cada amostra, equação 2:

$$H = -\sum(P_i \ln P_i) \quad \text{Eq.(3.2)}$$

Onde H é o índice de diversidade, P_i é a abundância relativa de cada espécie ($P_i = n_i/n$, onde n_i é altura de cada pico, e n é o somatório das alturas de todos os picos na curva densiométrica).

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1. η_{H_2} em função do tipo de inóculo e pré-tratamento.

A Tabela 1 apresenta os resultados dos η_{H_2} de acordo com inóculo e pré-tratamento aplicado. Os inóculos ED e RC apresentaram os maiores η_{H_2} , independentemente do tipo de pré-tratamento aplicado, com valores na faixa de 0,22 a 0,37 mol H_2 /mol glicerol. Os efeitos dos diversos pré-tratamentos sobre os inóculos são contraditórios. Esperava-se que os pré-tratamentos inibissem a atividade metanogênica, concomitantemente com o aumento da AHE (LUO *et al.*, 2011; WOO; SONG, 2010). De fato, constatou-se que a AHE dos inóculos após sofrerem os pré-tratamentos foi realmente reduzida a valores próximos de zero (Figura 1). No entanto, os pré-tratamentos aplicados ao ED também causaram efeitos negativos em η_{H_2} e AHE.

Tabela 3.1. Rendimentos da produção de H₂ (η H₂) e atividade hidrogenogênica específica (AHE) a partir do glicerol residual para cada inóculo e os respectivos pré-tratamentos aplicados.

Pré-tratamento	Inóculos					
	IA		ED		RC	
	η H ₂	AHE	η H ₂	AHE	η H ₂	AHE
SPT	0,07	0,05	0,37	0,24	0,22	0,21
PTT	0,27	0,14	0,22	0,19	0,31	0,15
PTQ	0,28	0,12	0,30	0,10	0,31	0,26
PTA	0,20	0,12	0,22	0,14	0,27	0,16

Obs. η H₂ em mol H₂/mol glicerol; AHE em mL H₂/kgSV.d. IA- Inóculo proveniente da indústria de alimentos; ED- Inóculo proveniente de estação de tratamento de esgoto doméstico; RC- líquido ruminal de caprinos. SPT- sem pré-tratamento; PTT- pré-tratamento térmico; PTQ- pré-tratamento químico; PTA- pré-tratamento ácido.

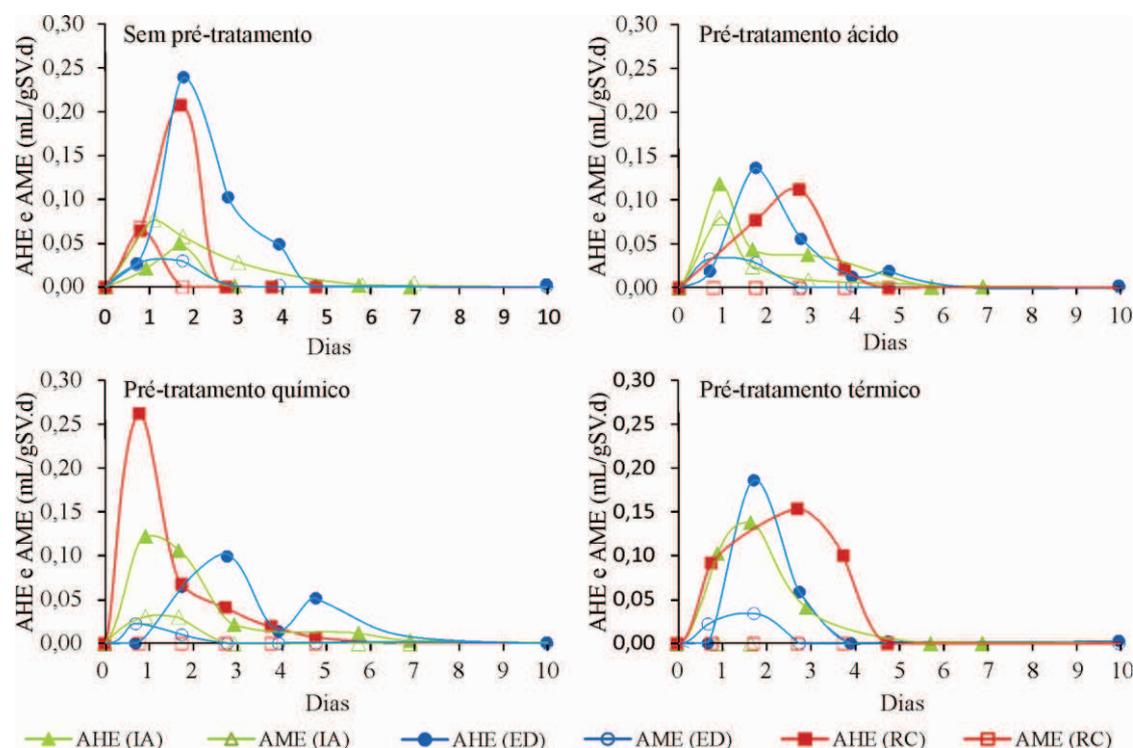


Figura 3.1. Atividades hidrogenogênica e metanogênica específicas das diversas fontes de inóculo, de acordo com os pré-tratamentos aplicados durante os testes com glicerol residual. IA- Inóculo proveniente da indústria de alimentos; ED- Inóculo proveniente de estação de tratamento de esgoto doméstico; RC- líquido ruminal de caprinos.

Os resultados de AHE e AME mostram que o inóculo ED sem pré-tratamento e o inóculo RC pré-tratado quimicamente com clorofórmio têm AHE mais elevadas, 0,24 e 0,26 mL H₂/gSV.d, respectivamente. Durante os ensaios de AHE, o inóculo IA produziu metano mesmo quando submetido aos pré-tratamentos. Isso pode ter ocorrido devido à sua estrutura granular que aumenta sua capacidade para suportar condições adversas, pois esta fornece um nicho protetor para as metanogênicas contra estresses ambientais.

Segundo MacLeod, Guiot e Costerton (1990), o grânulo tem uma estrutura em camadas, sendo que microrganismos metanogênicos como *Methanosaeta* encontram-se no núcleo do grânulo e são mais resistentes às temperaturas elevadas e aos ácidos. Estes resultados mostram que certos pré-tratamentos não inibem completamente a AME de um lodo granular, como o inóculo IA (HULSHOFF POL *et al.*, 2004). A maior produção de CH₄ foi alcançada nos testes com o inóculo IA (33% do biogás), que coincidiu com a menor produção de H₂ de todos os testes, mostrando que o hidrogênio foi, provavelmente, consumido para gerar metano.

Houve produção de metano em quase todos os ensaios com inóculos sem pré-tratamento, porque alguns microrganismos metanogênicos são capazes de produzir CH₄ mesmo em valores de pH próximos a 5 (SPEECE, 1996). A produção de metano ocorreu simultaneamente ao decréscimo no percentual de H₂ no biogás, provavelmente devido à presença de arqueias metanogênicas e bactérias homoacetogênicas resistentes ao pH ácido e que utilizam H₂ para a metanogênese e acetogênese, respectivamente (HWANG *et al.*, 2004).

Os testes de AME dos inóculos ED e RC (com ou sem pré-tratamento químico) mostraram que clorofórmio a 0,05% inibiu completamente a atividade das metanogênicas.

Lodo de estação de tratamento de esgoto sanitário já mostrou em outros estudos ter uma microbiota capaz de produzir H₂, tais como *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter sakazakii*, *Clostridium beijerinckii* (KANG; KIM; LEE, 2012; CHEN; LIN; CHANG, 2001), desde que se estabeleçam condições ambientais ou operacionais adequadas (XING; REN; RITTMANN, 2008; CHANG; LIN, 2004, LIN; LAY, 2004). Essa capacidade de produção está ligada à alta diversidade desse tipo de inóculo comprovada em outros estudos (WAGNER *et al.*,

2002). Xing, Ren e Rittmann (2008) observaram aumento do número de espécies concomitantemente com o aumento da taxa de produção de H₂ em reatores CSTR.

Embora este lodo contenha alta concentração relativa de arqueias metanogênicas, ele não estava adaptado às condições iniciais do teste de AHE (concentração elevada de matéria orgânica, 20 gDQO/L e ausência de solução tampão), o que fez o pH inicial (8,12) decair rapidamente até valores entre 5,0 e 5,7. Isto ocorre porque as bactérias acidogênicas presentes na microbiota têm taxa de produção de ácidos maior que a taxa de consumo das metanogênicas (JUNG; KIM; SHIN, 2011). Este processo de acidificação do reator propicia maior atividade das bactérias acidogênicas e hidrogenogênicas, enquanto diminui a atividade do grupo de consumidores de H₂, que têm atividade ótima em valores de pH próximos da neutralidade (6,8 a 7,2) (NISSILA *et al.*, 2012). O decaimento rápido do pH até valores entre 5,0 e 5,7 promoveu a inibição da atividade metanogênica e tornou redundante o efeito dos pré-tratamentos. Para uma aplicação em escala real, apenas a acidificação do meio seria viável, especialmente do ponto de vista econômico, visto que dispensa o uso de reagentes ou equipamentos para inibição dos microrganismos.

O líquido ruminal de caprinos (inóculo RC) possui alta diversidade microbiana, podendo conter entre 10¹⁰ e 10¹¹ bactérias/mL (incluindo acidogênicas e hidrogenogênicas), entre 10⁸ e 10⁹ arqueias metanogênicas, aproximadamente 10⁶ protozoários ciliados/mL, e na ordem de 10⁶ fungos/mL (KUMAR *et al.*, 2009). Espécies como *Ruminococcus albus* e outras hidrogenogênicas como, *Bacteroides clostridiiformis*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Eubacterium limosum*, *Fasobacterium necrophormn*, *Megasphaera elsdenii* e *Ruminococcus flavefaciens* estão presentes no estômago de ruminantes (JOYNER; WINTER; GODBOUT, 1977; MILLER; WOLIN, 1973).

Espécies como *Klebsiella planticola* e *Selenomonas ruminantium* também presentes no estômago de alguns ruminantes são conhecidas por degradarem glicerol e gerarem produtos de alto valor agregado, como etanol e ácido propiônico (JARVIS; MOORE; THIELE, 1997; HOBSON; MANN, 1961). Assim, devido à concentração elevada de hidrogenogênicas e após os pré-tratamentos para inibir a atividade metanogênica, o rendimento foi de 0,31 mol H₂/mol glicerol. De modo geral, esses valores de ηH₂ estão próximos aos obtidos nos ensaios usando inóculo

ED. No entanto, a atividade metanogênica do inóculo RC foi completamente suprimida pelos pré-tratamentos, o que resultou em η_{H_2} um pouco mais elevados que os do inóculo ED pré-tratado. Isso também mostra a alta suscetibilidade do líquido ruminal aos tratamentos.

A alta diversidade dos inóculos ED e RC permite sua aplicação em sistemas em larga escala, pois promove a estabilidade do sistema e a redundância funcional, garantindo resistência a flutuações nos processos (GIRVAN *et al.*, 2005).

Esperava-se que com o lodo proveniente de um UASB tratando efluente de uma indústria de alimentos (inóculo IA) fossem obtidos η_{H_2} maiores de H_2 . Este inóculo continha uma concentração alta de microrganismos metanogênicos, constatado pelos ensaios de AHE (0,48 kgDQO/kgSV.d), o que implica também em concentração elevada de bactérias acidogênicas e, conseqüentemente, de hidrogenogênicas. Assim, a produção de H_2 seria maximizada após pré-tratamento para inibir a atividade metanogênica, ou eliminar as arqueias metanogênicas. O η_{H_2} variou entre 0,20 e 0,28 mol H_2 /mol glicerol, quase triplicando a AHE e o η_{H_2} em relação ao controle (Tabela 3.1). Este rendimento está próximo dos valores reportados na literatura, mas é menor que o obtido pelo inóculo ED sem qualquer tipo de pré-tratamento.

O inóculo IA era do tipo granular e já estava previamente adaptado às altas cargas orgânicas impostas pelos testes de AHE e η_{H_2} , diferentemente dos demais inóculos. Sem o pré-tratamento, é provável que as metanogênicas tenham convertido rapidamente o H_2 produzido em metano. Os resultados mostraram que os pré-tratamentos no inóculo IA não inibiram completamente a atividade metanogênica, pois foi detectado metano em todos os testes de atividade hidrogenogênica, alcançando proporções de até 33%, o que mostra a adaptação deste inóculo a altas cargas orgânicas e que provavelmente promoveram rapidamente a metanogênese a partir do H_2 formado.

Os resultados desse experimento estão de acordo com Akutsu, Lee e Noike (2009), que testaram diferentes inóculos para degradar glicerol e produzir H_2 , incluindo um lodo anaeróbio proveniente de um reator usado no tratamento de efluentes de uma indústria de alimentos, obtendo rendimento de 0,34 mol H_2 /mol glicerol.

Esperava-se que o pré-tratamento térmico com choque de calor fosse o mais eficiente na inibição de metanogênicas e enriquecimento da microbiota com BPH, já que bactérias como o *Clostridium* podem formar esporos em condições de estresse (BAGHCHEHSARAE *et al.*, 2008; KIM; HAN; SHIN, 2006; OH; VAN GINKEL; LOGAN, 2003). Porém, neste trabalho, esse método apresentou rendimentos de produção de H₂ semelhantes aos outros. No caso do inóculo RC, o pré-tratamento térmico resultou em rendimento de 0,31 mol H₂/mol glicerol, provavelmente devido à composição da comunidade microbiana, com alta predominância de microrganismos produtores de H₂ e formadores de esporos. Como o inóculo não apresentava uma estrutura granular, a eliminação das arqueias metanogênicas foi facilitada, resultando no enriquecimento comunidade com BPH, principalmente com o gênero *Clostridium* (DUANGMANEE *et al.*, 2007).

Alguns experimentos anteriores com pré-tratamentos térmicos (80 °C durante 20 min e 100 °C durante 10 min) mostraram que este método pode não ser suficiente para inibir alguns microrganismos e para modificar a composição da comunidade, permitindo que mesmo os microrganismos que não esporulam permaneçam com baixa atividade metabólica (LUO *et al.*, 2011; NISSILA *et al.*, 2011). O efeito pode também ser o oposto, em que o excesso de temperatura ou de tempo no pré-tratamento térmico podem evitar que os esporos germinem e cresçam em níveis suficientes para a produção de H₂ (DUANGMANEE *et al.*, 2007).

O pré-tratamento utilizando clorofórmio (PTQ) é usado para inativar as arqueias metanogênicas, pois bloqueia a função de enzimas corrinóides (CHIDTHAISONG; CONRAD, 2000) e inibe a coenzima-M redutase, responsável pela redução de H⁺ formando metano (HU; CHEN, 2007). A concentração utilizada de clorofórmio (0,05%) foi adequada já que, este método foi eficiente na inibição da atividade metanogênica de todos os inóculos, sem prejuízo para as BPH, resultando em ηH₂ que variaram entre 0,28 e 0,31 mol H₂/mol glicerol. Estes valores são melhores que aqueles obtidos com os pré-tratamentos ácido ou térmico, que podem ter afetado negativamente as BPH. Ning *et al.* (2012) utilizaram lodo de um reator de circulação interna que tratava efluente industrial pré-tratado com solução de clorofórmio de 0,05% e alcançaram ηH₂máximo de 2,20 mol H₂/mol glicose.

Segundo Bauchop (1967), clorofórmio na concentração de 0,09% pode causar até 50% de inibição da atividade metanogênica. Hu e Chen (2007) também

utilizaram CHCl_3 a 0,05% e obtiveram resultados melhores quando comparados aos demais pré-tratamentos testados (ácido e térmico). Os autores testaram, como inoculo, lodo granular de uma estação de tratamento de esgoto sanitário e, segundo eles, o grânulo pode ter protegido os microrganismos consumidores de H_2 dos choques ácido e térmico. No entanto, concentrações de clorofórmio superiores a 2% podem diminuir a produção de H_2 porque inibem também a atividade das BPH (HU; CHEN, 2007; WANG; WAN, 2008).

Mohan, Babu e Sarma (2008) também obtiveram resultados melhores utilizando tratamento químico, em comparação com os pré-tratamentos térmico e ácido. Eles afirmam que esses pré-tratamentos, quando eliminam as bactérias não formadoras de esporos, reduzem a diversidade da comunidade microbiana, enquanto tratamentos que apenas inibem a atividade de microrganismos sem matá-los, mantêm a comunidade relativamente complexa, rica em bactérias acidogênicas e hidrogenogênicas, que também podem suprimir a atividade metanogênica pelo excesso de produtos formados.

O pré-tratamento ácido tem, assim como o térmico, o objetivo de inibir o metabolismo ou eliminar as arqueias metanogênicas. Isso ocorre porque ácidos fortes como H_2SO_4 e HCl , em concentrações entre 1 e 2 M, com tempo de contato entre 6 e 24 h, provocam hidrólise da membrana celular de microrganismos (ASSAWAMONGKHOLSIRI; REUNGSANG; PATTRA, 2013). Nestas condições, microrganismos com capacidade de esporular, como algumas BPH (por exemplo, *Clostridium sp.*), conseguem sobreviver e germinar quando as condições adequadas forem restabelecidas.

No entanto, o pré-tratamento ácido foi menos eficaz para a produção de hidrogênio a partir do glicerol, resultando em η_{H_2} entre 0,20 e 0,27 mol H_2 /mol glicerol. Provavelmente os efeitos do ácido foram deletérios para as BPH. Os resultados comparativos entre o PTA do inóculo IA e o controle (SPT) são iguais aos relatados por Lee, Song e Hwang (2009) que, com o tratamento ácido com HCl obtiveram rendimento 2,8 vezes maior que do controle.

Desta forma, baseado nos dados obtidos com o inóculo ED sem pré-tratamento, apenas o controle do pH entre 5 e 6 é suficiente para inibir determinados microrganismos, como relatado em outros trabalhos. Zhu e Béland (2006) testaram pré-tratamentos diferentes em lodo de digestor anaeróbio de estação de tratamento

de esgoto sanitário, concluindo que este inóculo, sem qualquer pré-tratamento, obtêm η_{H_2} melhores (5,17 mol H_2 /mol sacarose), comparando com os η_{H_2} do lodo submetido aos pré-tratamentos com choque de calor e ácido, 2,59 e 3,10 mol H_2 /mol sacarose, respectivamente.

Yu *et al.* (2002) também utilizaram inóculo proveniente de uma estação de tratamento de esgoto sanitário municipal sem pré-tratamento, mas submetido a carga orgânica elevada (10 gDQO/L), o que reduziu o pH para 5,0, inibindo as metanogênicas. Os autores relataram resultados semelhantes ao deste trabalho no que diz respeito à composição do biogás: a porcentagem de H_2 no biogás foi praticamente a mesma (cerca de 60%) e foi detectada uma quantidade desprezível de metano ao fim do experimento.

As populações que sobrevivem a diferentes tipos de perturbações como estes pré-tratamentos, são consideradas altamente especializadas. Este é um princípio usado na técnica de enriquecimento de uma cultura mista com microrganismos específicos (ATLAS *et al.*, 1991). É o caso do gênero *Clostridium*, conhecido por produzir hidrogênio em diferentes condições, e suportar grandes perturbações ambientais pela capacidade de formação de esporos (REN *et al.*, 2008).

3.3.2. Efeito das impurezas contidas no glicerol no η_{H_2}

Quando comparado com outros tipos de substrato já estudados para produção de hidrogênio, por exemplo, glicose e sacarose, os η_{H_2} a partir do glicerol são muito baixos. Isso porque nos experimentos realizados com glicose ou sacarose, é possível alcançar até 80% e 74% do potencial máximo teórico, respectivamente (YOKOYAMA *et al.*, 2009; VAN NIEL *et al.*, 2002), enquanto que o máximo reportado na literatura para o glicerol foi de apenas 36% (MANGAYIL; KARP; SANTALA, 2012).

Estequiometricamente é possível produzir até 3 mol H_2 /mol glicerol, dependendo da rota metabólica (SARMA *et al.* 2012). No entanto, tanto neste trabalho como de outros autores, este valor é muito inferior. Chookaew, O-Thong e Prasertsan (2012) conseguiram rendimento de 0,25 mol H_2 /mol glicerol com uma linhagem isolada da espécie *Klebsiella pneumoniae* com 24 gDQO/L, carga orgânica próxima à testada neste trabalho. Sittijunda e Reungsang (2012) obtiveram η_{H_2} de

0,30 mol H₂/mol glicerol com culturas mistas termofílicas em experimento em batelada também com concentração de 24 gDQO/L de glicerol residual. A cultura foi cultivada previamente em glicerol puro com pH 5,5 para adaptação ao substrato.

As impurezas contidas no glicerol residual, como ácidos graxos de cadeia longa, têm efeito inibitório na produção de metano (KOSTER; CRAMER, 1986). Como o acetato pode ser formado a partir de H₂, a inibição da produção de CH₄ devido à presença desses ácidos, como o ácido linoleico, pode ter um efeito positivo sobre a produção de H₂. O ácido linoleico também tem efeito inibitório sobre as metanogênicas hidrogenotróficas (LALMAN; BAGLEY, 2000) o que confirmaria maior produção de H₂ nos testes com glicerol residual.

No entanto, os resultados mostraram o contrário. Os valores de η_{H_2} do glicerol P.A. foram melhores que os testes com o glicerol residual. Nos ensaios onde foi usado o inóculo ED sem pré-tratamento, o η_{H_2} com glicerol P.A. foi de 0,38 mol H₂/mol glicerol, enquanto que do glicerol residual, alcançou 0,31 mol H₂/mol glicerol. Com a fonte de inóculo RC pré-tratada quimicamente, os η_{H_2} foram de 0,42 e 0,31 mol H₂/mol glicerol, para glicerol P.A e residual, respectivamente. Como a concentração de AGCL nos frascos foi muito baixa, o que determinou a produção de hidrogênio nos testes com glicerol residual e P.A foi a concentração relativa de glicerol – no glicerol residual, a presença de impurezas diminuiu a concentração de glicerol (81,5%), que pode ter comprometido a AHE. Além disto, a presença de NaCl (0,8%) no glicerol residual pode ter causado efeito inibitório na produção de H₂, pois nos experimentos realizados por Ito *et al.* (2005), que avaliaram a influência da concentração de NaCl, foi concluído que uma concentração de NaCl igual a 1% provocou queda da produção de H₂.

3.3.3. Produção de ácidos orgânicos

Os resultados de concentração de ácidos orgânicos voláteis (AGV) e de pH ao final de cada ensaio de AHE estão apresentados na Tabela 3.2. O pH inicial nos frascos de reação foi ajustado para 8,12 e decresceu devido à produção de ácidos orgânicos que resultou em inibição da atividade metanogênica e favoreceu a produção de H₂.

As mudanças no pH modificam as rotas metabólicas e geram diferentes produtos, como ácido acético, propiônico e butírico, etanol e 1,3-propanodiol, o que resulta em diferentes η_{H_2} . Isso porque enzimas diferentes das hidrogenases podem controlar os fluxos metabólicos em diferentes vias de degradação do carbono (MATHEWS; WANG, 2009; CAI *et al.*, 2011).

O pH abaixo de 5,5 favorece a atividade das bactérias homoacetogênicas, que consomem hidrogênio do meio para formar acetato, o que pode explicar o decréscimo na porcentagem de hidrogênio no biogás, ao longo do experimento (OH; VAN GINKEL; LOGAN, 2003), mesmo quando ainda há grande quantidade de substrato. De modo geral isto explica o baixo η_{H_2} encontrado (0,37 mol H_2 /mol glicerol), enquanto que estequiometricamente seria possível obter até 3 mol H_2 /mol glicerol (SARMA *et al.* 2012).

Além disto, à medida que o pH decresce, há aumento de prótons de ácidos fracos dissociados (acético, propiônico e butírico) que penetram na parede celular do microrganismo e causa queda na atividade (CHOOKAEW; O-THONG; PRASERTSAN, 2012). Por isso, os rendimentos mais baixos foram observados nos inóculos nos quais o pH final ficou abaixo de 5,0 . Pode-se afirmar que o aumento na concentração de AGV's inibe não só dos microrganismos consumidores de H_2 , como também dos produtores (DUANGMANEE *et al.*,2007).

Pode-se observar na Tabela 3.2, que houve grande variação nos produtos finais dominantes nos diferentes tipos de tratamento. Isto pode ter ocorrido porque a produção de metabólitos é influenciada, não somente pelo tipo de inóculo utilizado, mas também pelo pré-tratamento aplicado ao inóculo. O pré-tratamento elimina ou inibe algumas espécies de bactérias e arqueias, o que altera as rotas metabólicas de degradação de um substrato, resultando na produção de metabólitos específicos, por exemplo, ácido acético, propiônico e butírico, etanol e 1,3-propanodiol (LIU *et al.*, 2011; LUO *et al.*, 2011; ROSSI *et al.*, 2011)

Tabela 3.2. Concentrações de AGV e pH ao final de cada ensaio de ηH_2 e AHE.

Inóculo	Pré- tratamento	AGV (g/L)			pH final
		HAc	HPr	HBu	
IA	SPT	0,94	1,82	n.d.	4,7
	PTT	1,50	n.d.	0,43	5,0
	PTQ	3,00	0,18	0,26	5,1
	PTA	1,33	0,54	n.d.	4,7
ED	SPT	n.d.	n.d.	n.d.	5,7
	PTT	0,99	n.d.	n.d.	5,4
	PTQ	n.d.	n.d.	n.d.	5,0
	PTA	n.d.	n.d.	n.d.	5,2
RC	SPT	n.d.	2,29	3,46	5,9
	PTT	n.d.	2,26	1,34	5,5
	PTQ	0,44	n.d.	2,01	5,8
	PTA	n.d.	1,86	4,96	5,6

Obs.: n.d. – não detectado; HAc. – Ácido acético; HPr – Ácido propiônico; HBu – Ácido butírico; IA- Inóculo proveniente da indústria de alimentos; ED- Inóculo proveniente de estação de tratamento de esgoto doméstico; RC- líquido ruminal de caprinos. SPT- sem pré-tratamento; PTT- pré-tratamento térmico; PTQ- pré-tratamento químico; PTA- pré-tratamento ácido.

Nos testes em que foram usados o inóculo ED, só foi detectado AGV no pré-tratamento térmico, com produção de ácido acético (HAc) (0,99 g/L). O mesmo foi observado nos experimentos de Rossi *et al.* (2011) que utilizaram também um lodo de um reator UASB de uma estação de tratamento. Isso contradiz Wicher, Thiel e Laniecki (2010) e Vlassis *et al.* (2012), que afirmam que grande quantidade de H_2 produzido está diretamente ligado a grande quantidade de HAc, e que a produção de hidrogênio ocorre simultaneamente com a produção de HAc e HBu.

Como o hidrogênio pode ser formado a partir do glicerol por duas vias: quando 1,3-propanodiol é formado simultaneamente, ou quando há produção simultânea de HAc e HBu, é provável que a rota predominante na fermentação para o inóculo ED tenha sido a redutora com produção de 1,3-propanodiol, já que não houve produção desses ácidos orgânicos, fato reportado em estudos anteriores, nos quais 1,3-propanodiol foi o produto principal da fermentação do glicerol (VLASSIS *et al.*, 2012;

SELEMBO *et al.*, 2009). Cada mol de 1,3-propanodiol requer 1 mol de H₂ para sua formação, o que explica a baixa produção de H₂ (SELEMBO *et al.*, 2009).

Outros produtos que podem ter sido formados durante os experimentos foram etanol e ácido láctico, que também podem ser produzidos concomitantemente com H₂, quando piruvato é convertido em etanol ou em ácido láctico (ANTONOPOULOU *et al.*, 2010; MILLER; WOLIN, 1973). Vale salientar que neste trabalho não foram determinados 1,3-propanodiol, ácido láctico e etanol.

Por outro lado, Vlassis *et al.* (2012) observaram baixa produção de HAc, HBU e etanol ocorrendo simultaneamente com a produção de H₂, alcançando η_{H_2} máximo de 0,11 mol H₂/mol glicerol. Nesse experimento, houve baixa produção de HAc e HBU, mas o η_{H_2} máximo foi quase três vezes superior ao resultado de Vlassis *et al.* (2012). O η_{H_2} máximo obtido no trabalho de Akutsu, Lee e Noike (2009) foi 0,25 mol H₂/mol glicerol tendo como principais metabólitos formados 1,3-propanodiol, 2,3-butanodiol. Seifert *et al.* (2009) produzindo H₂ a partir de glicerol com inóculo semelhante ao inóculo ED, alcançaram rendimento máximo de 0,41 mol H₂/mol glicerol e os principais metabólitos formados foram 1,3-propanodiol e ácido láctico. Isso mostra que provavelmente os baixos η_{H_2} encontrados em comparação à produção máxima teórica (3 mol H₂/mol glicerol) são consequência de outros metabólitos formados além de HAc, HBU e HPr.

Nos testes onde foram usados o inóculo IA, o produto dominante nos pré-tratamentos foi ácido acético, que coincidiu com baixa produção de hidrogênio, o que pode sugerir aparente homoacetogênese. O excesso de ácido acético pode ter efeito inibitório sobre a produção de H₂. Abreu, Danko e Alves (2008) observaram queda na produção de H₂ quando a concentração de HAc era igual ou maior que 1,2 g/L. A dominância de certos metabólitos é determinada pela origem do inóculo, já que a produção de cada ácido orgânico é feita por microrganismos diferentes que determinarão a direção das rotas metabólicas (LI *et al.*, 2007; BIEBL *et al.*, 1999).

O acúmulo de ácido acético no meio compromete o crescimento celular e a taxa de consumo de substrato (ZHANG *et al.*, 2012). Isso também foi confirmado por Stewart (1975) em um experimento com bactérias do rúmen submetidas a diferentes concentrações de acetato (1,6 e 4,1 g/L), com o objetivo de avaliar o crescimento celular. Ele concluiu que 4,1g de acetato/L diminuíram a taxa de crescimento celular de *Lactobacillus plantarum*. Ele afirmou que ácidos orgânicos inibem o transporte

ativo de compostos importantes para o interior da célula, reagindo com algum componente da membrana celular. Como no presente trabalho não foram encontradas concentrações semelhantes a que promove inibição da atividade microbiana, pode-se afirmar que o ηH_2 não foi comprometido por este fator.

Usando o inóculo RC, os ácidos propiônico e butírico foram os metabólitos predominantes. Resultado similar foi encontrado no trabalho de Amorim, Sader e Silva(2012), que avaliaram a produção de ácidos orgânicos e H_2 em um reator AFBR. Os rendimentos relativamente elevados de H_2 podem ter resultado na ausência de HAc. De acordo com Viana (2012) o acúmulo de H_2 no meio desfavorece a acetogênese a partir de propionato, butirato e etanol. Isso é confirmado neste trabalho, pois obteve-se produção de ácido propiônico e butírico, sem conversão desses a acetato.

3.3.4. Diversidade nos inóculos

O inóculo que gerou o maior rendimento da produção de H_2 e seus respectivos pré-tratamentos foram analisados por DGGE para avaliar a diversidade em função de diferentes condições de pré-tratamento e relacionar diversidade com produtividade.

A partir da Figura 3.3, que mostra o dendograma de similaridade entre as amostras do inóculo ED, é possível avaliar os impactos dos diversos pré-tratamentos na comunidade, pelo padrão de distribuição das bandas no gel. Os pré-tratamentos e a própria acidificação que ocorreu no controle (sem pré-tratamento), provocaram mudanças na composição da comunidade bacteriana ao longo dos ensaios de AHE. A intensidade de algumas bandas foi aumentada, o que indica aumento da abundância relativa (ZHANG; FANG, 2000), confirmando a eficiência dos tratamentos no enriquecimento de algumas espécies de bactérias. O aumento da abundância de algumas espécies pode levar à dominância destas, que resulta em um aumento da resistência aos estresses ambientais (WITTEBOLLE *et al.*, 2009).

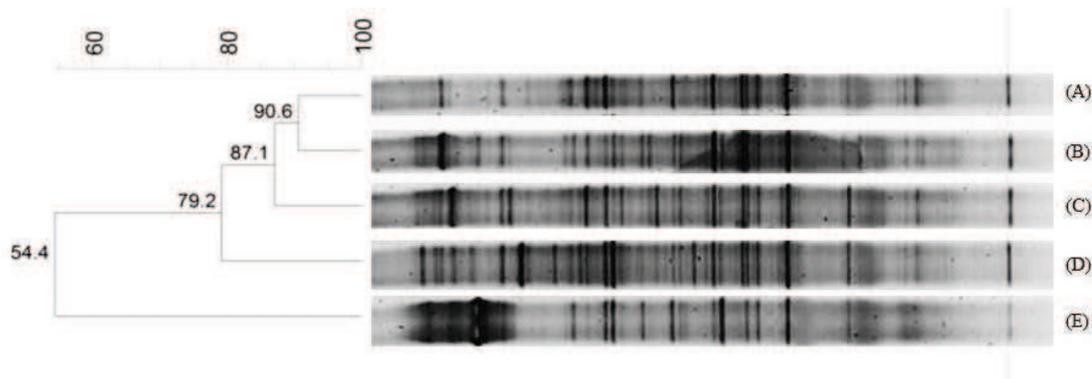


Figura 3.3. Dendrograma de similaridade entre as amostras do inóculo ED. (A) Inóculo sem pré-tratamento, no início do ensaio de atividade hidrogenogênica; (B) Inóculo pré-tratado com ácido, após o ensaio; (C) Inóculo pré-tratado quimicamente, após o ensaio; (D) Inóculo sem pré-tratamento, após o ensaio. (E) Inóculo pré-tratado termicamente, após ensaio.

Esperava-se que o pré-tratamento químico não resultasse em grandes modificações na comunidade bacteriana, já que o clorofórmio (0,05%) age especificamente sobre as arqueias metanogênicas (HU; CHEN, 2007). Isso foi confirmado, pois este pré-tratamento resultou em uma similaridade de 87,1% com o inóculo sem pré-tratamento, antes do ensaio. De qualquer forma, essa pequena variação na comunidade pode ter sido decorrente da queda de pH, pois o clorofórmio na concentração de 0,05% não tem efeito negativo sobre o domínio bactéria. Houve aumento da diversidade, resultando em rendimento relativamente elevado (0,30 mol H₂/mol glicerol).

O pré-tratamento com choque ácido deveria causar efeito semelhante ao pré-tratamento térmico, pois também se baseia na eliminação dos microrganismos não formadores de esporos (LEE; SONG; HWANG, 2009). No entanto, pode-se observar que o pré-tratamento ácido apresentou similaridade maior com o inóculo inicial (90,6%). Isso mostra que este pré-tratamento não causa grandes mudanças na comunidade, mas, de qualquer forma, resultou em um aumento da diversidade e em um aumento na abundância de determinadas espécies, como mostra o aumento na intensidade de algumas bandas. Provavelmente, este pré-tratamento não foi suficiente para a formação dos esporos (já que houve produção de metano) e eliminação das demais bactérias.

A Figura 3.4 apresenta os índices de diversidade do inóculo ED antes do início dos testes (amostra A) e seus respectivos tratamentos após o final dos testes (amostras B a E). O índice de diversidade de Shannon se baseia na riqueza (número

de espécies) e no padrão de distribuição dessas espécies. Normalmente, esse índice varia de 1,5 (baixa riqueza e distribuição) a 3,5 (alta riqueza e distribuição) (MCDONALD, 2003).

Todos os pré-tratamentos provocaram mudanças no índice de diversidade. Pode-se observar que, com exceção do pré-tratamento térmico, os demais provocaram aumento da diversidade. Os ensaios em que foram utilizados inóculo ED sem pré-tratamento também resultaram em aumento no índice de diversidade. Isto ocorreu devido a diminuição no pH provocado pelas condições do teste. Isso confirma a hipótese de Connell (1978), que afirma que um nível moderado de perturbação favorece determinadas espécies e resulta em alta diversidade geral. Pequenos distúrbios permitem a ocorrência de maior número de espécies sem que a competição leve à exclusão de uma delas.

Este aumento da diversidade é explicado pelo fato de algumas espécies de bactérias estarem presentes em pequenas quantidades no inóculo bruto, e que podem não ser detectadas por DGGE pelo pouco material genético. Após os ensaios de AHE, onde foram estabelecidas condições favoráveis a algumas espécies (excesso de substrato e nutrientes, e ausência de solução tampão), algumas dessas populações aumentam de abundância, que se reflete no aumento da intensidade das bandas.

A redução do pH que ocorreu devido à alta carga orgânica aplicada no início dos testes promoveu maior aumento da diversidade entre todas as amostras, mostrando que, neste caso, há uma relação direta entre produtividade e diversidade, já que no inóculo ED sem pré-tratamento, obteve-se o maior η_{H_2} .

O inóculo ED sem pré-tratamento foi o que apresentou maior riqueza e diversidade de espécies o que resulta em maior resistência a flutuações nos parâmetros operacionais, no caso de aplicação em reatores em larga escala. Isto está postulado na hipótese da diversidade-estabilidade (MACARTHUR, 1955), que afirma que quanto maior for a diversidade dos ecossistemas, estes serão mais estáveis.

Chu *et al.* (2010) também observaram maior diversidade no inóculo sem pré-tratamento comparado a um inóculo pré-tratado termicamente. A comunidade sem tratamento mantém bactérias entéricas e outras não formadoras de esporos, o que

garante maior diversidade, já que o choque de calor elimina populações não formadoras de esporos.

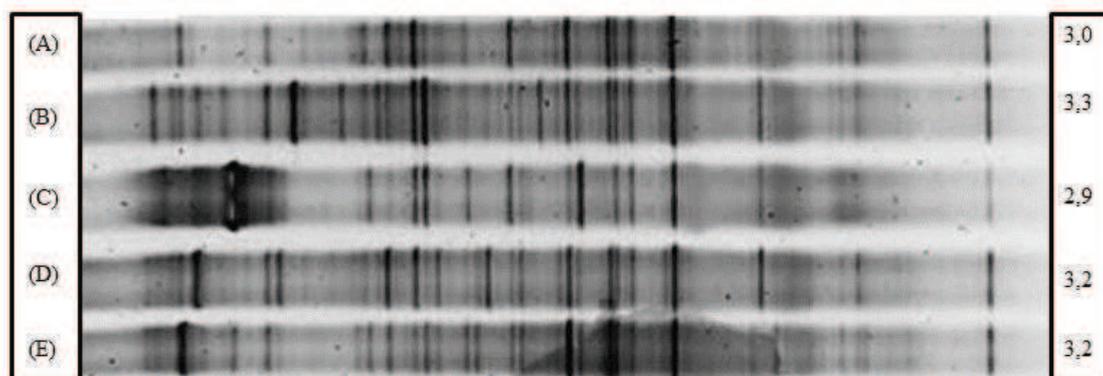


Figura 3.3. Índices de diversidade do inóculo ED e respectivos pré-tratamentos. (A) Inóculo bruto, (B) Inóculo sem pré-tratamento, (C) Inóculo após pré-tratamento térmico, (D) Inóculo após pré-tratamento químico, (E) Inóculo após pré-tratamento ácido.

Houve pequena na variação do índice de diversidade entre o inóculo bruto e após o pré-tratamento térmico, e o número de bandas diminuiu de 22 para 20, indicando diminuição da riqueza após o pré-tratamento, fato também reportado por Baghchehsaraee *et al.* (2008). Esse resultado confirma a hipótese de Atlas (1983) que postula que a diversidade de comunidades microbianas geralmente diminui diante de estresses ambientais que perturbam o equilíbrio das interações populacionais dentro da comunidade.

Provavelmente, existiam poucas espécies não formadoras de esporos, e o pré-tratamento com choque de calor as eliminou restando apenas as formadoras de esporos. Apesar disso, a produção de hidrogênio foi relativamente baixa. Isso pode ter ocorrido pelo fato de existirem bactérias homoacetogênicas que também são formadoras de esporos (LUO *et al.*, 2011) e, após o choque de calor, esses microrganismos homoacetogênicos germinaram, consumindo H_2 e produzindo ácido acético. A queda da diversidade ocorreu concomitantemente com a queda na produção de H_2 pelo fato de que uma perturbação de grande impacto, que desfavorece a maior parte das espécies diminui a funcionalidade da comunidade, independentemente da condição inicial (WITTEBOLLE *et al.*, 2009).

O índice de diversidade dos pré-tratamentos químico e ácido foram os mesmos e, em relação ao inóculo inicial, indicaram aumento da diversidade, o que confirma a hipótese de que esses pré-tratamentos enriquecem a comunidade bacteriana (NING *et al.*, 2012; LEE; SONG; HWANG, 2009).

3.4. CONCLUSÕES

Os pré-tratamentos alteram a diversidade do inóculo e, o aumento no índice de diversidade resulta em aumento da produtividade. O tratamento térmico foi o único que reduziu a diversidade e apresentou a menor similaridade com o inóculo inicial, provavelmente, por ser o método que causou maior impacto sobre a comunidade, o que resultou em baixo rendimento da produção de H₂ em relação aos demais.

O grau de impacto do pré-tratamento mostrou diferença nos padrões de diversidade, e apenas a queda gradual do pH promoveu maior diversidade comparada aos demais pré-tratamentos.

O inóculo proveniente da estação de tratamento que trata esgoto sanitário é o que possui a microbiota mais adequada para produção de H₂ dentre os testados, já que atingiu o maior η_{H_2} sem necessidade de pré-tratamento.

O inóculo proveniente da estação de tratamento de efluente da indústria de alimentos resistiu à maior parte dos pré-tratamentos devido à sua estrutura granular e por estar adaptado a altas cargas orgânicas, convertendo os ácidos formados em metano.

A eficiência de todos os pré-tratamentos na produção de H₂ varia em função do tipo de inóculo. Mas ao longo dos ensaios de AHE houve inibição completa da atividade metanogênica.

O rendimento máximo foi alcançado sem uso de pré-tratamentos, mostrando que os pré-tratamentos são desnecessários, sendo suficiente apenas o controle do pH em valores entre 5 e 6, que pode ser alcançado com aplicação de altas cargas orgânicas, para inibição da atividade metanogênica.

Não houve relação direta entre produção de hidrogênio e produção de ácidos acético e butírico.

3.5. REFERÊNCIAS

ABREU, A.A.; DANKO, A.S.; ALVES, M.M., 2008. Biohydrogen production with an EGSB reactor using chloroform and 2-bromoethanesulfonate as inhibitors of hydrogen consuming bacteria. *Book of Abstracts of the 10th International Chemical and Biological Engineering Conference – CHEMPOR 2008*: 205-206.

AKUTSU, Y.; LEE, D.-Y.; LI, Y.-Y.; NOIKE, T., 2009. Hydrogen production potentials and fermentative characteristics of various substrates with different heat-pretreated natural microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34 (13): 5365–5372.

ALDIGUIER, A.S.; ALFENORE, S.; CAMELEYRE, X.; GOMA, G.; URIBELARREA, J.L.; GUILLOUET, S.E.; MOLINA-JOUVE, C., 2004. Synergistic temperature and ethanol effect on *Saccharomyces cerevisiae* dynamic behaviour in ethanol bio-fuel production. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 26 (4): 217-222.

AMORIM, E. L. C.; SADER, L. T.; SILVA, E. L., 2012. Effect of Substrate Concentration on Dark Fermentation Hydrogen Production Using an Anaerobic Fluidized Bed Reactor. *Applied biochemistry and biotechnology*, 166(5): 1248-1263.

AMORIM, E. L. C.; BARROS, A. R.; SILVA, E. L., 2010. Effect of alkalinity and organic loading rate in the fermentative H₂ production from an anaerobic fluidized bed reactor. *18th World Hydrogen Energy Conference 2010 - WHEC 2010*.

ANTONOPOULOU, G.; GAVALA, H.N.; SKIADAS, I.V.; LYBERATOS, G., 2011. Effect of substrate concentration on fermentative hydrogen production from sweet sorghum extract. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36 (8): 4843-4851.

ANTONOPOULOU, G.; GAVALA, H.N.; SKIADAS, I.V.; LYBERATOS, G., 2010. Influence of pH on fermentative hydrogen production from sweet sorghum extract. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35 (5): 1921-1928.

APHA/AWWA/WPCF. 2005. *Standard Methods For The Examination Of Water And Wastewater*, 21a Ed., Washington: American Public Health Association, 1600pp..

ASSAWAMONGKHOLSIRI, T.; REUNGSANG, A.; PATTRA, S., 2013. Effect of acid, heat and combined acid-heat pretreatments of anaerobic sludge on hydrogen production by anaerobic mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 30: 1-8.

ATLAS, R.M.; HOROWITS, A.; KRICHEVSKYM.; BEJ, A.K., 1991. Response of microbial populations to environmental disturbance. *Microbial Ecology*, 22: 249-256.

ATLAS, R.M., 1983. Diversity of microbial communities. *Advances in Microbial Ecology*, 7: 1-47.

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 (15): 4064-4073.

BAUCHOP, T., 1967. Inhibition of rumen methanogenesis by methane inhibition of rumen analogues. *Journal of Bacteriology*, 94 (1): 171-175.

BIEBL, H.; MENZEL, K.; ZENG, A-P.; DECKWER, W-D., 1999. Microbial production of 1,3-propanediol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52: 289-297.

CAI, G.; JIN, B.; SAINT, C.; MONIS, P., 2011. Metabolic flux network and analysis of fermentative hydrogen production. *Biotechnology Advances*, 29 (4): 375–387.

CHANG, F.-Y.; LIN, C.-Y., 2004. Biohydrogen production using an up-flow anaerobic sludge blanket reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29 (1): 33–39.

CHEN, C. C.; LIN, C. Y.; CHANG, J. S., 2001. Kinetics of hydrogen production with continuous anaerobic cultures utilizing sucrose as the limiting substrate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57 (1-2): 56-64.

CHIDTHAISONG, A.; CONRAD, R., 2000. Specificity of chloroform, 2-bromoethanesulfonate and fluoroacetate to inhibit methanogenesis and other anaerobic processes in anoxic rice field soil. *Soil Biological Biochemistry*, 32(7):977–88.

CHOOKAEW, T.; O-THONG, S.; PRASERTSAN, P., 2012. Fermentative production of hydrogen and soluble metabolites from crude glycerol of biodiesel plant by the newly isolated thermotolerant *Klebsiella pneumoniae* TR17. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37 (18): 13314-13322.

CHU, C-F.; EBIE, Y.; XU, K-Q.; LI, Y-Y.; INAMORI, Y., 2010. Characterization of microbial community in the two-stage process for hydrogen and methane production from food waste. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35 (15): 8253-8261.

COLLET, C. 2004. Hydrogen production by *Clostridium thermolacticum* during continuous fermentation of lactose. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29 (24): 1479-1485.

CONNELL, J.H., 1978. Diversity in tropical rain forests and coral reefs. *Science*, 199: 1302-1310.

DAVILA-VAZQUEZ, G.; ALATRISTE-MONDRAGÓN, F.; LEÓN-RODRÍGUEZ, A.; RAZO-FLORES, E., 2008. Fermentative hydrogen production in batch experiments using lactose, cheese whey and glucose: Influence of initial substrate concentration and pH. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33 (19): 4989-4997.

DUANGMANEE, T.; PADMASIRI, S. I.; SIMMONS, J. J.; RASKIN, L.; SUNG, S., 2007. Hydrogen production by anaerobic microbial communities exposed to repeated heat treatments. *Water Environmental Research*, 79:975-983.

GIRVAN, M.S.; CAMPBELL, C.D.; KILLHAM, K.; PROSSER, J.I.; GLOVER, L.A., 2005. Bacterial diversity promotes community stability and functional resilience after perturbation. *Environmental Microbiology*, 7 (3): 301-313.

HEINZEL, A.; VOGEL, B.; HUBNER, P., 2002. Reforming of natural gas – hydrogen generation for small scale stationary fuel cell systems. *Journal of Power Sources*, 105: 202-207.

HOBSON, P.N.; MANN, S.O., 1961. the isolation of glycerol-fermenting and lipolytic bacteria from the rumen of the sheep. *Journal of General Microbiology*, 25: 227-240.

HU, B.; CHEN, S., 2007. Pretreatment of methanogenic granules for immobilized hydrogen fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 32: 3266-3273.

HULSHOFF POL, L.W.; CASTRO LOPES, S.I.; LETTINGA, G.; LENS, P.N.L., 2004. Anaerobic sludge granulation. *Water Research*, 38:1376-1389.

HWANG, M.H.; JANG, N.J.; HYUN, S.H.; KIM, I.S., 2004. Anaerobic bio-hydrogen production from ethanol fermentation: the role of Ph. *Journal of Biotechnology*, 111 (3): 297-309.

ITO, T.; NAKASHIMADA, Y.; SENBA, K.; MATSUI, T.; NISHIO, N., 2005. Hydrogen and Ethanol Production from Glycerol-Containing Wastes Discharged after Biodiesel Manufacturing Process. *Journal of bioscience and bioengineering*, 100 (3): 260–265.

JARVIS, G.N., MOORE, E.R.B.; THIELE, J.H., 1997, Formate and ethanol are the major products of glycerol fermentation produced by a *Klebsiella planticola* strain isolated from red deer. *Journal of Applied Microbiology*, 83: 166–174.

JOYNER, A.E.; WINTER, W.T.; GODBOUT, D.M., 1977. Studies on some characteristics of hydrogen production by cell-free extracts of rumen anaerobic bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 23 (3): 346-353.

JUNG, K-W.; KIM, D-H.; SHIN, H-S., 2011. A simple method to reduce the start-up period in a H₂-producing UASB reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36 (2): 1466-1473.

KALIA, V.; PUROHIT, H., 2008. Microbial diversity and genomics in aid of bioenergy. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35 (5): 403-419.

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

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

KIM, S.-H.; HAN, S.-K.; SHIN, H.-S., 2006. Effect of substrate concentration on hydrogen production and 16S rDNA-based analysis of the microbial community in a continuous fermenter. *Process Biochemistry*, 41 (1): 199–207.

KOSTER I.W.; CRAMER, A., 1987. Inhibition of methanogenesis from acetate in granular sludge by long-chain fatty acids. *Applied and Environmental Microbiology*, 53 (2): 403-409.

KRAEMER, J. T.; BAGLEY, D. M., 2007. Improving the yield from fermentative hydrogen production. *Biotechnology Letters*, 29 (5): 685-695

KUMAR, S.; PUNIYAA.K.; PUNIYTA, M.; DAGAR, S.S.; SIROHI, S.K.; SINGH, K.; GRIFFITH, G.W., 2009. Factors affecting rumen methanogens and methane mitigation strategies. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25: 1557-1566.

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

LALMAN, J.A.; BAGLEY, D.M., 2000. Anaerobic degradation and inhibitory effects of linoleic acids. *Water Research*, 34 (17): 4220-4228.

LEE, D-J.; SHOW, K-Y.; SU, A., 2011. Dark fermentation on biohydrogen production: Pure culture. *Bioresource Technology*, 102 (18): 8393-8402

LEE, M.-J.; SONG, J.-H.; HWANG, S.-J., 2009. Effects of acid pre-treatment on biohydrogen production and microbial communities during dark fermentation. *Bioresource Technology*, 100 (3): 1491–1493.

LEVIN, D. B.; PITT, L.; LOVE, M., 2004. Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29 (2): 173–185.

LI, Y.F.; REN, N.Q.; CHEN, Y.; ZHENG, G.X., 2007. Ecological mechanism of fermentative hydrogen production by bacteria. *International Journal of Hydrogen Energy*, 32 (6): 755-760.

LIN, C. Y.; LAY, C. H., 2004. Effects of carbonate and phosphate concentrations on hydrogen production using anaerobic sewage sludge microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29 (3): 275–281.

LIU, Q.; ZHANG, X.; ZHOU, Y.; ZHAO, A.; CHEN, S.; QIAN, G.; XU, Z. P., 2011. Optimization of fermentative biohydrogen production by response surface methodology using fresh leachate as nutrient supplement. *Bioresource Technology*, 102 (18): 8661–8668.

LUO, G.; XIE, L.; ZHOU, Q.; ANGELIDAKI, I., 2011. Enhancement of bioenergy production from organic wastes by two-stage anaerobic hydrogen and methane production process. *Bioresource Technology*, 102 (18): 8700–8706.

MACARTHUR, R., 1955. Fluctuations on animal population and a measure of community stability. *Ecology* 36: 533-536.

MACLEOD, F.A.; GUIOT, S.R.; COSTERTON, J.W., 1990. Layered structure of bacteria aggregates produced in a upflow anaerobic sludge bed and filter reactor. *Applied Environmental Technology Microbiology*, 56: 1598-1607.

MANGAYIL, R.; KARP, M.; SANTALA, V., 2012. Bioconversion of crude glycerol from biodiesel production to hydrogen. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37 (17): 1-7.

MARKOV, S.A.; AVERITT, J.; WALDRON, B., 2011. Bioreactor for glycerol conversion into H₂ by bacterium *Enterobacter aerogenes*. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36 (1): 262-266.

MATHEWS, J.; WANG, G., 2009. Metabolic pathway engineering for enhanced biohydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34 (17): 7404–7416.

MCCARTY, P.L. 1964. Anaerobic waste treatment fundamentals, Part 3, toxic materials and their control. *Public works* 95: 91–94.

MCDONALD, G., 2003. *Biogeography: Introduction to space, time and life*. Ed.: John Wiley & Sons. The University of California: Wiley, 409 pp.

MILLER, T.L.; WOLIN, M.J., 1973. Formation of formate and hydrogen by *Ruminoccus albus*. *Journal of Bacteriology*, 116 (2): 836-846.

MOHAN, S. V.; BABU, V. L.; SARMA, P. N., 2008. Effect of various pretreatment methods on anaerobic mixed microflora to enhance biohydrogen production utilizing dairy wastewater as substrate. *Bioresource Technology*, 99 (1): 59–67.

NING, Y. Y.; JIN, D. W.; SHENG, G. P.; HARADA, H.; SHI, X.-Y., 2012. Evaluation of the stability of hydrogen production and microbial diversity by anaerobic sludge with chloroform treatment. *Renewable Energy*, 38(1): 253–257.

NISSILA, M.E.; LI, Y-C.; WU, S-Y.; LIN, C-Y.; PUHAKKA, J.A., 2012. Hydrogenic and methanogenic fermentation of birch and conifer pulps. *Applied Energy*, 100: 58-65.

NISSILA, M.E.; TAHTI, H.P.; RINTALA, J.A.; PUHAKKA, J.A., 2011. Thermophilic hydrogen production from cellulose with rumen fluid enrichment cultures: effects of different heat treatments. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36 (2): 1482-1490.

NÜBEL, U.; ENGELN, B.; FELSKE, A.; SNAIDR, J.; WIESHUBER, A.; AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; BACKHAUS, H., 1996. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *Journal of Bacteriology*, 178:5636-5643

ODUM, E.P. 2004. *Fundamentals of Ecology*. 6^a Ed. Fundação Calouste Gulbenkian 927 pp..

OH, S-E.; VAN GINKEL, S.; LOGAN, B.E., 2003. The relative effectiveness of pH control and heat treatment for enhancing biohydrogen gas production. *Environmental Science and Technology*, 37 (22): 5186-5190.

RACHMAN, M.A.; ENIYA, L.D.; LIASARI, Y.; NASEF, M.M.; AHMAD, A.; SAIDI, H., 2012. Utilization of hydrogen gas production for electricity generation in fuel cell by *Enterobacter aerogenes* ADH 43 with many kinds of carbon sources in batch stirred tank reactor. *African Journal of Biotechnology*, 11 (36): 8872-8879.

REN, N.; WANG, A.; GAO, L.; XIN, L.; LEE, D-J.; SU, A., 2008. Bioaugmented hydrogen production from carboxymethyl cellulose and partially delignified corn stalks using isolated cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33 (19): 5250–5255.

ROSSI, D. M., COSTA, J. B.; SOUZA, E. A.; PERALBA, M. D. C. R.; SAMIOS, D.; AYUB, M. A. Z., 2011. Comparison of different pretreatment methods for hydrogen production using environmental microbial consortia on residual glycerol from biodiesel. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(8): 4814–4819.

SAKAI, K. 2008. *Denaturing Gel Gradient Electrophoresis (DGGE) – its applications, limitations and perspectives in microbial ecological studies*. Laboratory of Soil Biology & Biochemistry, Division of Soil Science & Plant Production, Department of Plant Resources, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Japan.

SARMA, S. J.; BRAR, S. K.; SYDNEY, E. B.; BIHAN, Y. L.; BUELNA, G.; SOCCOL, C. R., 2012. Microbial hydrogen production by bioconversion of crude glycerol: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37 (8): 6473-6490.

SEIFERT, K.; WALIGORSKA, M.; WOJTOWSKI, M.; LANIECKI, M., 2009. Hydrogen generation from glycerol in batch fermentation process. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34 (9): 3671–3678.

SELEMBO, P. A.; PEREZ, J. M.; LLOYD, W. A.; LOGAN, B. E., 2009. Enhanced hydrogen and 1,3-propanediol production from glycerol by fermentation using mixed cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 104(6): 1098-1106.

SILVA, G. M.; SILVA, L. G. M.; OIKNINE, L.; DASSOLER, T. S., 2009. Produção biotecnológica de hidrogênio. Relatório de atividades, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.

SITTIJUNDA, S.; REUNGSANG, A., 2012. Media optimization for biohydrogen production from waste glycerol by anaerobic thermophilic mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37 (20): 15473-15482.

SONG, Z-X.; DAI, Y.; FAN, Q-L.; LI, X-H.; FAN, Y-T.; HOU, H-W., 2012. Effects of pretreatment method of natural bacteria source on microbial community and biohydrogen production by dark fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37 (7): 5631-5636.

SOTO, M; MÉNDEZ, R; LEMA, J M., 1993. Methanogenic and non-methanogenic activity tests. Theoretical basis and experimental set up. *Water Research.*, 27.(8): 1361-1376.

SPEECE, R.E., 1996. *Anaerobic biotechnology for industrial wastewaters*. Tennessee: VanderbiltUniversity, 394 p..

STEWART, C.S., 1975. Some effects of phosphate and volatile fatty acids salts on the growth of rumen bacteria. *Journal of General Microbiology*, 89: 319–326

TORTORA, G.R. 2005. *Microbiologia*. 8ª Ed. Porto Alegre: Artmed. 920p..

VAN GINKEL, S. W.; SUNG, S.; LAY, J-J., 2001. Biohydrogen production as a function of pH and substrate concentration. *Environmental Science & Technology*, 35(24): 4726-4730.

VAN NIEL, E.W.J., BUDDE, M.A.W., DE HAAS, G.G., VAN DER WAL, F.J., CLAASEN, P.A.M., STAMS, A.J.M., 2002. Distinctive properties of high hydrogen producing extreme thermophiles, *caldicellulosiruptor saccharolyticus* and *thermotoga elfii*. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27 : 1391–1398.

VLASSIS, T.; ANTONOPOULOU, G.; STAMATELATOU, K.; LYBERATOS, G., 2012. Anaerobic treatment of glycerol for methane and hydrogen production. *Global NEST Journal*, 14 (2): 149-156.

VIANA, M.B. 2012. Produção de biogás a partir de glicerol oriundo de biodiesel. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP.

VIANA, M. B.; FREITAS, A. V.; LEITÃO, R. C.; PINTO, G. A. S.; SANTAELLA, S. T., 2012. Anaerobic digestion of crude glycerol: a review. *Environmental Technology Reviews*, 1(1): 81–92.

WAGNER, M.; LOY, A.; NOGUEIRA, R.; PURKHOLD, U.; LEE, N.; DAIMS, H., 2002. Microbial community composition and function in wastewater treatment plants. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 81: 665-680.

WANG, J.; WAN, W., 2008. Comparison of different pretreatment methods for enriching hydrogen-producing bacteria from digested sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33: 2934– 2941

WANG, Z-X.; ZHUGE, J.; FANG, H.; PRIOR, B.A., 2001. Glycerol production by microbial fermentation: A review. *Biotechnologies Advances*, 19: 201-223.

WICHER, E.; THIEL, M.; LANIECKI, M., 2010. Hydrogen generation from waste glycerol in dark fermentation process. *18th World Hydrogen Energy Conference 2010 - WHEC 2010*.

WITTEBOLLE, L.; MARZORATI, M.; CLEMENT, L.; BALLOI, A.; DAFFONCHIO, D.; HEYLEN, K.; DE VOS, P.; VERSTRAETE, W.; BOON, N., 2009. Initial community evenness favours functionality under selective stress. *Nature*, 458 (7238): 623-626.

WOO, J.; SONG, Y., 2010. Influence of temperature and duration of heat treatment used for anaerobic seed sludge on biohydrogen fermentation. *KSCE Journal of Civil Engineering*, 14 (2): 141-147.

XING, D.; REN, N.; RITTMANN, B.E., 2008. Genetic diversity of hydrogen-producing bacteria in an acidophilic ethanol-H₂-coproducing system, analyzed using the [Fe]-hydrogenase gene. *Applied and Environmental Microbiology*, 74 (4): 1232-1239.

YANG, F.; HANNA, M.A.; SUN, R., 2012. Value-added uses for crude glycerol - a byproduct of biodiesel production. *Biotechnology for Biofuels*, 5 (1): 13.

YAZDANI, S.S.; GONZALEZ, R., 2007. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. *Current Opinion in Biotechnology*, 18 (3): 213-219.

YOKOYAMA, H.; OHMORI, H.; WAKI, M.; OGINO, A.; TANAKA, Y., 2009. Continuous hydrogen production from glucose by using extreme thermophilic anaerobic microflora. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 107 (1): 64–66.

YU, J; TAKAHASHI, P., 2007. Biophotolysis-based hydrogen production by cyanobacteria and green microalgae. *Communicating current research and educational topics and trends in applied microbiology*: 79–89.

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

ZHANG, S.; KIM, T-H.; LEE, Y.; HWANG, S-J., 2012. Effects of VFAs Concentration on Bio-hydrogen Production with *Clostridium bifermentans* 3AT-ma. *Energy Procedia*, 14: 518-523.

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

ZHU, H.; BÉLAND, M., 2006. Evaluation of alternative methods of preparing hydrogen producing seeds from digested wastewater sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31 (14): 1980-1988.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar de diversos autores afirmarem que o pré-tratamento do lodo enriquece a comunidade com espécies produtoras de H_2 , ao mesmo tempo em que inibe ou elimina a atividade metanogênica, apenas a redução do pH na fonte de inóculo ED para valores pH abaixo de 5,5, causada pela aplicação de uma alta carga orgânica (20 gDQO/L), promoveu a maior aumento da diversidade e suprimiu a atividade das *archaeas* metanogênicas, resultando no maior η_{H_2} .

Do ponto de vista de grau de impacto, o pré-tratamento térmico afetou negativamente a comunidade microbiana, diminuindo o índice de diversidade. Pré-tratamentos menos fortes (como adição de químicos) ou o controle de parâmetros operacionais (carga orgânica, pH, temperatura) são suficientes para gerar uma alta diversidade geral de espécies. Essa alta diversidade também está relacionada de maneira direta com a produtividade e estabilidade do sistema.

Confirmando os resultados deste trabalho, lodos de estações de tratamento de esgoto doméstico sem qualquer pré-tratamento por possuírem uma alta diversidade, já foram usados como inóculo de reatores hidrogenogênicos com sucesso por outros autores, que os estudaram também após diversos tipos de pré-tratamentos.

Outro aspecto fundamental, é que a composição do inóculo determina a efetividade do pré-tratamento. E esses estresses seletivos, dependentemente da fonte de inóculo, pré-tratamentos como térmico e ácido podem inativar também bactérias hidrogenogênicas não formadoras de esporos, ou não eliminar completamente a atividade de metanogênicas em lodo granular. A alteração da diversidade é dependente, portanto, de fatores como, temperatura, concentração do ácido e tempo de contato, pois estes fatores irão determinar o grau de impacto da perturbação.

Desta forma, conclui-se que a diminuição do pH, provocada pela elevada concentração de substrato, é suficiente para inibir a metanogênese, apesar de que cada inóculo tenha um tempo de resposta diferente, a produção de ácidos orgânicos que ocorre, suprime a atividade metanogênica. A aplicação de altas cargas orgânicas a inóculos que não estejam previamente adaptados a (como lodos de estações de tratamento de esgoto doméstico), resulta em taxa de acidogênese

maior que a metanogênese, causando acumulação de ácidos orgânicos, o que inibe o consumo de H_2 pelas metanogênicas hidrogenotróficas.

Foi possível observar, também, que apenas o controle de pH provoca mudanças na comunidade microbiana, aumentando a abundância relativa de algumas espécies de bactérias, e enriquecendo a comunidade com aumento da produtividade. No entanto, são necessários estudos posteriores a fim de identificar esses microrganismos e conhecer de maneira mais detalhada suas rotas metabólicas, bem como os principais produtos formados além do hidrogênio. Esses aspectos devem ser levados em conta para a aplicação em escala real de reatores produtores de H_2 com estabilidade do sistema e redundância funcional.