

**FRANCISCO ABRAHAM RÍOS ALCARAZ**

**OBTENÇÃO DE CONSÓRCIO DE BACTÉRIAS FOTOHETEROTRÓFICAS  
GERADORAS DE H<sub>2</sub> VISANDO SUA PRODUÇÃO EM REATOR ANAERÓBIO EM  
BATELADA**

Dissertação apresentada ao Instituto de Química,  
Universidade Estadual Paulista, como parte dos  
requisitos para obtenção do título de Mestre em  
Biotecnologia.

**Orientadora: Prof. Dra. Sandra Imaculada  
Maintinguer**

**Araraquara  
2016**

FICHA CATALOGRÁFICA

R586o	<p>Ríos Alcaraz, Francisco Abraham</p> <p>Obtenção de consórcio de bactérias fotoheterotróficas geradoras de H<sub>2</sub> visando sua produção em reator anaeróbio em batelada / Francisco Abraham Ríos Alcaraz. – Araraquara : [s.n], 2015</p> <p>80 f. : il.</p> <p>Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química</p> <p>Orientador: Sandra Imaculada Maintiguer</p> <p>1. Hidrogênio. 2. Biocombustíveis. 3. Bactérias fotossintéticas. 4. Águas residuais - purificação. 5. Bioengenharia. I. Título</p>
-------	---

## DADOS CURRICULARES

**Nome:** Francisco Abraham Ríos Alcaraz

**Endereço profissional:** Universidades Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”. Instituto de Química (IQ). Av. Prof. Francisco Degni, nº 55. Quitandinha – 14800-900.

**Numero:** +55 (16)3301-9500

**E-mail:** [pancreatium@gmail.com](mailto:pancreatium@gmail.com)

### Formação acadêmica:

- Licenciado em Biologia pela Universidade de Sevilla (Espanha) em 2009.
- Licenciado em Bioquímica pela Universidade de Sevilla (Espanha) em 2013.

### Atividades acadêmicas relevantes: participação e/ou apresentação de trabalhos em eventos científicos.

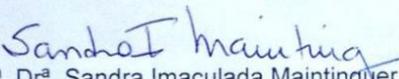
- 1º Workshop Latinoamericano do Biohidrogênio, no período de 28 a 30 de Julho de 2014, São Carlos/ SP Brasil.
- II workshop de Bioenergía. - IPBEN - Instituto de Pesquisa em Bioenergia. UNESP Rio Claro/ SP Brasil, 4 -5 de Dezembro de 2014. Apresentação do poster: *Obtenção de consórcio fotoheterotrófico gerador de H<sub>2</sub> a partir de ácidos orgânicos.*
- IV SIGERA – Simpósio Internacional sobre Gerenciamento dos Resíduos Agropecuários e Agroindustriais - Rio de Janeiro, 4-7 de Maio de 2015. Apresentação do poster: *Utilização de ácidos orgânicos por consórcios fotoheterotróficos geradores de H<sub>2</sub>.*
- 28º Congresso Brasileiro de Microbiologia. Florianópolis, 18-22 de Outubro de 2015. Apresentação do poster: *Hydrogen generation by photoheterotrophic bacterial consortia with organic wastes.*

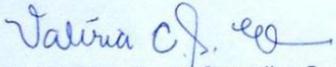
FRANCISCO ABRAHAM RÍOS ALCARAZ

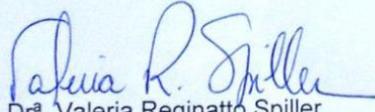
Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Araraquara, 04 de abril de 2016.

BANCA EXAMINADORA

  
Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Sandra Imaculada Maintinguer (Orientadora)  
Instituto de Pesquisa em Bioenergia / UNESP / Rio Claro - SP

  
Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Valéria de Carvalho Santos Ebinuma  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas / UNESP / Araraquara - SP

  
Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Valéria Reginatto Spiller  
Faculdade de Filosofia Ciências e Letras / USP / Ribeirão Preto - SP

**Este trabajo está dedicado a ti Angélica,  
por tu espíritu libre, por tu amor incondicional, por tu  
lucha y sacrificio, por tu valioso ejemplo de mujer y de  
madre... por enseñarme a amar.**

# AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora Sandra, sua paciência e ensinamentos; aos alunos Renan, Carol e Kamili pela parceria e apoio no laboratório. Aos colegas do CEMPQC pela colaboração prestada.

Um especial agradecimento aos professores Hideko, Nelson, sua mulher e os alunos de todos deles, pelo acolhimento na minha chegada ao Instituto de Química.

Menção especial para o professor Edison, por sua amabilidade e ensinamentos na área de fotônica e à pesquisadora Carolina Zampol Lazaro quem muito amavelmente me guiou nos primeiros passos da pesquisa.

As secretarias da Química, Marie e Luiza, ao pessoal da biblioteca, assim como ao técnico Marquinho; por sua amabilidade e ajuda em todo momento.

Especial agradecimento também para Vani e sua bela família, quem tem sido como uma segunda mãe nesse tempo.

Aos amigos brasileiros, ao povo latino e gringos lindos da UNESP de Araraquara, por todas as loucuras, vivencias e amizade compartilhada... porque sem eles teria sido muito difícil ficar tão longe do lar.

A Deus, por me trazer até o Brasil e me permitir conhecer e compartilhar momentos inesquecíveis com pessoas tão especiais para mim quanto Nerian, Paulo, Cintia, Rafael, Lucas, Luna e sua acolhedora família, Teddy e Bea, Anna e sua pequena e linda mamãe, Ruben e Anita, Mari e sua divertida mamá e tantos outros que conheci nesses maravilhosos anos.

*“Porque al igual que tenéis ojos para ver la luz, oídos para oír los sonidos, tenéis un corazón para percibir, con él, el tiempo. Y todo el tiempo que no se percibe con el corazón está tan perdido como los colores del arco iris para un ciego o el canto de un pájaro para un sordo.”*

Michael Ende. **Momo**

“Pois onde estiver o seu tesouro,  
aí também estará o seu coração.”

Mateus 6:21. **NVI**

## RESUMO

A bioconversão de diferentes materiais orgânicos em hidrogênio é uma tecnologia sustentável. Inóculos de climas tropicais, como o Brasil, com temperaturas médias de 25°C podem favorecer o crescimento bacteriano. A geração de hidrogênio com consórcios bacterianos têm vantagens sobre culturas puras quanto aplicado no tratamento de águas residuárias. O hidrogênio pode ser gerado em duas fases durante os processos anaeróbios. Em primeiro lugar, hidrogênio e ácidos orgânicos podem ser produzidos por processos fermentativos. Esses ácidos gerados podem ser usados por bactérias fotoheterotróficas na segunda fase, durante a operação dos reatores anaeróbios na presença de luz. O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial de produção hidrogênio a partir de resíduos orgânicos por consórcios de bactérias fotoheterotróficas. Foram feitos 12 ensaios (I-XII) separadamente, em triplicatas de reatores anaeróbios em batelada, em meio de cultivo *Rhodospirillaceae*, *headspace* N<sub>2</sub> (100%), pH 7.0±1, a 37°C. Foram comprovados os efeitos com duas potências de intensidade de luz (8,8±1 e 18,5±1 W/m<sub>2</sub>) e diferentes concentrações de ácidos butírico, acético, além de efluentes de processos fermentativos procedentes de glicerol bruto e águas residuárias citrícolas. As condições ótimas para a produção de hidrogênio foram de 18.5±1 W/m<sub>2</sub> de intensidade de luz e 1.7 g/L para o ácido acético (II), 1.0 g/L para o ácido butírico (V), 1.0 g de COD/L de glicerol efluente (IX), e 0.5 g de DQO/L para o efluente de águas residuárias citrícolas (XII). Nessas condições, a produção de hidrogênio foi de 4.9 (II), 4.0 (V), 3.0 (IX) e 2.3 (XII) mmol H<sub>2</sub>/L, eficiência de remoção de 92.5, 83.6, 76.1, 83.1%, e crescimento celular (ABS<sub>660</sub>) de 3.0(II), 1.6 (V), 1.6 (IX), 1.8 (XII) às 61, 54, 64 e 65 h, respectivamente. A análise microscópica da biomassa mostrou predominância de bacilos Gram negativos, morfologia característica de bactérias fotoheterotróficas geradoras de H<sub>2</sub>. O pH observado de 10.1 (II), 9.8 (V), 9.9 (IX) e 9.7 (XII), justificou os consumos de ácidos orgânicos pelo consórcio fotoheterotrófico no final da operação. Os consórcios bacterianos fotoheterotróficos apresentaram potencial na produção de biohidrogênio elevado, o que pode ser aplicado no tratamento de resíduos orgânicos que contenham ácidos voláteis.

**Palavras-chave:** Hidrogênio. Ácido acético. Ácido butírico. Efluentes de fermentação. Glicerol bruto. Resíduos citrícolas. Bactérias fotoheterotróficas.

## ABSTRACT

The bioconversion of different organic materials to hydrogen is a sustainable technology. Inocula from tropical climates such as Brazil which average temperatures around 25°C may favour the bacterial growth. Hydrogen generation with bacterial consortia have advantages over pure cultures regarding application to wastewater treatment. The hydrogen can be generated in two stages during the anaerobic processes. Firstly, hydrogen and organic acids can be produced by dark fermentation. The acids generated during the first stage of the fermentation process can be used by phototrophic bacteria in the second stage during the operation of anaerobic batch reactors on the light presence. The aim of this study was evaluate the hydrogen producing potential from organic wastes by phototrophic bacterial consortia. Assays (I - XII) were made separately in triplicates of anaerobic batch reactors, *Rhodospirillaceae medium* (Chi Mei Lee, 2005), headspace with N<sub>2</sub> (100%), pH 7.0±1, at 37°C. Effects with two potencies of light intensity (8.8±1 and 18.5±1 W/m<sup>2</sup>) and different concentrations of butyric acid, acetic acid and dark fermentation effluents from crude glycerol and citrus wastewaters were optimized. The optimal conditions for hydrogen production from phototrophic consortia were 18.5±1 W/m<sup>2</sup> of light intensity and 1.7 g/L for acetic acid (II), 1.0 g/L for butyric acid (V), 1.0 g COD/L for Glycerol effluent (IX), and 0.5 g COD/L for citrus wastewater effluent (XII). Under the optimum conditions, the hydrogen production of 4.9 (II), 4.0 (V), 3.0 (IX) and 2.3 (XII) mmol H<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> with a removal efficiency of 92.5, 83.6, 76.1, 83.1% respectively, was obtained. High cellular growth (ABS<sub>660</sub>) of 3.0 (II), 1.6 (V), 1.6 (IX), 1.8 (XII) at 61, 54, 64 and 65 hours, respectively was observed. Microscopic analysis of biomass showed the predominance of Gram negative rods; which morphology is characteristic of phototrophic H<sub>2</sub>-generating bacteria. The pH observed for essays 10.1 (II), 9.8 (V), 9.9 (IX) and 9.7 (XII) respectively could justify the consumptions of organic acids by the phototrophic consortia at the end of operation. The phototrophic bacterial consortia showed high potential on hydrogen bio-production and they can be applied on organic wastes containing volatile acids.

**Keywords:** Hydrogen. Butyric acid. Acetic acid. Crude glycerol. Photoheterotrophic bacterial consortia. Hydrogen bio-production.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Esquema do modelo de duas fases usado na pesquisa	15
Figura 2 -	Esquema da fotofermentação anaeróbia em bactérias PNS	18
Figura 3 -	Esquema do complexo coletor de luz II (LHC 2)	20
Figura 4 -	Esquema do complexo LH1 - RC	22
Figura 5 -	Níveis de excitação eletrônica de Bchls e Cars e seus possíveis caminhos de transferência de excitação	23
Figura 6 -	Transferência energética entre Bacterioclorofilas	24
Figura 7 -	Sequência da transferência eletrônica impulsada por luz numa típica unidade fotossintética de bactérias PNS	25
Figura 8 -	Estrutura tridimensional do complexo Mo-Nitrogenase	26
Figura 9 -	Esquema da transferência eletrônica no complexo Nitrogenase	27
Figura 10 -	Fluxograma experimental	34
Figura 11 -	Sistemas de purificação	39
Figura 12 -	Reatores anaeróbios em batelada mantidos sob iluminação	41
Figura 13 -	Espectro de emissão (a) e densidade de potência emitida (b) pelas lâmpadas incandescentes	46
Figura 14 -	Espectro de absorção do cultivo de bactérias PNS	49
Figura 15 -	Microscopia do consórcio fotoheterotrófico	50
Figura 16 -	Variação temporal do crescimento dos consórcios fotoheterotróficos nos ensaios realizados	53
Figura 17 -	Geração de H <sub>2</sub> durante operação dos reatores anaeróbios fotoheterotróficos	54
Figura 18 -	Consumo de carbono nos diferentes ensaios realizados em reatores fototróficos geradores de H <sub>2</sub>	55
Figura 19 -	Espaço de cor RGB	72

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Composição do meio de cultivo para enriquecimento celular	36
Tabela 2 -	Composição da solução traço de metais	37
Tabela 3 -	Composição da solução ferro-citrato III	37
Tabela 4 -	Composição da solução de vitamina B <sub>12</sub>	37
Tabela 5 -	Composição do meio de cultivo para produção de H <sub>2</sub>	38
Tabela 6 -	Composição do meio de cultivo para purificação do consórcio fotoheterotrófico	39
Tabela 7 -	Montagem dos Ensaios em reatores anaeróbios em batelada	42
Tabela 8 -	Resultados dos Ensaios em reatores anaeróbios em batelada	57
Tabela 9 -	Comparação dos resultados obtidos com a literatura	63
Tabela 10 -	Valores de remoção (%) para os ensaios com efluentes	67

## LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	Adenosina trifosfato
Bactérias PNS	( <i>Purple non-sulfur bacteria</i> ) Bactéria púrpuras não sulfurosas
Bchls	Bacterioclorofilas
Cars	Carotenoides
Cyt	Citocromo
CIE	Comission Internationale de l'Éclairage (International Commission on Illumination)
DQO	Demanda Química de Oxigênio
LCE	Eficiência de conversão da luz
LHC1	( <i>Light harvesting complex I</i> ) complexo coletor I
LHC2	( <i>Light harvesting complex II</i> ) complexo coletor II
P	Produtividade
PMF	Força proton motriz
PSII	( <i>Photosystem II</i> ) FOTOSISTEMA II
PHB	Poli-hidroxibutirato
RC	Centro de Reação
Rm	Taxas de produção de hidrogênio
STV	Sólidos Totais Voláteis
SCE	Eficiência de conversão do substrato
$\lambda$	Fase Lag

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>13</b>
<b>1.1</b>	<b>Revisão bibliográfica</b>	<b>16</b>
1.1.1	Filogenia das Bactérias púrpuras não sulfurosas	16
1.1.2	Conversão de energia em bactérias fotossintéticas anoxigênicas	17
1.1.3	Componentes estruturais da unidade Fotossintética	19
1.1.4	Mecanismo fotossintético	22
1.1.5	Nitrogenase	26
1.1.6	Potencialidade do uso de águas residuárias para geração de H <sub>2</sub> por bactérias PNS	29
1.1.7	Glicerol	30
1.1.8	Resíduos citrícolas	32
<b>2.</b>	<b>PARTE EXPERIMENTAL</b>	<b>33</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivos</b>	<b>33</b>
<b>2.2</b>	<b>Fluxograma experimental</b>	<b>33</b>
<b>2.3</b>	<b>Fonte de inóculos</b>	<b>35</b>
<b>2.4</b>	<b>Enriquecimento celular</b>	<b>35</b>
2.4.1	Obtenção de consórcios fotoheterotróficos	35
2.4.2	Enriquecimento celular de bactérias PNS	36
<b>2.5</b>	<b>Técnicas de isolamento das PNS</b>	<b>38</b>
<b>2.6</b>	<b>Ensaio de produção de hidrogênio</b>	<b>41</b>
2.6.1	Montagem dos reatores anaeróbios em batelada	41
<b>2.7</b>	<b>Análises físico-químicas</b>	<b>43</b>
2.7.1	Crescimento Celular	43
2.7.2	Consumo dos substratos orgânicos	44
2.7.3	pH	44
2.7.4	Medidas de Pressão Interna no Headspace dos Reatores	44
2.7.5	Determinação de H <sub>2</sub> no <i>headspace</i> dos reatores anaeróbios	44
2.7.6	Análise espectrofotométrica de absorção	45
2.7.7	Análises de potência luminosa e espectrometria de emissão	46
2.7.8	Análises microscópicas	47
2.7.9	Ajuste de dados experimentais	47

<b>3.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>48</b>
<b>4.</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>70</b>
<b>4.1</b>	<b>Considerações finais</b>	<b>70</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>72</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Na busca de alternativas para proteger o planeta de emissões causadas por combustíveis fósseis, o gás hidrogênio aparece como vetor de energia e de possível combustível, que uma vez produzido por múltiplas fontes de energia primária e com diferentes métodos, traz benefícios econômicos e ambientais (DAS et al., 2008). Isto se deve a que possui o maior conteúdo de energia por unidade de massa entre os combustíveis gasosos conhecidos ( $H_2$ : 120 MJ/Kg; gasolina: 43,5 MJ/Kg; etanol: 27,4 MJ/Kg; carvão: 27,2 MJ/Kg; lenha seca: 14,6 MJ/Kg;) (MIDILLI; DINCER; AY, 2006; MEHER et al., 2007). Além disso, é o único que oxidado em combustão, produz apenas água como produto final da reação (HAWKES et al., 2007). Há muitos anos têm-se utilizado combustíveis fósseis para geração de energia e estes além de serem fontes não renováveis, liberam muitos compostos prejudiciais tanto ao meio ambiente quanto ao ser humano (KOTAY, S. M.; DAS, D., 2008). Observa-se que durante a combustão, para obtenção deste tipo de energia, ocorre a liberação de componentes orgânicos como  $CO_x$ ,  $NO_x$ ,  $SO_x$ ,  $C_xH_x$ , fuligem, dentre outros. (DAS, VEZIROGLU, 2001). Entre os processos de produção de hidrogênio, que foram desenvolvidos e estudados, a produção biológica tem despertado grande interesse nas últimas décadas. Diversas pesquisas demonstram a viabilidade da utilização do  $H_2$  produzido biologicamente para geração de energia (MAINTINGUER et al., 2011). Esta é uma alternativa importante para atender a demanda elevada de energia, pois não gera gases de efeito estufa, o que favorece o meio ambiente. Adicionado a isto, a possível escassez futura de fontes de energia convencionais. Tais sistemas têm características muito favoráveis para países de clima tropical como o Brasil, com temperaturas médias anuais em torno de  $25^\circ C$  que podem favorecer a diversidade microbiana (MAINTINGUER et al., 2015).

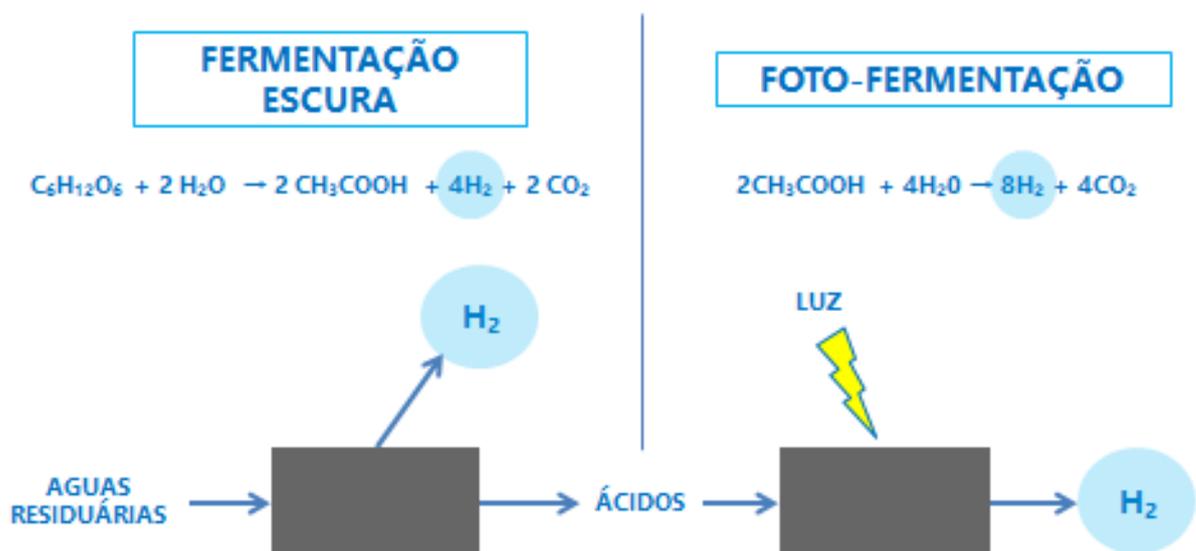
O biohidrogênio pode ser produzido através de três vias biológicas: a fermentação, a fotofermentação e a biofotólise. A produção biológica de hidrogênio pode ser operada a temperatura e pressão atmosférica ambiente, apresentando um menor consumo de energia em comparação com os processos termoquímicos e eletroquímicos (SUZUKI, 1982). A conversão microbiológica de substratos orgânicos em  $H_2$  através de diversas vias metabólicas, tais como os processos dependentes de luz realizados por bactérias fotossintéticas ou os fermentativos com bactérias

acidogênicas, é de interesse primordial, pois tem potencial de produção de  $H_2$  a partir de resíduos orgânicos renováveis (MIYAKE, J.; MIYAKE, M.; ASADA, Y., 1999). A foto-conversão de água em  $H_2$  usa um dos recursos energéticos mais abundantes do planeta: a luz solar. Vários microrganismos tais como bactérias fotoheterotróficas anoxigênicas, cianobactérias, algas ou bactérias fermentativas, podem ser utilizados para produção biológica de hidrogênio; conseguindo assim converter a abundante energia luminosa em um vetor de energia química mais limpa e eficiente. Entre estes microrganismos, as bactérias fotoheterotróficas anoxigênicas púrpuras não sulfurosas (PNS) são organismos potenciais para produção em larga escala devido às suas elevadas eficiências de conversão e utilização de variedade de substratos, tanto para crescimento, como para produção de hidrogênio (KOKU et al., 2002). Bactérias PNS vivem no fundo de lagoas ou lagos, onde podem crescer nos modos fotoheterotrófico, fotoautótrofico ou quimioheterotrófico, mudando de metabolismo dependendo das condições ambientais tais como: grau de anaerobiose, disponibilidade de fonte de carbono ( $CO_2$  para crescimento autotrófico, compostos orgânicos para crescimento heterotrófico) e disponibilidade de luz (necessário para crescimento fototrófico) (MADIGAN et al., 2013).

No processo de fotofermentação, microrganismos fotossintéticos são capazes de converter a energia solar diretamente a hidrogênio a partir de substratos orgânicos. Esta reação foi observada pela primeira vez por Gest e Kamen (1949) em culturas de *Rhodospirillum rubrum*. As bactérias fotoheterotróficas anoxigênicas correspondem a um grupo de microrganismos diverso metabolicamente e com ampla distribuição em ambientes anaeróbios expostos à luz. Apesar de sua ampla versatilidade metabólica toda a produção de hidrogênio ocorre devido ao metabolismo fotoheterotrófico, que acontece em condições anaeróbias e sob iluminação (KOKU et al., 2002; MADIGAN et al., 2004). De acordo com Basak, N. e Das, D. (2007), quantidades de carbono e nitrogênio, intensidade de iluminação, configuração do biorreator e idade do inóculo são parâmetros operacionais que podem conduzir a rendimentos mais elevados de produção de hidrogênio. Assim, a produção biológica de  $H_2$  por bactérias fotoheterotróficas anoxigênicas é vasta área de pesquisa através do qual o rendimento global de sua produção pode ser significativamente melhorado. A fotofermentação pode ser realizada sob três configurações diferentes de reator: batelada, batelada alimentada e fluxo-contínuo

(DASGUPTA, 2010). O hidrogênio pode ser gerado em duas fases durante os processos anaeróbios (Figura 1). Numa primeira fase, hidrogênio, ácidos orgânicos e álcoois podem ser produzidos por processos fermentativos na ausência de luz. Tais metabólitos gerados no processo de fermentação podem ser consumidos por bactérias fotoheterotróficas numa segunda fase durante a operação dos reatores anaeróbios na presença de luz gerando assim, mais hidrogênio. Nesse sentido, este projeto de pesquisa teve como objetivo principal a obtenção de consórcios de bactérias fotoheterotróficas geradoras de gás hidrogênio capazes de degradar ácidos orgânicos. Além disso, foram testados reatores anaeróbios sob incidência luminosa alimentados com ácidos orgânicos como acético e butírico, adições de efluentes provenientes de reatores fermentativos geradores de  $H_2$  alimentados separadamente com glicerol bruto e águas residuárias citrícolas. Assim, foi estudada a capacidade das bactérias fotoheterotróficas em metabolizar compostos orgânicos de cadeia curta como ácidos acético e butírico, que poderiam ser descartados numa primeira fase de produção de biohidrogênio por processos fermentativos. Finalmente, essa pesquisa visou aumentar a eficiência energética global de ambos os processos, fechando assim de maneira biológica o ciclo do hidrogênio via bactérias fermentativas e fotoheterotróficas; aliando a remoção da matéria orgânica gerada por processos fermentativos e a elevação na geração desse gás combustível.

Figura 1- Esquema do modelo de duas fases usado na pesquisa.



Fonte: Autor

## 1.1 Revisão bibliográfica

Nas próximas secções analisamos a bioquímica das bactérias PNS, fazendo ênfase especial em seu metabolismo fototrófico e como o fluxo eletrônico pode derivar na bioprodução de hidrogênio. Nos apartados finais será comentada a potencialidade destas bactérias para remover a biomassa de diversas águas residuárias procedentes de processos fermentativos prévios.

### 1.1.1 Filogenia das Bactérias púrpuras não sulfurosas

As bactérias púrpuras não sulfurosas estão amplamente distribuídas na natureza, principalmente em lagos, lagoas e águas estáticas, onde existe uma rápida produção e decomposição da matéria. Essas bactérias são únicas pela alta versatilidade metabólica apresentada, já que podem crescer em condições anaeróbicas na luz, tanto fotoautotróficamente quanto fotoheterotróficamente, reduzindo compostos inorgânicos ou orgânicos. A grande versatilidade metabólica das bactérias, combinado com outras características como a facilidade de cultura, a obtenção de membranas e a disponibilidade de obtenção de mutantes, têm permitido que estas bactérias tenham sido usadas como um excelente modelo para estudos em bioenergética. Filogeneticamente pertencem ao grupo das proteobactérias, as quais são bactérias Gram negativas organizadas em seis grandes subgrupos (CLAYTON; SISTROM, 1978). As bactérias purpuras não sulfurosas se organizam em dois ordenes principais dentro dos subgrupos  $\alpha$  e  $\beta$  das proteobactérias: Rhodospirillales e Rhizobiales. Entre os gêneros mais comuns nas publicações da área, destacam *Rhodobacter*, *Rhodopseudomonas* e *Rhodospirillum*. São um grupo bacteriano taxonomicamente caracterizado pela presença de um único fotossistema, contendo como par especial de pigmento foto-conversor à bacterioclorofila *a* ou *b*; junto com a habilidade de metabolizar ácidos e álcoois como doadores de elétrons em condições fototróficas anaeróbias (HOLT, J. G et al, 1984).

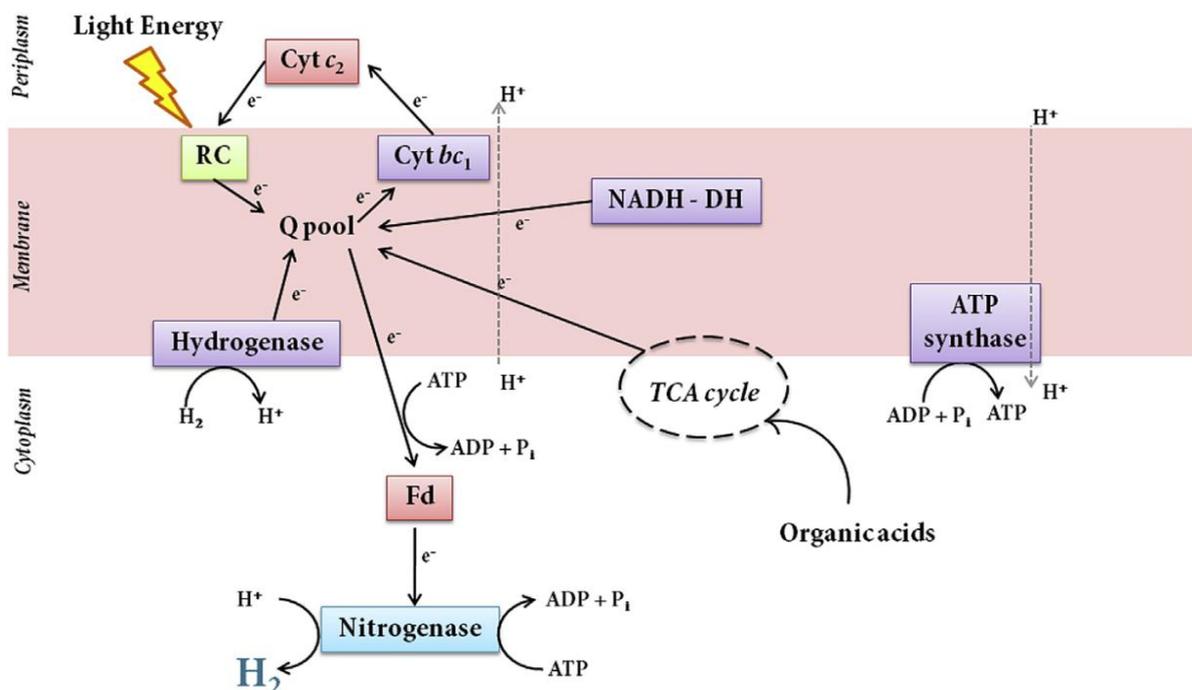
### 1.1.2 Conversão de energia em bactérias fotossintéticas anoxigênicas.

A fotossíntese é um dos processos biológicos mais importantes de nosso planeta. Ela fornece aos seres vivos do oxigênio que respiram, os alimentos que consomem e até os combustíveis fósseis usados pelo homem tem sua origem nesta reação. Embora o processo de fotossíntese seja mais comumente associado com plantas e algas, muita da nossa compreensão das bases moleculares para a captura de energia de luz e conversão de energia fotoquímica foi originado em estudos com bactérias fotossintéticas (DEISENHOFER et al., 1985; McDERMOTT et al., 1995). Esses estudos provaram como as bactérias fotossintéticas são excelentes organismos modelo para o estudo das reações que ocorrem na fotossíntese, já que apresentam um dos sistemas mais simples de conversão da energia luminosa em energia química. Apenas um conjunto de proteínas, juntamente com alguns cofatores são necessários para transformar luz em energia química (SCHULTEN, 1999). O valor deste sistema modelo foi ilustrado por dois estudos de referência. Em 1985 Deisenhofer et al. determinaram a estrutura cristalina do centro de reação da bactéria *Blastochloris viridis* mediante raios-X; esta foi a primeira vez que se determinou a estrutura cristalina de uma proteína de membrana, e levou à atribuição do Prêmio Nobel de Química em 1988. O segundo estudo definiu a estrutura cristalina do complexo coletor de luz (LH2) da bactéria *Rhodospseudomonas acidophila* (McDERMOTT et al., 1995). Essas duas estruturas revelaram os princípios fundamentais nos quais estão baseados a atual compreensão dos processos de transferência de energia da fotossíntese.

As bactérias fotoheterotróficas anoxigênicas são semelhantes às plantas verdes, já que usam a luz como fonte de energia, mas em diferença destas, não produzem oxigênio. Esse fato resulta numa dupla vantagem para a eficiência final do processo de produção de hidrogênio porque a nitrogenase, enzima responsável em bactérias fotofermentativas, é inibida pela ação do oxigênio e sob intensidades luminosas reduzidas (MASEPOHL et al., 2002). Seu sistema fotossintético é relativamente simples em comparação com as algas verdes. Trata-se de apenas um fotossistema que é fixo na membrana intracelular. No entanto, o fotossistema não é suficientemente poderoso para separar a água e gerar hidrogênio (biofotólise direta). Sob circunstâncias anaeróbicas, essas bactérias são capazes de usar ácidos

orgânicos simples e álcoois como doadores de elétrons (AKKERMAN I. et al., 2003). Os elétrons liberados dos substratos orgânicos são conduzidos através de transportadores moleculares permitindo a criação de um potencial eletroquímico de membrana para a formação de energia disponível para a célula na forma de ATP (Figura 1). No entanto, o fluxo de elétrons, junto com energia química extra, pode ser desviado para a formação de hidrogênio. A enzima nitrogenase normalmente reduz nitrogênio molecular ( $N_2$ ) a amônia ( $NH_3$ ), mas também pode catalisar a produção de hidrogênio gasoso na ausência de  $N_2$ . Assim, em condições de anaerobiose, na ausência de nitrogênio e na presença de luz, a enzima nitrogenase pode com a energia adicional de ATP, reduzir prótons em gás hidrogênio com os elétrons derivados da fermentação de diversos substratos orgânicos (OHASHI, 2010). Desta forma, vários ácidos orgânicos e álcoois podem ser transformados em hidrogênio e dióxido de carbono.

Figura 2- Esquema da fotofermentação anaeróbia em bactérias PNS.

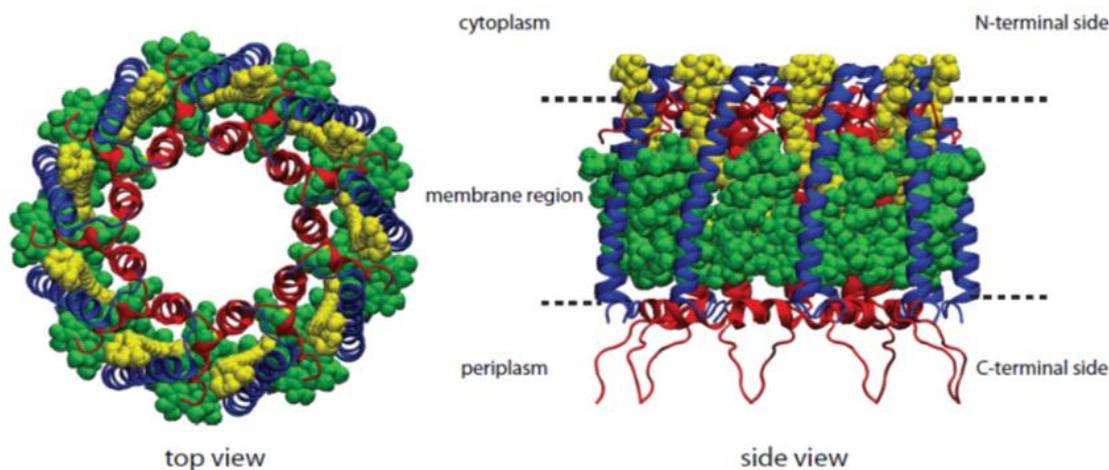


Fonte: McKinlay (2014)

### 1.1.3 Componentes estruturais da unidade fotossintética

Dentro do Filo *Proteobacteria*, no grupo das bactérias fotossintéticas, as bactérias PNS representam uma subclasse caracterizada pela presença de um único fotossistema, contendo como par especial de pigmento foto-conversor à bacterioclorofila *a*. A unidade fotossintética mínima nestas bactérias está composta de um centro de reação (RC) cercado por um complexo de coleta de luz chamado LHC1. Os dois são considerados habitualmente na literatura científica como uma unidade, que em conjunto formam o chamado complexo RC-LH1 (em proporção 1:1). Este é capaz de converter a energia da luz em parceria com uma segunda proteína de transferência de elétrons incorporada na membrana, o chamado complexo citocromo *bc1* (COGDELL et al, 2004). Na maioria das espécies de bactérias púrpuras, existem dois tipos de proteínas coletoras; LHC1 (complexo coletor I), e o complexo coletor II (LHC2), as vezes chamado de "complexo coletor periférico", cujo objetivo fundamental é expandir a capacidade de colheita, tanto em termos de área disponível como no espectro de comprimentos de onda que pode ser usado. Em todas as espécies de bactérias púrpuras, LHC2 forma um anel composto por várias subunidades idênticas. O número de subunidades (tipicamente entre 8 e 10) varia tanto entre as espécies e, em alguns casos, até mesmo dentro da mesma espécie (COGDELL, R. J.; GALL, A.; KÖHLER, J., 2006). Cada subunidade LHC2 consiste em duas apo-proteínas transmembrana, chamadas de  $\alpha$ - (interior) e  $\beta$ -proteínas (exteriores), ligadas a várias moléculas de carotenoides (Cars) e bacterioclorofilas (Bchls) (Figura 2). Esses complexos coletores de luz das bactérias fotossintéticas apresentam uma elevada simetria, a diferença da organização observada nos pigmentos de organismos superiores como plantas, algas ou cianobactérias onde a simetria não é tão aparente.

Figura 3 - Esquema do complexo coletor de luz II (LH 2).



Fonte: *Papiz et al.* (2003).

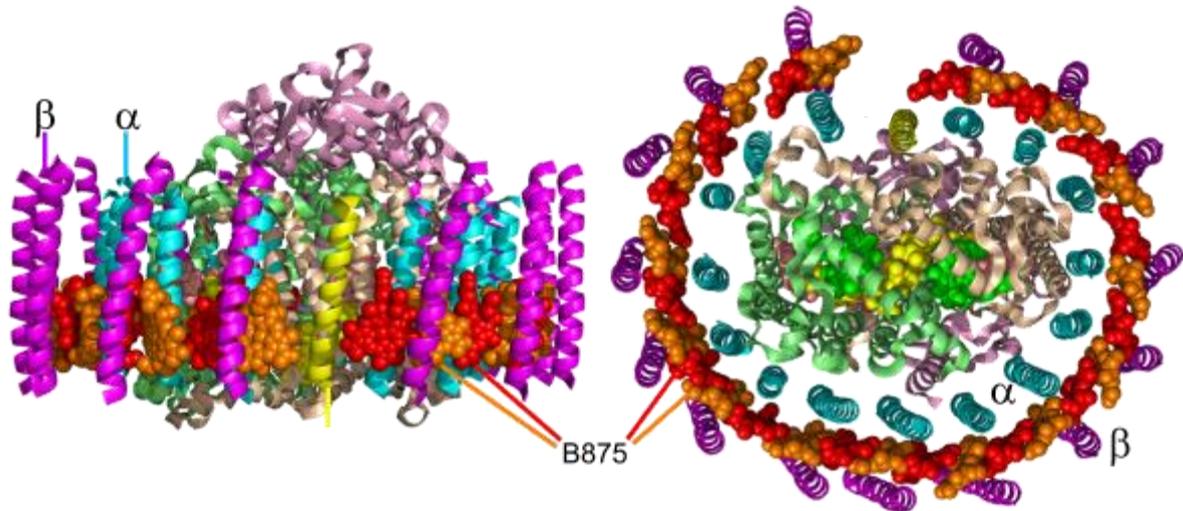
As  $\alpha$ - (vermelho) e  $\beta$ - (azul) apo-proteínas apresentam uma estrutura secundária alfa-helicoidal. BChls (verde) y Cars (amarelo) intercalam-se entre as apo-proteínas. Linhas pontilhadas marcam o encaixe com a membrana lipídica.

As reações de fotossíntese são catalisadas pelos complexos proteína-pigmento localizados dentro das membranas intracitoplasmáticas (invaginações da membrana celular). Os pigmentos de absorção de luz em bactérias púrpuras são as bacterioclorofilas e os carotenoides (os quais apresentam cores intensas na gama do laranja, vermelho e a conhecida púrpura das bactérias). A BChl mais comumente encontrada em bactérias púrpuras é chamada de bacterioclorofila *a*. Constituída por uma estrutura plana de cinco anéis tetrapirrólicos com um átomo de magnésio no seu centro e uma longa cauda hidrofóbica de fitol. Isto faz com que a BChl absorva em comprimentos de onda significativamente maiores do que a clorofila, especialmente no infravermelho próximo entre 800 - 900 (bandas Qy) (BLANKENSHIP, 2010). Nos complexos LHC2 existem comumente dois tipos de anéis de Bchl; os anéis orientados em vertical, em relação com os pilares proteicos no plano da membrana, que absorvem a luz em torno de 850 nm (B850), e os anéis orientados em horizontal, que absorvem cerca de 800 nm (B800). Estes anéis são tipicamente chamados como "complexo B800-B850". Para completar o set, no complexo LH1 as Bchls absorvem luz em torno de 875 nm. Essas diferenças na absorção da luz são devidas as diferentes interligações no núcleo do cromóforo,

especificamente nas ligações do átomo magnésio (que faz parte do centro ativo) com os resíduos adjacentes das apo-proteínas (PAPIZ, 2003). Por sua vez, os carotenoides são moléculas hidrofóbicas com uma longa cadeia de carbonos e uma região de cabeça grandemente variável em função da espécie. São pigmentos que absorvem luz entre 450 - 550 nm. Ambos os pigmentos, Bchls e cars, são entrelaçados em matrizes circulares em LHC2 agindo em conjunto como um filtro solar que permite maximizar a captação de luz nos diferentes ambientes aos que estão expostas as bactérias, além de evitar danos foto-oxidantes. Os carotenoides são necessários tanto para a colheita de luz quanto para a foto-proteção da célula. Na sua ausência, a radiação solar promove a formação de espécies tóxicas do oxigênio que acabam destruindo os complexos coletores e produzindo danos oxidantes letais para o organismo fotossintético. Ambos os pigmentos não são unidos covalentemente às estruturas da membrana sino mediante forças de Van de Waals e ligações de hidrogênio às proteínas dos complexos (complexos coletores e centros de reação) (SCHEURING, S.; STURGIS, J. N., 2005).

O núcleo de cada antena fotossintética (complexo RC-LHC1) é constituído por duas estruturas proteicas concêntricas de polímeros em alfa-helice, distinguindo-se, como no complexo LHC2, dois polipeptídios  $\alpha$  e  $\beta$ , formando um círculo interior e exterior, respectivamente. As BChls (B870) formam um anel entre os dois cilindros protéicos num círculo perpendicular à membrana. O tamanho de LHC1 (8-10 subunidades) acostuma ser menor que LHC2 (entre 10 - 15 subunidades), para acomodar RC no espaço central. Nesse núcleo podemos encontrar um acúmulo de diferentes cofatores, proteínas, carotenoides, bacterioclorofilas, bacteriofeofitinas (BPhe - as quais carecem do Mg central das BChls) e quinonas (ROSZAK et al., 2003) (Figura 3). A excitação direta sobre B870 ou bem através das antenas periféricas dispara um mecanismo de transferência eletrônica no RC. O núcleo age como um motor luminoso para o Cyt bc1; proteína dimérica sulfo-férrica (Cyt b e Cyt c1) que atravessa a membrana no lado periplásmico para interagir com Cyt c2, o qual apresenta uma grande similaridade com os citocromos presentes nas mitocôndrias (bc1) e o complexo b6f de organismos fotôtrofos oxigênicos (Jones, 2009).

Figura 4 - Esquema do complexo LH1 - RC.



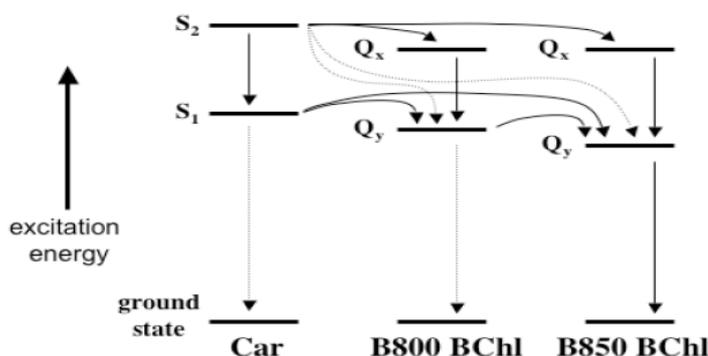
Fonte: Roszak *et al.* (2003).

Vista frontal e lateral do complexo, onde podem se apreciar as colunas proteicas formando círculos concêntricos, com os polímeros  $\alpha$  (azul) e  $\beta$  (púrpura) delimitando ao RC no centro. A estrutura apresenta certa porosidade para permitir o fluxo de ubiquinonas do processo de transferência eletrônica. O par de BChl 870 (laranja-vermelho) ficam a modo de sanduíche entre as pilastras proteicas.

#### 1.1.4 Mecanismo fotossintético

O fotossistema das bactérias púrpuras é capaz de coletar energia da luz num amplo intervalo de comprimentos de onda. Os Cars têm dois estados de excitação conhecidos que estão envolvidos no processo de transferência de elétrons (S1 e S2 entorno de 500 nm) e as Bchls, por sua vez, têm três bandas de absorvância principais, a chamada banda Soret na região do azul / UV-próximo (entre 300 e 400 nm), a banda Qx na região do vermelho (em torno de 600 nm), e a banda Qy no infravermelho próximo (entre 800 e 900 nm) (SUNDSTRÖM, V.; PULLERITS, T., 1999; SUNDSTRÖM, V. 2008). A absorção de fótons produz um estado eletrônico excitado nos pigmentos, a qual é coletada pelos carotenoides do complexo antena e transferida para as BChls adjacentes (Figura 4).

Figura 5 - Níveis de excitação eletrônica de Bchls e Cars e seus possíveis caminhos de transferência de excitação.

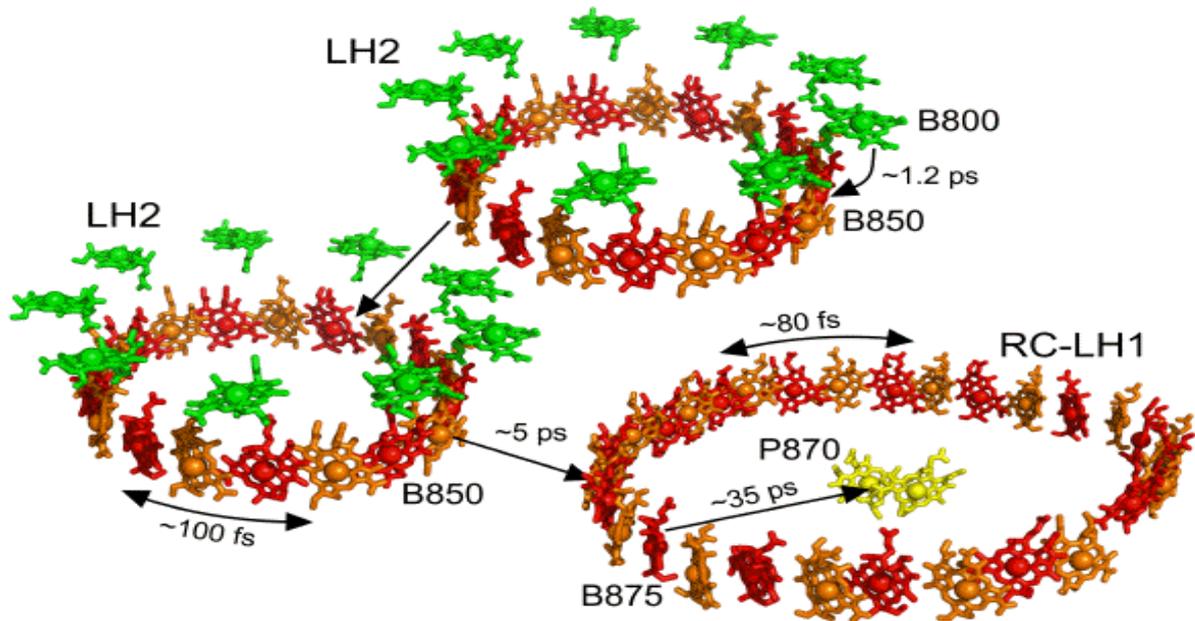


Fonte: *Schulten*, 1999.

As setas sólidas representam os principais caminhos de transferência de excitação entre os diferentes pigmentos, e as setas pontilhadas que representam caminhos de transferência menores ou hipotéticos.

Dentro de cada proteína individual LHC2, a energia absorvida pelas Bchls B800 é transferida para o anel de Bchls B850 e por sua vez, transferida para um LHC2 vizinho ou para um anel LHC1 formado por Bchls B875 (mais baixa energia) que rodeiam a RC (SUNDSTRÖM, V.; PULLERITS, T., 1999). A etapa final envolve a transferência de energia do estado excitado desde um dímero P870 até o RC (Figura 5), onde se desencadeia uma separação de cargas fotoquímicas. Os complexos de colheita de luz precisam ser bem empacados dentro da membrana para garantir que a energia do estado excitado seja transferida de forma eficiente para o RC com perdas mínimas de emissão. O tempo de vida do estado excitado das BChl é da ordem de alguns nanossegundos, o que significa que a energia absorvida pelos pigmentos da antena tem que ser canalizada para o RC numa escala de tempo de algumas dezenas a centenas de picossegundos (considerando que são processos muito dependentes da temperatura) (SUNDSTRÖM, V.; PULLERITS, T., 1999). Produz-se assim uma canalização da energia desde estados excitados de maior energia até estados de menor energia, o qual pode ser inferido pelo deslocamento ao vermelho (baixa energia) das Bchls mais próximas do RC e pode ser descrito pelo mecanismo de Förster (transferência de energia de ressonância não radiativa por meio de acoplamento entre dois dipolos de transição) (BLANKENSHIP, 2010).

Figura 6 - Transferência energética entre Bacterioclorofilas.



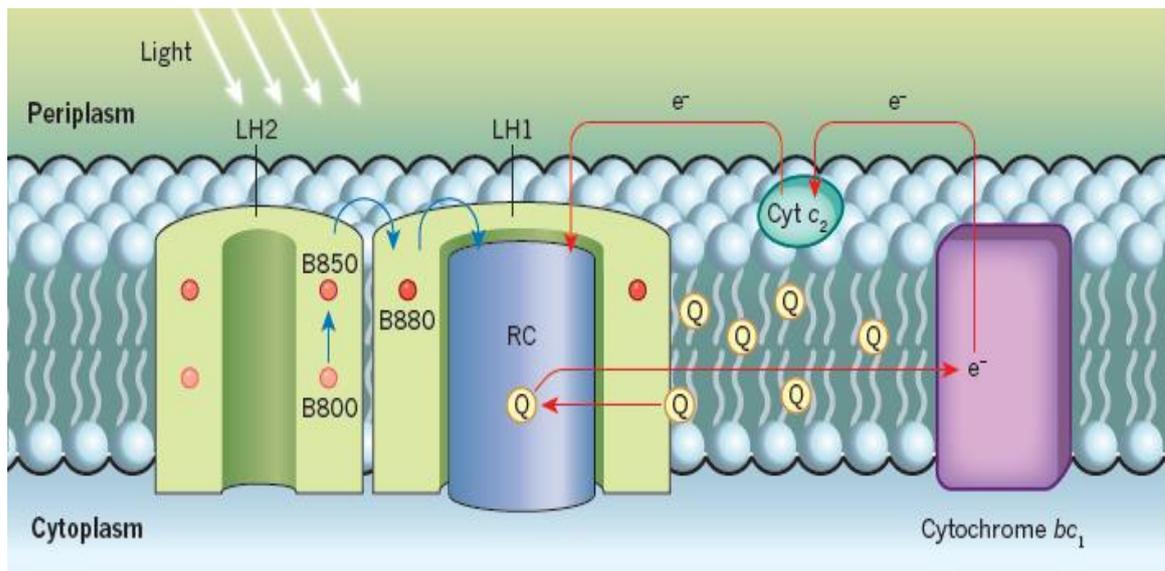
Fonte: Sundström, V.; Pullerits, T., 1999.

BChls B800 de LH1 são mostradas em verde, BChls B850 de LH2 e BChls B875 de LH1 são mostradas como pares alternando laranja e vermelho e BChls P870 do RC em amarelo. Os eventos de transferência de energia indicadas pelas setas acontecem em tempos de vida de picossegundos (ps) entre os complexos LH1 e LH2-RC.

Na maioria das espécies de bactérias púrpuras, a energia da luz é inicialmente absorvida pelo LHC2 e em seguida transferida por LHC1 para o centro de reação, iniciando assim a sequência de reações primárias redox da fotossíntese. Essas reações envolvem a conversão de moléculas de bacteriofeofitina e ubiquinona a sua forma completamente reduzida, os quais são aceptores intermediários, que levam os elétrons para o complexo citocromo *bc1-c2*. As ubiquinonas apresentam uma dinâmica fluida entre o RC e os citocromos, transferindo elétrons ao Cyt *bc1* e liberando no processo prótons ao espaço periplásmico. O citocromo *c2* (Cyt *c2*) encontra-se unido à membrana comoceptor externo, deslizando-se pela matriz lipídica para acabar cedendo os elétrons ao complexo LHC1 fechando assim a via cíclica de transporte eletrônico (BLANKENSHIP, 2010). Mediante a translocação de prótons acoplada ao fluxo de elétrons se estabelece um gradiente eletroquímico ou força proton motriz (pmf) necessária para gerar energia metabólica (ATP) através da fotofosforilação (Figura 6). Parte desta energia é preservada na forma de pmf

formada; a qual será usada para ligar uma variedade de reações que requer energia, como o transporte ativo, o movimento do flagelo bacteriano, e assim por diante. Por sua vez, em determinadas condições bioquímicas, cria-se um fluxo reverso de elétrons que permite liberar os equivalentes de redução acumulados no sistema, gerando biogás hidrogênio. Nessa rota metabólica participam as ubiquinonas e o citocromo *bc1* (Cyt *bc1*) que age como doador imediato de elétrons, através dos quais os mesmos são cedidos à nitrogenase gerando hidrogênio (OHASHI, 2010).

Figura 7 - Sequência da transferência eletrônica impulsada por luz numa típica unidade fotossintética de bactérias PNS.



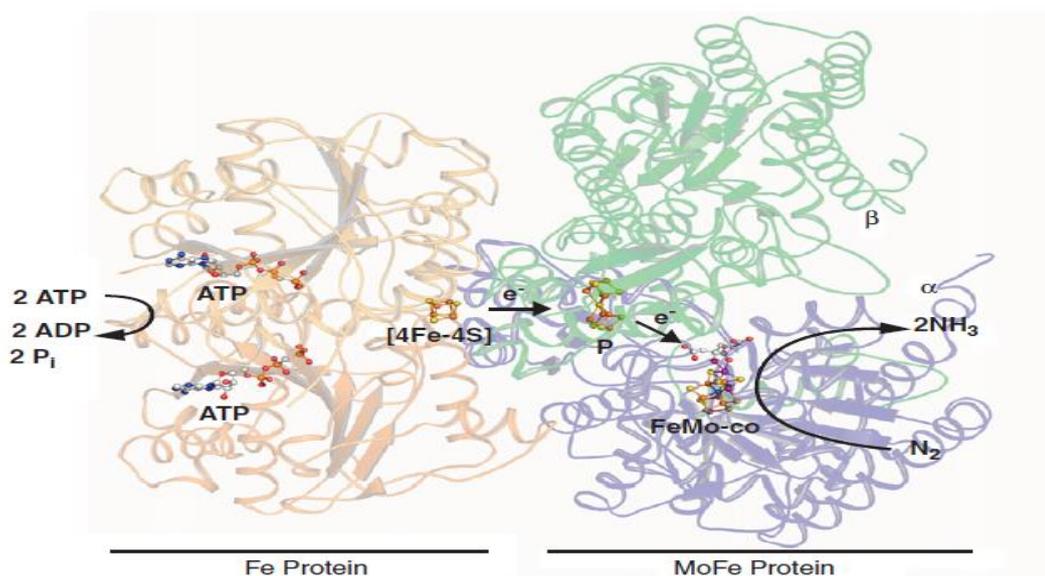
Fonte: Cogdell, R. J.; Gall, A.; Köhler, J. (2006).

Representação do processo de transporte eletrônico cíclico na membrana intracitoplasmática das bactérias púrpuras. A luz é absorvida pelos complexos LHC1 e LHC2 (verde), os quais transferem sua energia de excitação ao centro de reação (azul), onde é iniciada uma separação de cargas. A energia luminosa absorvida pelos carotenoides e bacterioclorofilas (B800, B850 e B880), gera uma alteração no estado energético das moléculas que pode ser transferido seguindo varias rotas de excitação entre os pigmentos do fotosistema (linhas azuis) ate acabar reduzindo as ubiquinonas localizadas no RC (convertendo assim a energia luminosa em energia química). As mesmas fogem através de poros interproteicos do RC para transferir elétrons ao Cyt b1. A rota é completada por uma proteína solúvel (Cyt c2) que acaba doando os elétrons para LH1 (linhas vermelhas).

### 1.1.5 Nitrogenase

As Nitrogenases são metaloenzimas caracterizadas pela habilidade de catalisar a fixação de  $N_2$  (reduzindo o di-nitrogênio a amônia) a qual resulta num fato essencial para a manutenção do ciclo do nitrogênio na Terra. Tais enzimas estão presentes numa ampla gama de microrganismos, incluindo tanto arqueias quanto cianobactérias (GALLON, 1992). São responsáveis, pela produção biológica de hidrogênio nas bactérias PNS (HALLENBECK, 2015). São enzimas que contêm grupos protéicos baseados em ferro e sulfeto, e dependendo da forma enzimática podem estar também em combinação com molibdênio e vanádio. A Nitrogenase é um sistema de dois componentes proteicos que usam o cofator Mg-ATP e um potencial de elétrons derivados da Ferredoxina ou Flavodoxina para reduzir vários substratos. A redução de nitrogênio a amônio é uma reação fortemente endergônica que requer dois ATPs para cada transferência de elétrons ( $2 \text{ ATP/e}$ ) (BURGESS B. K.; LOWE, D. J., 1996). A Molibdênio nitrogenase (Mo-nitrogenase) é a forma mais amplamente caracterizada, a qual apresenta dois componentes proteicos, o menor, uma ferro-proteína homodimérica ( $c_2$ ) que contém um cluster  $4\text{Fe-4S}$  de união entre as duas subunidades; e que age como uma redutase específica da proteína maior, a proteína Mo-Fe. Esta última é uma dinitrogenase heterotetramérica ( $\alpha_2\beta_2$ ), que liga quatro clusters, organizados em dois clusters P e dois clusters Fe-Mo (SEEFELDT; HOFFMAN; DEAN, 2012) (Figura 7).

Figura 8 – Estrutura tridimensional do complexo Mo-Nitrogenase

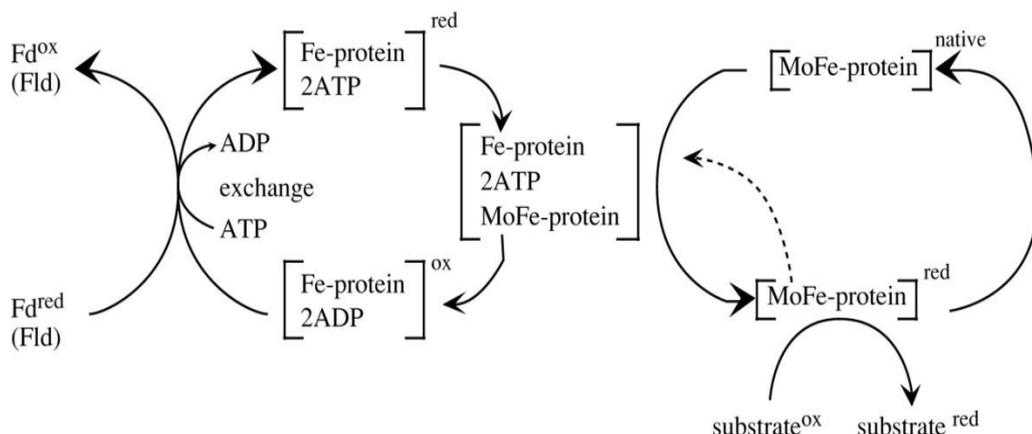


Fonte: Seefeldt, L. C.; Hoffman, B. M.; Dean, D. R. (2012).

Complexo nitrogenase e cofatores. Mostram-se a ferro-proteína (esquerda), juntamente com duas moléculas de ATP e o cluster [4Fe-4S] de união. A direita aparece as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  do heterotetramero MoFe, onde se observam o cluster P e cluster MoFe de cada subunidade, respectivamente. Os elétrons fluem desde a reductase até a dinitrogenase (proteína de união a  $N_2$ ) para formar sais de nitrogênio.

A redutase (subunidade menor) é responsável pela transferência de elétrons (processo dependente de ATP) à dinitrogenase correspondente (subunidade maior) (Figura 7). Na ausência de  $N_2$  e com a participação de equivalentes de redução e energia metabólica (condições sob iluminação) a nitrogenase age como uma hidrogenase alimentada por ATP produzindo exclusivamente  $H_2$ , na mesma proporção que produz  $N_2$  (McKINLEY, J. B.; HARWOOD, C. S., 2010). No processo, se produz uma transferência inter- e intra-molecular entre os distintos clusters; onde oito moléculas de NAD(P)H doam 8 elétrons á ferredoxina, a qual transporta os 8 elétrons para a reductase e esta a sua vez para a dinitrogenase. Na ausência de nitrogênio da equação geral ( $8H^+ + 8e^- + N_2 + 16 ATP \rightarrow H_2 + 2NH_3 + 16 ADP$ ), a dinitrogenase doa os 8 elétrons a 8 prótons do meio, gerando quatro moléculas de  $H_2$  (PETERS; SZILAGYI, 2006). Durante a catálise, as subunidades do complexo passam por vários estados redox participando num processo dinâmico que envolve a associação e dissociação da proteína Fe e a proteína Mo-Fe junto com a hidrólise obrigatória de dois Mg-ATP para cada transferência eletrônica neta (BURGESS; LOWE, 1996).

Figura 9 – Esquema da transferência eletrônica no complexo Nitrogenase



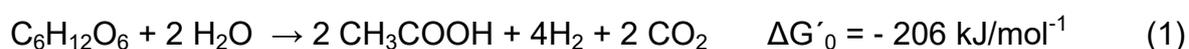
Fonte: Thorneley et al. (1985); Burgess B. K.; Lowe, D. J.. (1996).

Fluxo de elétrons a partir de transportadores, tais como ferredoxina ou Flavodoxina para a MoFe-proteína através da Fe-proteína (esquerda) acoplado a hidrólise de ATP (centro) e a redução subsequente de substratos juntamente com o retorno do MoFe-proteína para um estado de repouso redox (à direita).

Existem outras formas enzimáticas da nitrogenase chamadas "alternativas", as quais são estruturalmente semelhantes às Mo-nitrogenases, mas contêm vanádio ou ferro em vez de molibdênio (grupos catalíticos contendo Fe-Va ou Fe-Fe em vez de Fe-Mo). Estas nitrogenases alternativas favorecem a produção de H<sub>2</sub> e sua expressão está correlacionada com condições severas de carência de nitrogênio (ODA et al., 2005). As mesmas são capazes de distribuir uma proporção mais elevada de elétrons para reduzir H<sub>2</sub> em comparação com a Mo-nitrogenase convencional (SCHNEIDER et al., 1997). Em presença de molibdênio solúvel, reguladores transcricionais (genes Moab) silenciam a expressão destas Nitrogenases alternativas. Neste caso, o mutante com genes Moab interrompidos poderia expressar nitrogenases alternativas e Mo-nitrogenase simultaneamente aumentando a bioprodução de hidrogênio (MÜLLER et al., 2010). É conhecido também a existência de rotas metabólicas que entram em concorrência com a produção de H<sub>2</sub>, dirigindo o fluxo de elétrons para fixação de CO<sub>2</sub> (através da enzima Rubisco) e a produção de reservas energéticas (Polihidroxitiratos - PHBs) (DEBABRATA et al., 2008). Vários estudos revelaram como a alteração de certas enzimas dessas rotas repercutem positivamente no rendimento do H<sub>2</sub> (KIM et al., 2012; WANGA et al., 2010). Por sua vez, a síntese e atividade da nitrogenase são reguladas a nível transcricional e pós-transcricional em resposta a estímulos ambientais; sendo assim que a presença de oxigênio e de nitrogênio fixado em forma de amônio são dois dos principais fatores envolvidos na regulação da expressão de genes *Nif*. Segundo Zhang, Y. et al. (2003), a modificação dos genes que codificam a enzima Nitrogenase (genes *Nif*) e seus reguladores junto com alteração metabólica de rotas em concorrência, permitiram otimizar o fluxo de equivalentes redutores às enzimas, redirecionando os caminhos de elétrons, o qual pode ser uma estratégia muito promissora para alcançar uma quantidade satisfatória de H<sub>2</sub> a partir de águas residuárias ou substâncias orgânicas.

### 1.1.6 Potencialidade do uso de águas residuárias para geração de H<sub>2</sub> por bactérias PNS

As bactérias PNS, uma subclasse dentro do grupo das bactérias fotossintéticas, podem apresentar um metabolismo fotoheterotrófico caracterizado pelo uso de ácidos orgânicos como doadores de elétrons aos intermediários do metabolismo fotossintético. Nessa situação acontece um processo fermentativo dos ácidos que pode ser aplicado na geração de H<sub>2</sub>. Os ácidos transferem seus elétrons em ausência de oxigênio à cadeia de transporte cíclico liberando poder redutor e promovendo a formação de ATP através da fotofosforilação (MIYAKE, J.; MIYAKE, M.; ASADA, Y., 1999). A fermentação pode acontecer mediante o consumo de açúcares ou resíduos por bactérias anaeróbias com geração dos produtos principais os ácidos acético e butírico (MAINTINGUER et al., 2008). Após a fase de fermentação em ausência de luz nos processos de produção de hidrogênio, são gerados ácidos orgânicos voláteis (MAINTINGUER et al., 2015); os quais, podem ser consumidos por bactérias PNS, proporcionando uma maior viabilidade e eficiência na geração de mais H<sub>2</sub> e no tratamento da matéria orgânica. Em teoria, a combinação da fermentação anaeróbia escura com a fotofermentação (usando bactérias PNS) pode oferecer um rendimento estequiométrico de 12 mol de H<sub>2</sub> por mol de glicose, como demonstrado nas equações 1 e 2: A equação (1) exemplifica a estequiometria da geração de H<sub>2</sub> a partir de glicose, por processos fermentativos, gerando assim 4 mols de H<sub>2</sub> e dois mols de ácido acético.



Algumas bactérias fotoheterotróficas utilizam a luz como fonte de energia, mas a fonte de carbono são substratos orgânicos, como o ácido acético, por exemplo, gerando assim mais 8 mols de H<sub>2</sub>, conforme equação (2).



Dessa forma, a reação global seria mais vantajosa, com a geração de 4 mols de H<sub>2</sub> por processos fermentativos (1) e mais 8 mols de H<sub>2</sub> por processos fototróficos (2).

Vários estudos de escalonamento em processos de produção fermentativa de H<sub>2</sub> têm sido feitos com sucesso. O uso de matérias-primas mais baratas e processos biológicos de produção de hidrogênio mais eficientes certamente irão torná-los mais competitivos com os processos convencionais de geração de H<sub>2</sub> num futuro próximo (DEBABRATA, 2008). A vantagem da utilização desses microrganismos reside sua versatilidade em metabolizar diversos substratos e na ausência do fotosistema II (PSII) em seu aparato fotossintético. Bactérias PNS ao não estar equipadas com PSII, não podem dividir água em oxigênio e hidrogênio (biofotólise direta), desenvolvendo um metabolismo fermentativo anaeróbio, o qual permite eliminar as dificuldades associadas com a inibição de O<sub>2</sub> (BOLTON, 1996).

A fotofermentação pode ser aplicada a vários tipos de substratos orgânicos, e pode ser combinada com processos de tratamento de águas residuárias. No entanto, esses processos consomem uma quantidade considerável de energia, mais de 30% dos elétrons são atribuídos para o crescimento da biomassa (HONDA; FUKUSHI; YAMAMOTO, 2006). Além disso, o rendimento final H<sub>2</sub> pode ser reduzido pela atividade de captação da hidrogenase (KARS; GUNDUZ, 2010). Esta enzima catalisa a conversão de H<sub>2</sub> molecular para prótons e elétrons para reduzir elevados potenciais dos aceptores de elétrons no interior da célula, o que em consequência, faz diminuir a eficiência da produção de H<sub>2</sub>. Portanto, o valor total da produção de H<sub>2</sub> é igual à quantidade de H<sub>2</sub> produzido pela nitrogenase menos o consumido no processo de captação da hidrogenase e no crescimento celular bacteriano (KARS, 2008).

A via fotoheterotrófica pode permitir a remoção completa da matéria orgânica, utilizando, por exemplo, efluentes de processos fermentativos de geração de H<sub>2</sub> como ácidos orgânicos e álcoois, ou com determinados excedentes industriais como o caso de águas residuárias de indústrias citrícolas ou de reatores anaeróbios geradores de H<sub>2</sub> e alimentados com glicerol bruto procedente das indústrias de produção de biodiesel.

#### 1.1.7 Glicerol

Glicerol, conhecido também como glicerina, é o nome comum do composto orgânico 1,2,3-propanotriol, descoberto por Carl W. Scheele em 1779. É um

composto alcoólico com três grupos hidroxila que formam a base da composição dos lipídeos; e em sua forma pura, apresentam-se como líquido incolor, inodoro, higroscópico e com densidade superior à água. O glicerol apresenta diversas aplicações na indústria de cosméticos, farmacêutica, detergentes, na fabricação de resinas e aditivos e na indústria alimentar (BOHNET, M. et al, 2003). No entanto, apesar de possuir ampla aplicação industrial, o glicerol residual só pode ser utilizado quando possui alto grau de pureza, o que exige etapas de purificação que encarecem o produto (KOCSSISOVA; CEVENGROS, 2006).

Nos últimos anos, diversos estudos estão sendo direcionados para a reutilização de glicerol bruto na forma direta, devido ao aumento da produção de biodiesel em países como Brasil e Estados Unidos. Estimativas do Governo Brasileiro para o ano 2020 projetam alcançar a cifra de 1,4 bilhões de litros de glicerol derivados desta indústria (ALBARELLI; SANTOS; HOLANDA, 2011). O glicerol bruto, como coproduto gerado durante a produção industrial do biodiesel, é gerado fabricado numa proporção aproximada de 100 kg por cada tonelada de biodiesel obtida (FOUNTOULAKIS; TODINI, 2009). O biodiesel é um éster de ácidos graxos derivado de óleos de diversa origem, obtido principalmente de sementes de girassol, soja, dentre outros vegetais, assim como da gordura animal e óleo vegetal (MOTA; DA SILVA; GONÇALVES, 2009). Existem varias pesquisas sobre a utilização deste resíduo para a produção de biogás hidrogênio em processos de fermentação na ausência de luz (SELEMBO et al., 2009; WU et al., 2011; SABOURIN-PROVOST; HALLENBECK, 2009). Entretanto, pesquisas com processos que combinam bactérias fotoheterotróficas para a produção de hidrogênio a partir do efluente da fase fermentativa, são escassas (CHOOKAEW; O-THONGC; PRASERTSAN, 2015).

Inicialmente o efluente dos processos fermentativos da metabolização do glicerol bruto teria que apresentar baixas concentrações de sais de nitrogênio reduzidas para poder serem usados por bactérias PNS na produção do biogás. Chookaew, T.; O-Thongc, S.; Prasertsan, P. (2015) analisaram diferentes efluentes procedentes de processos fermentativos de glicerol bruto e determinaram baixas concentrações de amônio (0,02 mg/L); o que sob ponto de vista teórico, favorece sua possível utilização numa segunda etapa fotoheterotrófica, já que evita o bloqueio da enzima nitrogenase. Os autores realizaram testes com várias fontes de nitrogênio em distintas concentrações e diluídos em efluentes com o objetivo de

otimizar o processo de produção, obtendo resultados na mesma linha dos aqui apresentados.

#### 1.1.8 Resíduos citrícolas

Resíduos citrícolas são os que comumente são gerados em indústrias de beneficiamento de frutas cítricas. O Brasil é o país que detém 53% da produção mundial de suco de laranja (REZZADORI et al, 2009) exportando 98% do que produz. Em impostos, essa cadeia arrecada US\$ 189 milhões para nosso país. Deve-se destacar ainda, que o estado de São Paulo detém 53% da produção mundial (NEVES, et al. 2010). As águas residuárias de indústrias citrícolas são resíduos com elevada fonte orgânica que podem apresentar em sua composição, de forma geral, um predomínio de açúcares tais como glicose, frutose e sacarose numa proporção 1:1:2 (REZZADORI et al, 2009). Na região central do estado de São Paulo que agrega as cidades de Limeira, Araraquara e Matão encontra-se o principal polo de beneficiamento e exportação de suco de laranja. Uma solução alternativa de reaproveitamento desses resíduos em energia a partir das águas residuárias, presente em grande quantidade na região, seria muito interessante tanto economicamente quanto ambientalmente.

Nesse sentido, a presente pesquisa pretendeu obter consórcios de bactérias fotoheterotróficas púrpuras não sulfurosas geradoras de H<sub>2</sub> em reatores anaeróbios operados em batelada, que consumam ácidos graxos voláteis de reatores fermentativos, completando assim o ciclo de tratamento biológico dos resíduos com a remoção da matéria orgânica e o aumento da produção global de biohidrogênio. No presente estudo foram utilizadas duas fontes de ácidos orgânicos como os ácidos acético e butírico, que são gerados durante a primeira fase de fermentação nos processos de produção biológica de H<sub>2</sub> a partir de águas residuárias. Além disso, foram testados os efluentes de reatores produtores de hidrogênio por processos fermentativos, operados em batelada e alimentados separadamente com o glicerol bruto e águas residuárias citrícolas. Tais ações permitirão propósitos fundamentais de biorremediação e a geração de energia.

## 2 PARTE EXPERIMENTAL

### 2.1 Objetivos

**Geral:** Obter consórcio de bactérias fotoheterotróficas púrpuras não sulfurosas geradoras de gás hidrogênio.

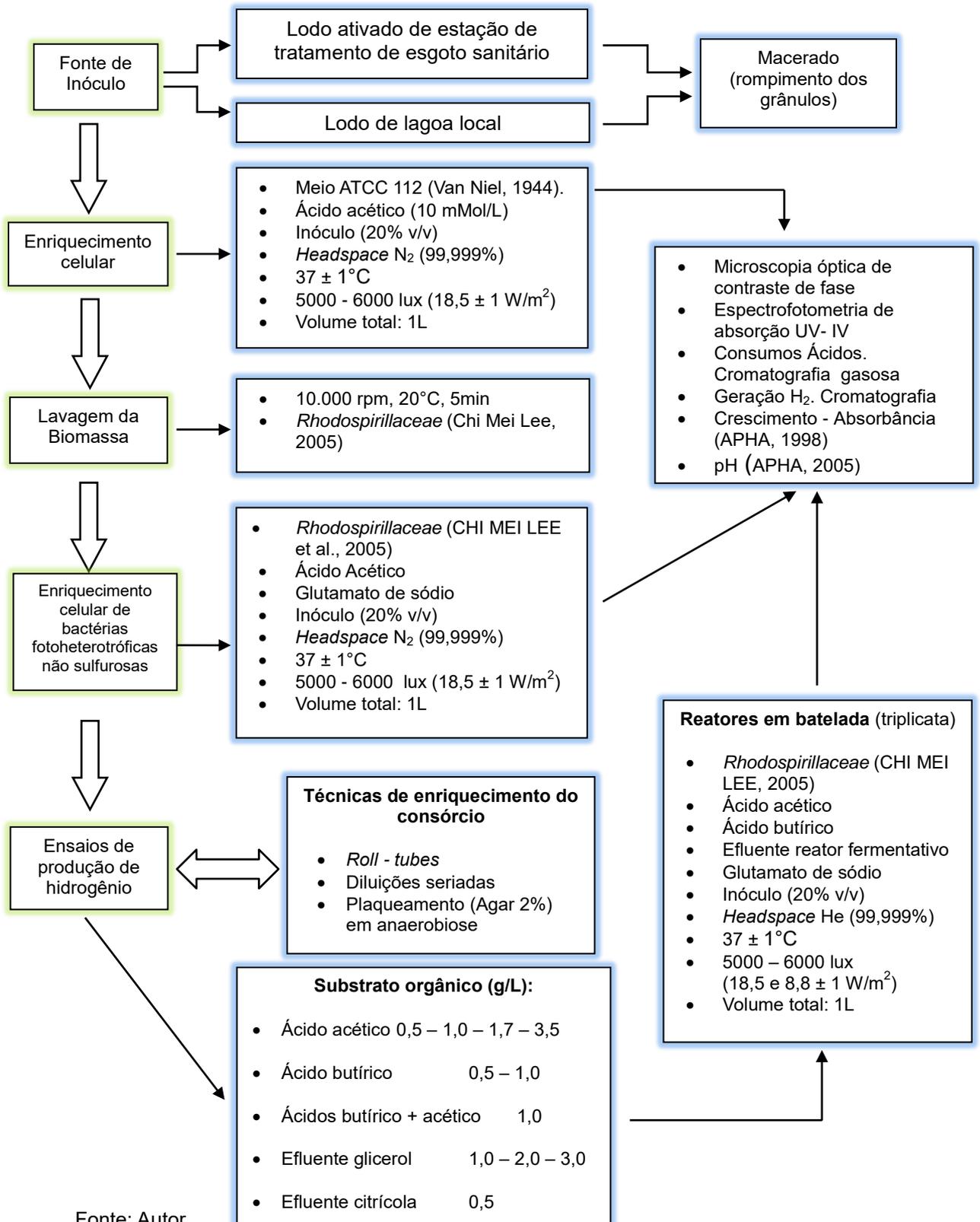
**Específicos:**

1. Obter consórcio de bactérias fotoheterotróficas púrpuras não sulfurosas a partir de amostras provenientes de distintas fontes ambientais.
2. Enriquecer consórcio de bactérias fotoheterotróficas púrpuras não sulfurosas por técnicas de diluições, plaqueamento e *roll-tubes*;
3. Operar reatores anaeróbios em batelada alimentados, separadamente, com ácidos orgânicos, visando a produção biológica de H<sub>2</sub>.
4. Testar efluente de reatores fermentativos produtores de H<sub>2</sub> que foram alimentados com glicerol bruto em processos fotoheterotróficos;
5. Testar efluente de reatores fermentativos produtores de H<sub>2</sub> que foram alimentados com águas residuárias citrícolas em processos fotoheterotróficos;
6. Avaliar o crescimento dos consórcios de bactérias fotoheterotróficas durante operação de reatores anaeróbios sob condições fotoheterotróficas anoxigênicas.
7. Avaliar o consumo dos ácidos orgânicos e a produção de gás hidrogênio para cada substrato utilizado.
8. Realizar caracterizações morfológicas do consórcio bacteriano fotoheterotrófico obtido por análises microscópicas.

### 2.2 Fluxograma experimental

O fluxograma experimental resume as atividades que foram desenvolvidas neste projeto de pesquisa (Figura 9). As condições operacionais testadas foram: inóculo de fontes distintas, tipo e concentração do substrato sintético, condições de iluminação dos reatores anaeróbios em batelada, análises microbiológicas, físico-químicas e cromatográficas.

Figura 10 - Fluxograma experimental



Fonte: Autor

## 2.3 Fonte de inóculos

Foram testadas duas fontes de inóculo provenientes de:

1. Sistema de Lodos Ativados usado no tratamento biológico de esgoto sanitário (Bueno de Andrada - Araraquara - SP)
2. Lodo de lagoa local (IBIOTEC - UNIARA – Araraquara - SP).

Os inóculos foram macerados previamente em cadinho, com auxílio de pistilo para homogeneizar possíveis grânulos. A seguir, foram adicionados em meios de cultivo para promover seleção e desenvolvimento de consórcios de bactérias fotoheterotróficas, em processos de enriquecimento, sob incidência luminosa de 5000 – 6000 lux ( $18,5 \pm 1 \text{ W/m}^2$ ), a 37°C durante 5 dias em cultivo estático.

## 2.4 Enriquecimento celular

### 2.4.1 Obtenção de consórcios fotoheterotróficos

O objetivo desta etapa foi a obtenção de consórcio fotoheterotrófico com a finalidade de selecionar e favorecer o crescimento e metabolismo daquelas bactérias capazes de degradar os ácidos orgânicos, usando luz como fonte de energia e liberando hidrogênio como produto de interesse. Nesta etapa foram usados dois meios de cultivo: (1) genérico (ATCC 112) (Tabela 1) e (2) específico (*Rhodospirillaceae*) (Tabela 2).

Para o cultivo celular foi utilizado o meio ATCC 112 (VAN NIEL et al., 1944), acrescido de ácido acético como fonte de carbono adicional (Tabela 1). As soluções foram preparadas em água ultrapurificada, na ordem apresentada (Tabela 1), pH  $7,0 \pm 0,2$  com solução 1 mol/L de hidróxido de sódio. Após esse procedimento, o meio de cultivo foi mantido sob atmosfera de Nitrogênio (99,99%) durante 20 minutos. Ainda, sob fluxo desse gás, o meio de cultivo foi distribuído em frascos de 20 e 50mL, deixando aproximadamente a metade de seu volume como *headspace*. Os frascos foram fechados e esterilizados por autoclavação a 121°C, por 20 minutos.

Tabela 1 - Composição do meio de cultivo para enriquecimento celular (ATCC 112).

Componentes	Quantidade q.s.p. 1000mL de água ultrapurificada
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,0 g
MgSO <sub>4</sub>	0,5 g
Extrato de levedura	10,0 g
Acetato de sodio	0,82 g (10 mM/L)

Fonte: Van Niel (1944).

A seguir os inóculos 1 e 2 (20%) foram testados separadamente em reatores anaeróbios em batelada, mantidos a 37°C, durante 120 horas. O crescimento celular foi observado indiretamente (densidade óptica medida em espectrofotômetro a 660 nm). A seguir, os inóculos enriquecidos foram concentrados em centrifuga refrigerada (10.000 rpm, 4°C, 10 minutos) e reativados em meio de cultivo (Tabela 2), descrito a seguir.

#### 2.4.2 Enriquecimento celular de bactérias fotoheterotróficas anoxigênicas

O enriquecimento celular foi realizado com o inóculo que apresentou as melhores condições de cultivo, conforme descritos anteriormente. Posteriormente foi fluxonado N<sub>2</sub> (100%), durante 20 minutos para manter as condições anaeróbias e os reatores foram mantidos a 37°C, sob incidência luminosa (5.000 - 6000 lux; 18,5 ± 1 W/m<sup>2</sup>) com lâmpadas incandescentes (Philips 60W clara). O inóculo foi reativado previamente em meio de cultivo, nas mesmas condições descritas anteriormente, em reatores anaeróbios em batelada, a 37°C, sob incidência luminosa (5.000 – 6000; 18,5 ± 1 W/m<sup>2</sup>), durante 72 horas. Após reativação celular, o inóculo foi concentrado em centrifuga refrigerada (10.000 rpm, 4°C, 10 minutos) e adicionado em meio de cultivo para utilização nos reatores anaeróbios em batelada.

Foram preparadas soluções traço de metais (Tabela 2), ferro-citrato III (Tabela 3) Vitaminas (Tabela 4), em água ultrapurificada. Após homogeneização das soluções, foi realizada a troca gasosa, por 20 minutos, em atmosfera de nitrogênio (99,99%). Depois, as soluções foram distribuídas em frascos de antibiótico, também sob atmosfera de N<sub>2</sub>. Os frascos foram esterilizados por autoclavação (121°C, por 20 minutos), excetuando a solução de vitaminas (Tabela 4) que foi esterilizada por filtração em membrana de 0,22µm de porosidade, em condições assépticas e armazenadas sob refrigeração.

Tabela 2 - Composição da solução traço de metais.

<b>Componentes</b>	<b>Quantidade q.s.p. 1000mL de água ultrapurificada</b>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	30 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	3 mg
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	10 mg
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	20 mg
CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	1 mg
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	3 mg
NiCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	2 mg

Fonte: Fang; Liu; Zhang, 2005.

Tabela 3 - Composição da solução ferro-citrato III

<b>Composto</b>	<b>Massas</b>
Ferro-citrato III	1000 mg
Água destilada q.s.p.	1000 mL

Fonte: Lazaro et al. (2012)

Tabela 4. Composição da solução de vitamina B<sub>12</sub>

<b>Composto</b>	<b>Massas</b>
Vitamina B12	40 mg
Água destilada q.s.p.	1000 mL

Fonte: Lazaro et al., 2012.

O enriquecimento celular foi realizado através de dissolução dos componentes em água ultrapurificada, de acordo com a ordem apresentada (Tabela 5) e o pH ajustado a 7,0±0,2 com solução 1 mol/L de hidróxido de sódio. O substrato sintético foi esterilizado por filtração em membrana de 0,22 µm de porosidade, em condições assépticas.

Tabela 5 - Composição do meio de cultivo para produção de H<sub>2</sub>.

	<b>Quantidade q.s.p. 1000mL de água ultrapurificada</b>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	500 mg
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	500 mg
Bicarbonato	250 mg
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	200 mg
NaCl	400 mg
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	50 mg
Extrato de levedura	200 mg
Glutamato de sódio	10 mM/L
Ácido acético	10 mM/L
Solução Ferro-citrato	5 mL
Solução traço de metais	1 mL
Solução vitamina B <sub>12</sub>	1 mL

Fonte: Chi Mei Lee, 2005.

## 2.5 Técnicas de isolamento das PNS

A purificação foi feita mediante o uso de diversas técnicas: *Roll-tubes*, diluições seriadas e plaqueamento em anaerobiose. Para as três técnicas, foi utilizado o meio ATCC 112 (VAN NIEL et al., 1944), acrescido de ácido acético (10 mM/L) como fonte de carbono adicional. As soluções foram preparadas em água ultrapurificada, na ordem apresentada da Tabela 6 (o ágar não foi usado na preparação das diluições seriadas). O pH foi ajustado a 7,0-7,2 com solução 1 mol/L de hidróxido de sódio ou ácido clorídrico (1M). Após esse procedimento, o meio foi mantido sob atmosfera de N<sub>2</sub> (99,99%) durante 20 minutos. Ainda, sob atmosfera de N<sub>2</sub> o meio de cultivo foi distribuído conforme descrito a seguir: 2,5 mL em frascos de 20 mL para a técnica de *Roll-tubes*, a metade do volume em frascos de 20 e 50 mL para a técnica de diluições seriadas e 20 mL para o plaqueamento. Os frascos foram fechados e esterilizados por autoclavação (121°C, por 20 minutos), excetuando o meio para plaqueamento que foi esterilizado por filtração em membrana de 0,22 µm de porosidade, em condições assépticas.

Tabela 6 - Composição do meio de cultivo para purificação do consórcio fotoheterotrófico

Componentes	Quantidade q.s.p. 1000mL de água ultrapurificada
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,0 g
MgSO <sub>4</sub>	0,5 g
Extrato de levedura	10,0 g
Ácido acético	10 mM/L
Agar	1,5%

Fonte: Van Niel, 1944.

A seguir foi feita a inoculação com diferentes volumes para cada técnica: 100 µL para os frascos de *Roll-tubes*, 20% do volume líquido final para os frascos das diluições e uma progressão de volumes desde 20 a 100 µL para as placas. No caso dos *Roll-tubes*, a inoculação foi feita após derretimento do ágar (banho-maria) e consequente submersão dos frascos incubados sob banho da água gelada, em movimentos circulares para uma distribuição homogênea do meio de cultivo e inóculo, até adesão do meio de cultivo inoculado junto às paredes dos frascos. A seguir, os frascos foram mantidos invertidos com ajuda de suporte (Figura 10).

Figura 11 - sistemas de purificação.





- Fonte: Autor (a continuação todas as imagens serão da mesma fonte)
- (A) Frasco de *roll-tubes* invertido sobre suporte.
  - (B) Ensaio de *Roll-tubes* sob iluminação incandescente.
  - (C) *Roll-tubes* aberto com colônias fotoheterotróficas vermelhas, para posterior repique com alça.
  - (D) Plaqueamento do inóculo fototrófico em ágar.
  - (E) Diluições seriais sob iluminação.

No caso das placas, o mesmo ágar solidificado atuou como uma barreira para o oxigênio, permitindo às bactérias anaeróbias crescerem nas áreas mais profundas (entre o vidro da placa e o ágar). Além disso, as placas foram fechadas com fita adesiva para manutenção das condições de anaerobiose. Os reatores e placas foram mantidos a 37°C, sob incidência luminosa de 5.000 - 6000 lux ( $18,5 \pm 1 \text{ W/m}^2$ ) (Figura 11).

Figura 12 - Reatores anaeróbios em batelada mantidos sob iluminação.



## 2.6 Ensaios de produção de hidrogênio

### 2.6.1 Montagem dos reatores anaeróbios em batelada

Os reatores anaeróbios em batelada foram montados em triplicata, em meio de cultivo *Rhodospirillaceae* (CHI MEI LEE et al., 2005), acrescido de glutamato de sódio e substrato orgânico. Foram mantidos sob intensidade luminosa de 5000 a 6000 lux a 37°C em duas condições de potência luminosa 18,5 e 8,8 ± 1 W/m<sup>2</sup>. Em cada ensaio, o inóculo foi reativado previamente durante 48 a 72 h, nas mesmas condições descritas anteriormente. Os substratos orgânicos que alimentaram os reatores anaeróbios, separadamente, foram: ácido acético, butírico, uma mistura de ambos ácidos, efluente de reatores fermentativos geradores de H<sub>2</sub> alimentados com águas residuárias procedentes de indústrias citrícolas (pesquisa desenvolvida pelo aluno de graduação Renan Pachiega) e efluentes de reatores fermentativos geradores de H<sub>2</sub> alimentados com glicerol bruto (pesquisa em desenvolvimento pela mestrandia Caroline Varella), em diferentes concentrações (Tabela 7). Os efluentes de reatores apresentavam concentrações conhecidas de 48 g de DQO/L (efluente de Glicerol) e 3 g de DQO/L (efluente de águas residuárias citrícolas); os quais foram esterilizados por filtração em membrana de 0,22 µm de porosidade, em condições assépticas, para evitar possíveis contaminações celulares dos processos fermentativos prévios. Além disso; foi realizada diluição prévia para sua utilização em concentrações ajustadas na operação dos reatores fotoheterotróficos.

Tabela 7 - Montagem dos Ensaios em reatores anaeróbios em batelada.

<b>ENSAIOS</b>		<b>(1)</b>	<b>(2)</b>	<b>(3)</b>	<b>(4)</b>	<b>(5)</b>	<b>(6)</b>	<b>(7)</b>	<b>(8)</b>	<b>(9)</b>	<b>(10)</b>	<b>(11)</b>	<b>(12)</b>
<b>Componentes</b>	<b>Concentração</b>	<b>3,5 (g/L)</b>	<b>1,7 (g/L)</b>	<b>1 (g/L)</b>	<b>0,5 (g/L)</b>	<b>1 (g/L)</b>	<b>0,5 (g/L)</b>	<b>1 (g/L)</b>	<b>1 (g/L)</b>	<b>1 (g/L)</b>	<b>2 (g/L)</b>	<b>3 (g/L)</b>	<b>0,5 (g/L)</b>
Ácido acético (g)		<b>1,750</b>	<b>0,85</b>	<b>0,333</b>	<b>0,167</b>	-	-	<b>0,167</b>	-	-	-	-	-
Ácido butírico (g)		-	-	-	-	<b>0,5</b>	<b>0,25</b>	<b>0,25</b>	-	-	-	-	-
Efluente reator fermentativo com glicerol (mL)		-	-	-	-	-	-	-	<b>10,43 *</b>	<b>10,43 *</b>	<b>20,86 *</b>	<b>31,30 *</b>	-
Efluente reator fermentativo com águas residuárias citrícolas (mL)		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>166,60*</b>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g)	<b>0,5 g/L</b>	0,25	0,25	0,166	0,166	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g)	<b>0,5 g/L</b>	0,25	0,25	0,166	0,166	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Bicarbonato (g)	<b>0,25 g/L</b>	0,125	0,125	0,083	0,083	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O (g)	<b>0,2 g/L</b>	0,10	0,10	0,066	0,066	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
NaCl (g)	<b>0,4 g/L</b>	0,2	0,20	0,133	0,133	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O (g)	<b>0,050 g/L</b>	0,025	0,025	0,016	0,016	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025
Extrato de levedura (g)	<b>0,2 g/L</b>	0,10	0,10	0,66	0,66	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Glutamato de sódio (g)	<b>10 mM</b>	0,935	0,935	0,623	0,623	0,935	0,935	0,935	0,935	0,935	0,935	0,935	0,935
Solução Ferro-citrato (mL)	<b>5 ml/L</b>	2,50	2,50	1,66	1,66	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50
Solução traço de metais (mL)	<b>1 ml/L</b>	0,50	0,50	0,33	0,33	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Solução vitamina B <sub>12</sub> (mL)	<b>1 ml/L</b>	0,50	0,50	0,33	0,33	0,5	0,5	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Inóculo (biomassa reativada) (mL)	<b>20 %</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>66</b>	<b>66</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>
Potência luminosa (W/m <sup>2</sup> )		18,5±1	18,5±1	8,8±1	8,8±1	8,8±1	8,8±1	18,5±1	8,8±1	18,5±1	18,5±1	18,5±1	18,5±1
Headspace Gás N <sub>2</sub> (mL)		<b>820</b>	<b>820</b>	<b>330</b>	<b>330</b>	<b>820</b>	<b>820</b>	<b>820</b>	<b>820</b>	<b>820</b>	<b>820</b>	<b>820</b>	<b>820</b>
Volume útil		<b>500</b>	<b>500</b>	<b>330</b>	<b>330</b>	<b>500</b>	<b>500</b>	<b>500</b>	<b>500</b>	<b>500</b>	<b>500</b>	<b>500</b>	<b>500</b>
pH inicial		<b>7 ± 0,2</b>	<b>7 ± 0,2</b>	<b>7 ± 0,2</b>	<b>7 ± 0,2</b>	<b>7 ± 0,2</b>	<b>7 ± 0,2</b>	<b>7 ± 0,2</b>	<b>7 ± 0,2</b>	<b>7 ± 0,2</b>	<b>7 ± 0,2</b>	<b>7 ± 0,2</b>	<b>7 ± 0,2</b>
Volume total frasco (mL)		<b>1320</b>	<b>1320</b>	<b>660</b>	<b>660</b>	<b>1320</b>	<b>1320</b>	<b>1320</b>	<b>1320</b>	<b>1320</b>	<b>1320</b>	<b>1320</b>	<b>1320</b>

\* Concentração de efluentes em gramas de DQO/L.

## 2.7 Análises físico-químicas

### 2.7.1 Crescimento Celular

O crescimento celular foi verificado através da análise de absorvância da cultura a 660 nm e STV (Sólidos Totais Voláteis); ambos de acordo com APHA (2005). Para a obtenção de tais resultados foram realizados ensaios com medidas de absorvância a 660 nm e Sólidos Totais Voláteis (STV), durante o período de crescimento da cultura microbiana. Foram montados reatores anaeróbios em duplicata, alimentados separadamente com ácido acético (1g/L), ácido de butírico (0,5 g/L), uma mistura de acético e butírico (0,5 g/L) e os efluente de reator gerador de H<sub>2</sub> a partir de glicerol bruto (1g/L de DQO) e de águas citrícolas (0,5 g/L de DQO). O meio de cultivo foi acrescido de glutamato de sódio e solução de vitaminas B<sub>12</sub>, nas mesmas condições da reativação da biomassa, com volume reacional de 1320 ml, *headspace* preenchido com N<sub>2</sub> (100%) e inóculo do enriquecimento celular (20%). Os reatores foram mantidos a 37 °C e sob duas condições de incidência luminosa (18,5 e 8,8 ± 1 W/m<sup>2</sup>). A concentração de STV da biomassa purificada foi proporcional à absorvância a 660 nm, conforme equações para o ácido acético, butírico, a mistura de ambos e os efluentes, respectivamente.

$$Y = 120,51X + 61,4 \quad R^2 = 0,98 \quad (\text{Ácido Acético} - 8,8 \pm 1 \text{ W/m}^2)$$

$$Y = 230,67X + 81,3 \quad R^2 = 0,94 \quad (\text{Ácido Acético} - 18,5 \pm 1 \text{ W/m}^2)$$

$$Y = 562,25X - 436,7 \quad R^2 = 0,99 \quad (\text{Ácido Butírico} - 8,8 \pm 1 \text{ W/m}^2)$$

$$Y = 138,35X + 73 \quad R^2 = 0,99 \quad (\text{Efluente Glicerol} - 8,8 \pm 1 \text{ W/m}^2)$$

$$Y = 285,35X + 44,7 \quad R^2 = 0,97 \quad (\text{Efluente Glicerol} - 18,5 \pm 1 \text{ W/m}^2)$$

$$Y = 281X + 98,8 \quad R^2 = 0,99 \quad (\text{Efluente agua residuária citrícola} - 18,5 \pm 1 \text{ W/m}^2)$$

### 2.7.2 Consumo dos substratos orgânicos

Os consumos dos substratos orgânicos foram determinados por Cromatografia gasosa (injeção automática por *headspace*). As análises foram realizadas em cromatógrafo gasoso Thermo Scientific modelo Trace GC Ultra, equipado com injetor Split/splitless e detector de ionização de chama (DIC) de alta frequência, acoplado a um amostrador modelo Triplus, configurado para amostragem *headspace*. As condições cromatográficas foram as seguintes: Coluna STABILWAX, de 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm; temperatura do injetor de 250°C, razão de split de 10; temperatura do forno de 35 °C (0') até 40°C (0'), a 3°C/min; até 78 °C (0') a 30°C/min; até 120°C (1'), a 35°C/min; até 180°C (1), a 10°C; até 230°C (4'), a 40°C/min; gás de arraste hélio 2,73 mL/min, temperatura do detector 260°C, gás auxiliar (N<sub>2</sub>): 30 mL/min; ar sintético 300 mL/min e hidrogênio 30 mL/min. As condições do amostrador automático de *headspace* era TriPlus 300 e seringa de 2,5 mL; temperatura da seringa: 90°C; volume injetado de 400 µL; tempo de lavagem da seringa com N<sub>2</sub> (3 minutos) e temperatura de aquecimento da amostra a 100 °C, por 13 minutos.

### 2.7.3 pH

O pH foi verificado no final dos ensaios, de acordo com APHA (2005).

### 2.7.4 Medidas de Pressão Interna no *headspace* dos Reatores

A pressão interna dos reatores foi testada com medidor de pressão marca Labtrix modelo XL28.1 (faixa -20 A a 20 (MCA), tipo diferencial), previamente à medição do biohidrogênio por cromatografia gasosa. Os valores obtidos foram necessários para os cálculos de produção global do gás.

### 2.7.5 Determinação de H<sub>2</sub> no *headspace* dos reatores anaeróbios

Foram efetuadas leituras para determinação do gás hidrogênio, em reatores pressurizados, por meio da retirada de 1,0 mL de amostra da fase gasosa, utilizando seringa *gastight* com trava. Foi utilizado cromatógrafo a gás, Thermo Trace GC Ultra,

equipado com injetor *split/splitless*, detector de condutividade térmica (TCD) e detector de ionização por chama (FID). Foram utilizadas duas colunas analíticas Carboxen 1006 plot 30 m x 0,53 mm i.d. e Rt-MSieve 5A 30 m x 0,53 mm i.d. As condições utilizadas foram as seguintes: Injetor e detector TCD a 150 °C; detector FID a 250 °C. Programação de temperatura do forno: 50°C (4,5 min), seguido de aquecimento a 40°C/min até 180 °C (1,5 min) e resfriamento a 50°C/min até 50 °C (3,15 min). Gás de arraste: argônio a 1,5 mL/min e fluxo de split a 60 mL/min.

### 2.7.6 Análise espectrofotométrica de absorção

Para confirmar as necessidades energéticas dos consórcios fotoheterotróficos, se realizou uma espectrofotometria de absorção UV-IV com o consórcio fotoheterotrófico obtido durante a purificação. Foram tomadas duas amostras de 3 mL da cultura e concentradas em centrífuga refrigerada (10.000 rpm, 4°C, 10 minutos). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* resuspenso em água ultrapurificada. As amostras foram preparadas e analisadas em espectrofotômetro ultravioleta – infravermelho, modelo Perkin Elmer - Lambda 1050 e interfaceado em estação de trabalho com o software *Opus*.

A eficiência de conversão do substrato (SCE) está descrita na equação (3). Para o cálculo da eficiência de conversão da luz (LCE) se utilizou a equação (4) descrita por Kawamura em 1987, onde a energia livre é calculada em função da quantidade de hidrogênio produzido pela entalpia standard da combustão do H<sub>2</sub> (33,61 W/h/g), sendo  $\rho_{H_2}$  densidade do hidrogênio (g/L),  $V_{H_2}$  volume do hidrogênio produzido (L),  $I$  intensidade luminosa (W/m<sup>2</sup>),  $A$  área irradiada (m<sup>2</sup>) e  $t$  duração do processo (h).

(3)

$$\text{SCE (\%)} = \frac{\text{Mols de Hidrogênio produzidos}}{\text{Mols de Hidrogênio esperados através da equação estequiométrica}} \times 100$$

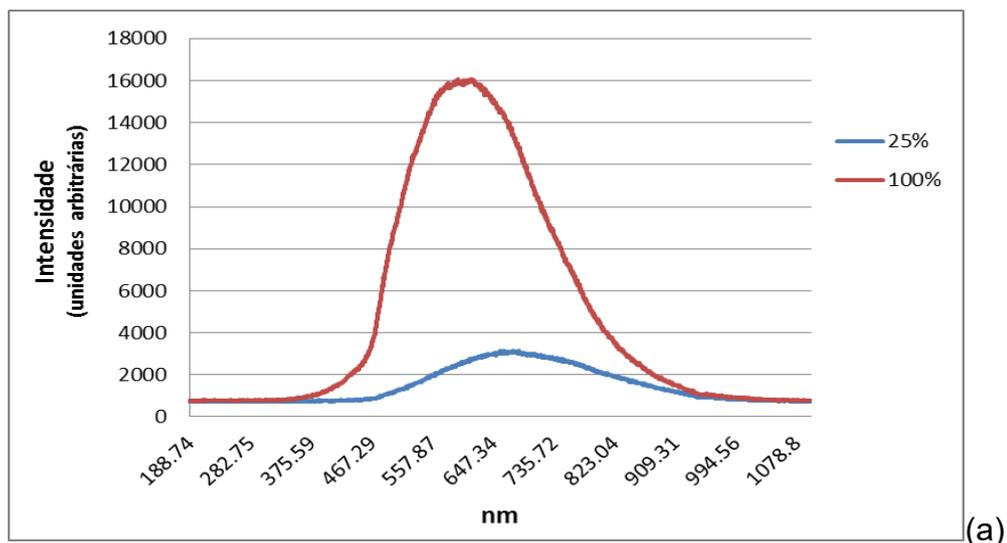
(4)

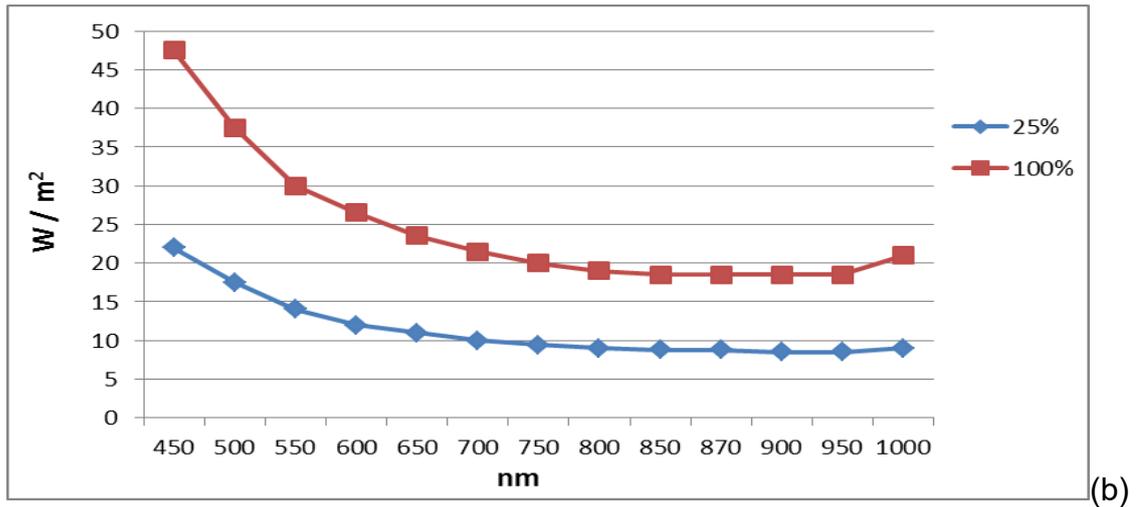
$$\text{LCE (\%)} = \frac{33,61 \times \rho_{H_2} \times V_{H_2}}{I \times A \times t} \times 100$$

### 2.7.7 Análises de potência luminosa e espectrometria de emissão

Foi realizada análise da potência e do espectro de emissão das lâmpadas incandescentes usadas como fonte de energia para os cultivos no presente estudo (Figura 12). A densidade de energia foi medida em watts por metro quadrado em medidor de potência (Newport modelo 2935 C) conectado a detector de silício sem atenuador (Newport modelo 918D-UV-OD3) com sensibilidade entre 200 - 1100 nm de comprimento de onda. A energia liberada pelas lâmpadas foi controlada em variak (Varivolt modelo Vm 215) que permitiu estabelecer duas condições experimentais nos ensaios. Foram realizados testes sob 25 % e 100 % da potência elétrica total das lâmpadas (Philips 60 W, 127 V), mantendo a distância de separação do foco em função da potência luminosa fixa média emitida de 5500 lux detectada com o luxímetro (Instrutherm modelo LD-300). A emissão das lâmpadas foi testada mediante espectrofotômetro (Ocean optics modelo HR 200+ES) conectado a detector de fibra optica unidireccional.

Figura 13 - Espectro de emissão (a) e densidade de potência emitida (b) pelas lâmpadas incandescentes.





### 2.7.8 Análises microscópicas

As características morfológicas dos inóculos e dos consórcios fotoheterotróficos obtidos foram observadas em microscópio óptico de contraste de fase e luz comum Motic AE31, com captura de imagens por meio de câmera Moticam 2000 e software MOTIC Images Plus 2.0).

### 2.7.9 Ajuste de dados experimentais

Os dados experimentais obtidos durante os ensaios foram ajustados para os valores médios obtidos das triplicatas dos reatores em batelada utilizando o software Statistica<sup>®</sup> (versão 8.0). A taxa máxima de produção de hidrogênio foi obtida por ajuste sigmoidal não linear da função Gompertz modificado (LAY *et al.*, 1998). A função foi usada para ajustar os dados à cinética de crescimento teórico celular, modificado neste caso, para cultivos de microrganismos. A equação é indicada abaixo, onde: P é o potencial de produção de hidrogênio (mmol/L cultura), Rm é a taxa máxima de produção de hidrogênio (mmol/L cultura. h), λ é a fase lag (h) de geração de H<sub>2</sub> e e vale 2,718281828.

$$H = P \cdot \exp \left\{ -\exp \left[ \frac{Rm \cdot e}{P} (\lambda - t) + 1 \right] \right\}$$

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

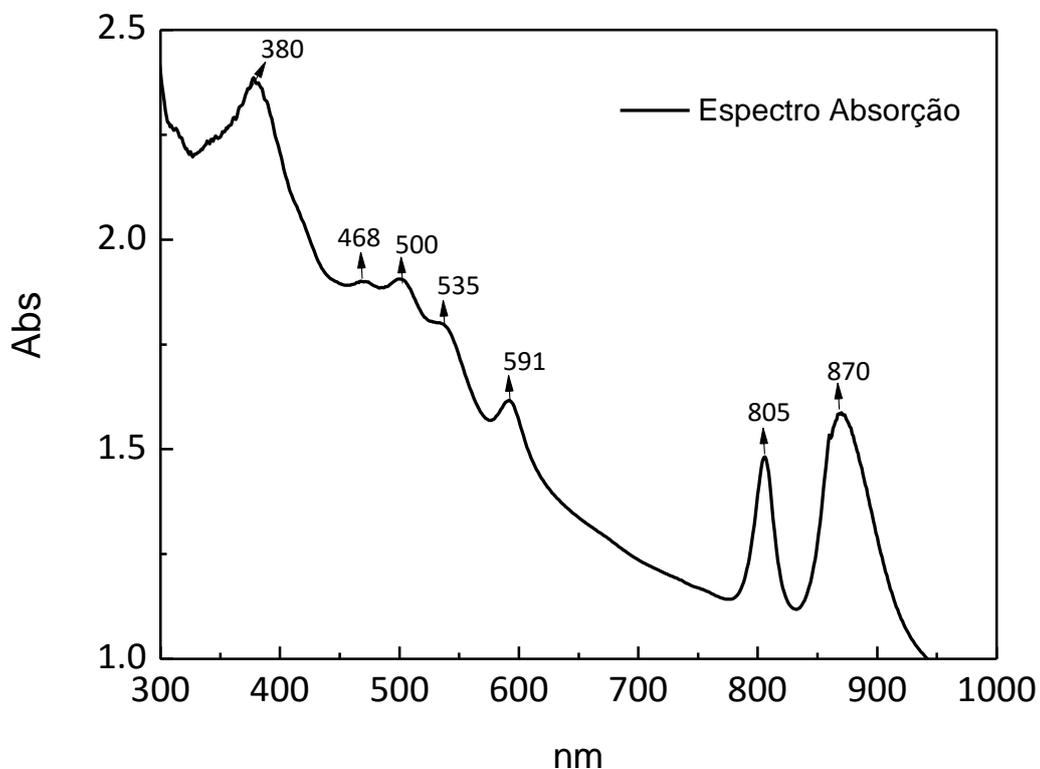
A fonte de inóculo (1) do Sistema Biológico de lodos ativados tratando esgotos sanitários apresentou as melhores condições de crescimento fotoheterotrófico e geração de H<sub>2</sub> durante os ensaios de purificação. Sendo assim, o inóculo proveniente desse sistema biológico foi a amostra escolhida para os ensaios subsequentes com reatores anaeróbios em batelada.

Na etapa de enriquecimento celular foram usados dois meios de cultivo, um primeiro meio genérico (ATCC 112) (Tabela 1) que continham todos os nutrientes necessários para favorecer o crescimento rápido das bactérias anaeróbias presentes no inóculo e numa segunda fase, foi preparado outro meio mais específico (*Rhodospirillaceae*) (Tabela 5), que permitiu o desenvolvimento de consórcios bacterianos com metabolismo fotoheterotrófico, conforme descrito anteriormente.

Em relação às necessidades energéticas da cultura, a literatura mostra uma grande variedade de fontes de luz usadas nos ensaios com bactérias púrpuras não sulfurosas (PNS - *Rhodobacter*, *Rhodopseudomonas*, *Rhodospirillum* e *Rubrivivax*), tais como luzes alógenas, fluorescentes, de filamento de tungstênio, incandescente, luz solar e diferentes combinações das anteriores (CHEN, 2005; KOKU et al, 2002). No presente estudo, os reatores anaeróbios foram mantidos inicialmente, sob luz fluorescente (8000 lux); contudo, após uma semana não foi verificado crescimento de bactérias fotoheterotróficas. Porém, apoiados em pesquisas mais recentes (LAZARO; VARESCHE; SILVA, 2015), utilizou-se luz incandescente sob incidência luminosa de 5000 - 6000 lux, a qual favoreceu o crescimento das bactérias PNS nos cultivos em reatores anaeróbios em batelada, após 3 dias de operação. De acordo com a literatura, as maiores bandas de absorção do Filo *Proteobacteria*, mais especificamente pertencentes às bactérias fotoheterotróficas, estão localizadas nos comprimentos de onda entre 450 e 870 nm, já que são caracterizadas por apresentar um fotossistema tipo II (PS-II) com bacterioclorofila *a* (BChl *a*, P870) como par especial de pigmentos no centro de reação, possuindo um pico de absorção a 870 nm (OHASHI et al., 2010). Em particular, a luz entre 800 – 900 nm é requerida para a síntese de ATP em bactérias fotossintéticas, sendo essencial para a foto-produção de H<sub>2</sub> (CHEN, 2005). A luz incandescente oferece uma emissão de onda próxima do infravermelho (acima dos 750 nm), favorecendo, assim, a produção

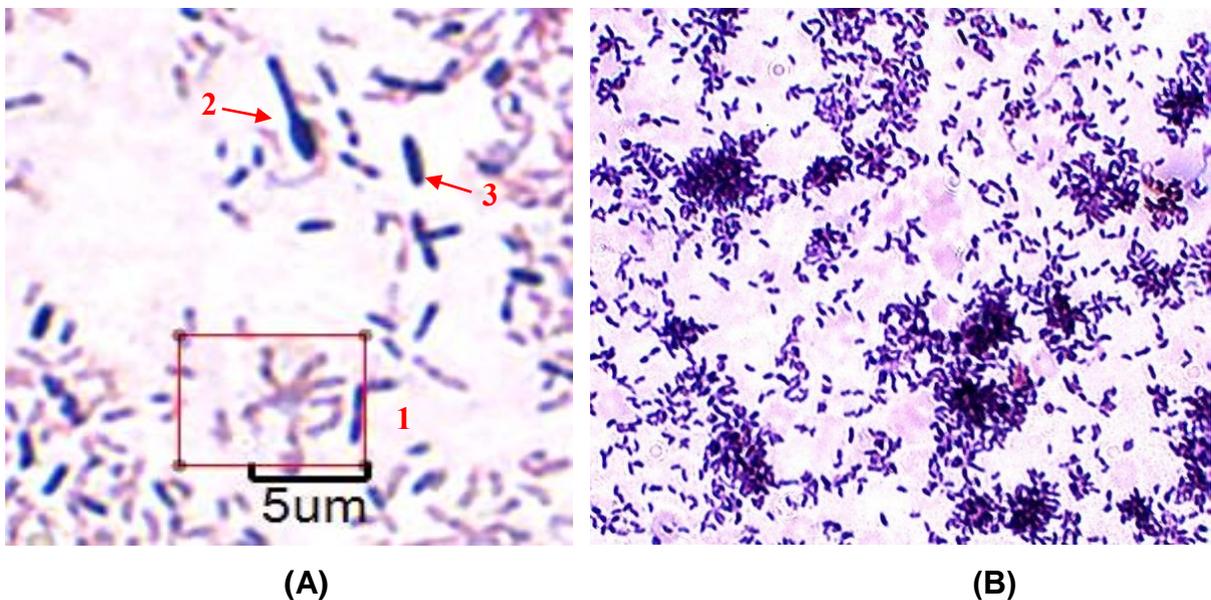
de ATP nas células fotoheterotróficas. Tais evidências foram confirmadas com o consórcio fotoheterotrófico obtido. As bandas apresentadas ofereceram uma melhor percepção das necessidades de iluminação da cultura (Figura 13), e confirmaram o sucesso nas técnicas de purificação e na obtenção dos consórcios de bactérias PNS sob iluminação incandescente para o cultivo das mesmas. Assim, considerando tais necessidades do espectro de absorção das bactérias PNS (máxima absorção a 870 nm) foram utilizados duas condições de potência luminosa durante o desenvolvimento dos experimentos (Figura 12), conseguindo uma otimização experimental da energia incidente sobre os reatores em batelada:  $18,5 \pm 1 \text{ W/m}^2$  para os ensaios 1, 2, 7, 9, 10, 11 e 12 e  $8,8 \pm 1 \text{ W/m}^2$  para os ensaios 3, 4, 5, 6, 7 e 8.

Figura 14 - Espectro de absorção do cultivo de bactérias PNS



As concentrações de ácidos orgânicos usadas no presente trabalho foram escolhidas para adequar o estudo com a fase prévia de processos fermentativos. Os resultados dos trabalhos sobre tratamento das águas residuárias para produção de  $H_2$ , revelam que a concentração dos ácidos orgânicos gerados na fase fermentativa está dentro dos níveis deste estudo em águas residuárias industriais (REZZADORI et al, 2009). Durante as diversas técnicas de purificação aplicadas foi observada mudança na diversidade morfológica da cultura (Figura 14), com predomínio de bacilos Gram negativos aglomerados em formato de roseta, os quais são característicos de consórcios fotoheterotróficos de bactérias PNS geradoras de  $H_2$  (BARBOSA et al, 2001).

Figura 15 - Microscopia do consórcio fotoheterotrófico



(A) Ensaio alimentado com 1,7 g acético/L: bacilos gram-negativos em formato de rosetas (1), bacilo com endósporo terminal (2) e bacilos gram-positivos curtos (3). (B) Ensaio alimentado com 1,0 g acético/L: bacilos curtos.

O crescimento dos diferentes cultivos está representado na Figura 15. De maneira geral, nela podemos observar como o crescimento do consórcio durante o tempo de operação dos reatores anaeróbios, foi diferente em função do substrato usado. Assim para os ácidos puros, crescimentos mais elevados foram alcançados nos ensaios de 1,7 g/L de acético e 1,0 g/L de butírico, entanto que para os efluentes

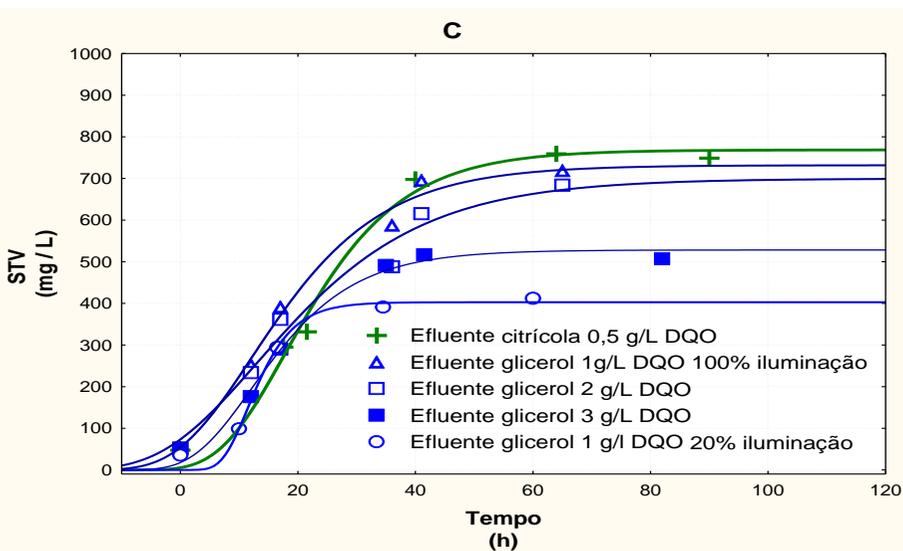
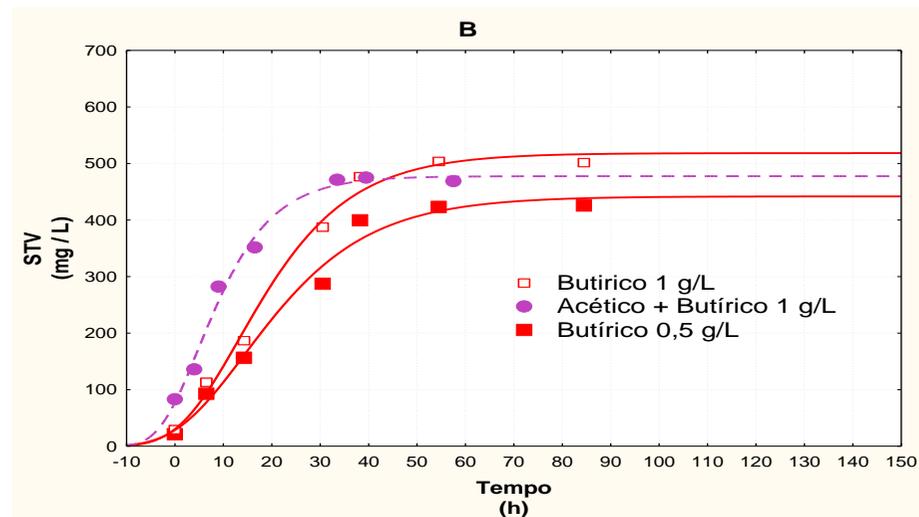
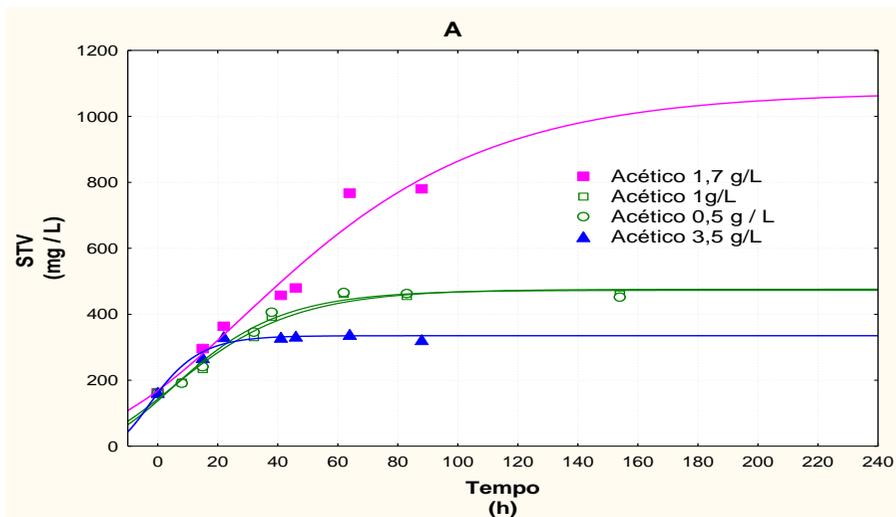
de processos fermentativos, o patamar mais elevado de crescimento foi alcançado para o efluente citrícola (0,5 g DQO /L) e para o efluente de glicerol bruto (1,0 g DQO /L). Com cargas de carbono mais elevadas, tanto dos ácidos quanto dos testes com efluente de glicerol bruto, foram observados processos de saturação por substrato que causaram a inibição do crescimento do consórcio fotoheterotrófico.

Em outra ordem de resultados, a produção de biohidrogênio para as diferentes concentrações de acético e butírico usadas nos ensaios estão ilustrados na Figura 16. O consumo dos ácidos e as distintas fontes de carbono durante os ensaios estão descritos na Figura 17. Os principais resultados durante a operação dos ensaios (1 a 12) estão descritos na Tabela 8 e a comparação desses com a literatura na Tabela 9.

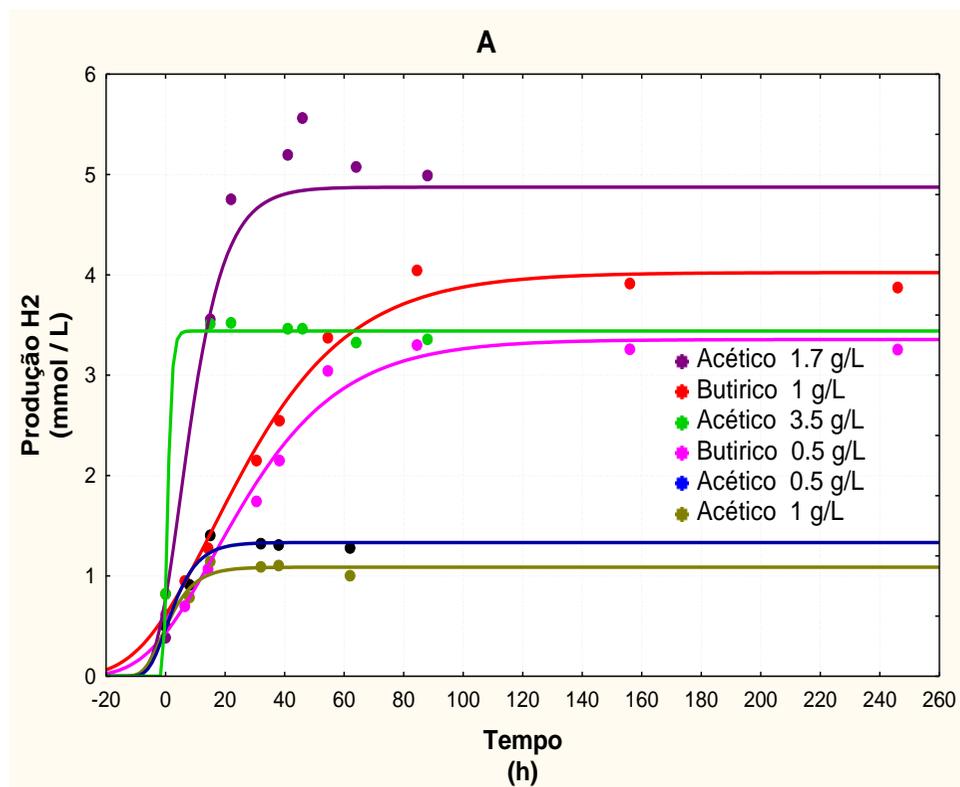
Durante a operação dos reatores anaeróbios (Figura 16) foi observado ausência de fase Lag no início da operação. No início dos ensaios, a produção de hidrogênio foi aproximadamente entre 0,5-1 mmol H<sub>2</sub>/L, e a partir daí, a geração de H<sub>2</sub> teve comportamento exponencial (fase Log). O inóculo foi reativado previamente, conforme descrito anteriormente e esse fato, colaborou para adequar o consórcio às novas condições ambientais. O valor negativo da fase Lag ( $\lambda$ ) mostrado na Tabela 8 e calculado de acordo com a equação de Gompertz modificado (LAY et al., 1998), indica sua ausência nos ensaios de produção, mas também resulta uma estimativa de sua duração prévia aos mesmos. A geração máxima de H<sub>2</sub> foi uma das mais claras diferenças que podemos encontrar entre os ensaios realizados (Figura 16). Nos ensaios para concentrações de acético mais elevadas observamos gerações próximas a 5 mmol H<sub>2</sub>/L, em contraste aos ensaios cultivados com concentrações de acético mais reduzidas, os quais não ultrapassaram o patamar de 1,5 mmol H<sub>2</sub>/L. Salienta-se as diferenças entre as concentrações mais elevadas de acético; ou seja, quanto mais elevadas as concentrações de acético mais reduzidas as gerações de biogás (3,44 mmol H<sub>2</sub>/L para 3,5 g/L e 4,87 mmol H<sub>2</sub>/L para 1,7 g/L). Esses resultados indicam uma possível inibição por concentração elevada de acético. Fato confirmado por inibição no crescimento do consórcio bacteriano, como se pode observar na variação dos STV (Figura 15 A), onde a quantidade de sólidos totais voláteis passou desde 1179 mg/L para o ensaio de 1,7 g/L até 339 mg/L para o ensaio de 3,5 g/L; e no consumo de ácidos (Figura 17 A), onde a remoção da matéria orgânica passou desde 92,5% até 58,5% para os mesmos ensaios. Porém,

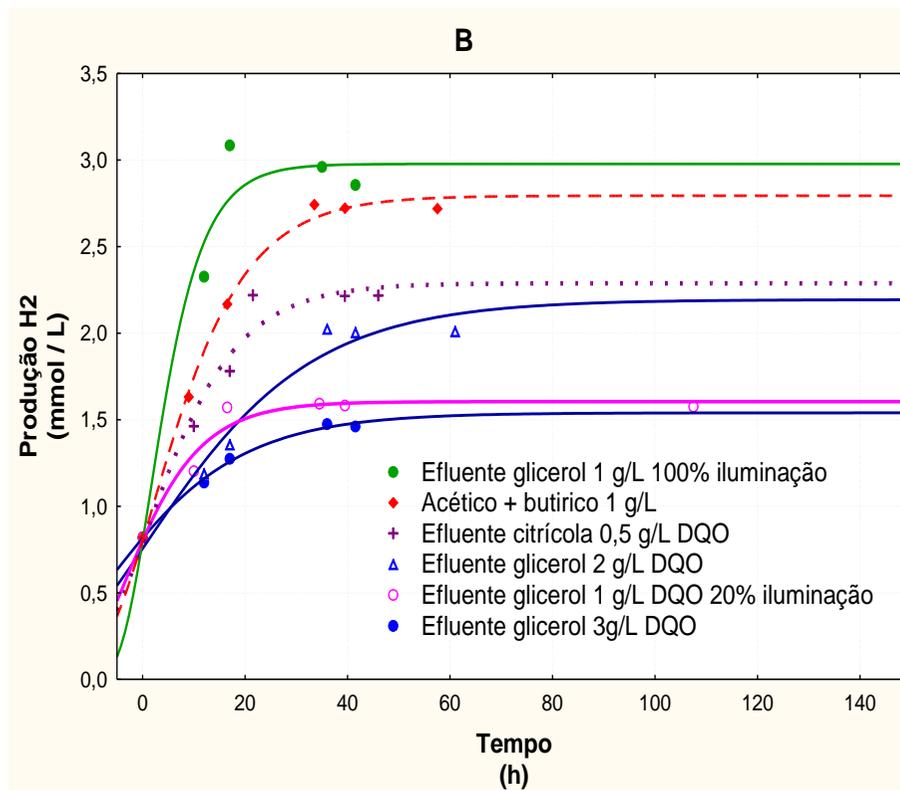
a taxa de produção de hidrogênio mostrou uma correlação positiva com a elevação da concentração; assim nos cultivos crescidos em concentrações mais elevadas de carbono foram observadas as maiores taxas de produtividade de  $H_2$  (1,30 mmol  $H_2$ /L / h para 3,5 g/L e 0,21 mmol  $H_2$ /L / h para 1,7 g/L de acético). O rendimento teórico de hidrogênio é de 4 mol de  $H_2$  por cada mol de acético e 10 mol de  $H_2$  por cada mol de butírico (Equações 5 e 6). Os resultados apresentados neste trabalho seguiram as rotas estequiométricas, entretanto, para os reatores operados para as mesmas concentrações usadas nas duas fontes de carbono (acético e butírico), os resultados de produção de hidrogênio são superiores para o ácido butírico (1,08 e 1,33 mmol  $H_2$ /L para reatores alimentados com ácido acético e 4,02 e 3,35 mmol  $H_2$ /L para reatores alimentados com ácido butírico; ambos em concentrações de 1,0 g/L e 0,5 g/L de acético e butírico respectivamente).

Figura 16 - Variação temporal do crescimento dos consórcios fotoheterotróficos nos ensaios realizados:



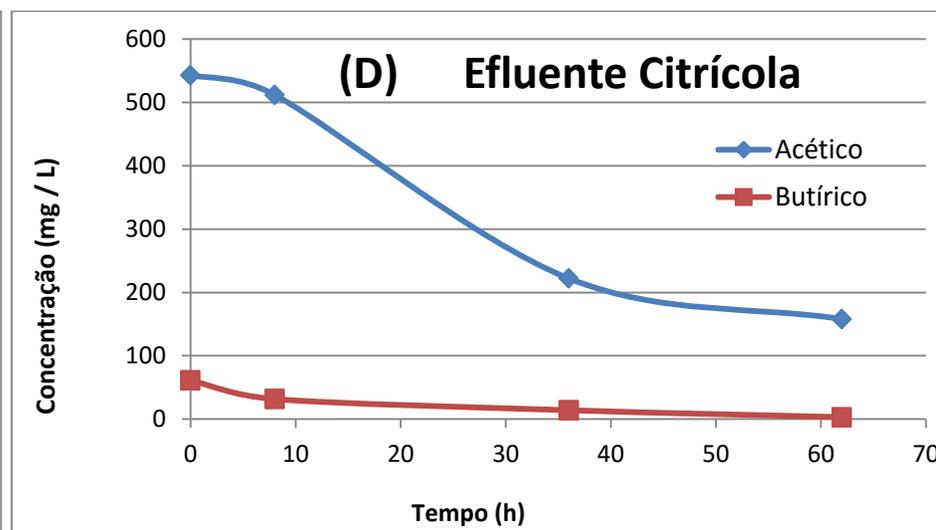
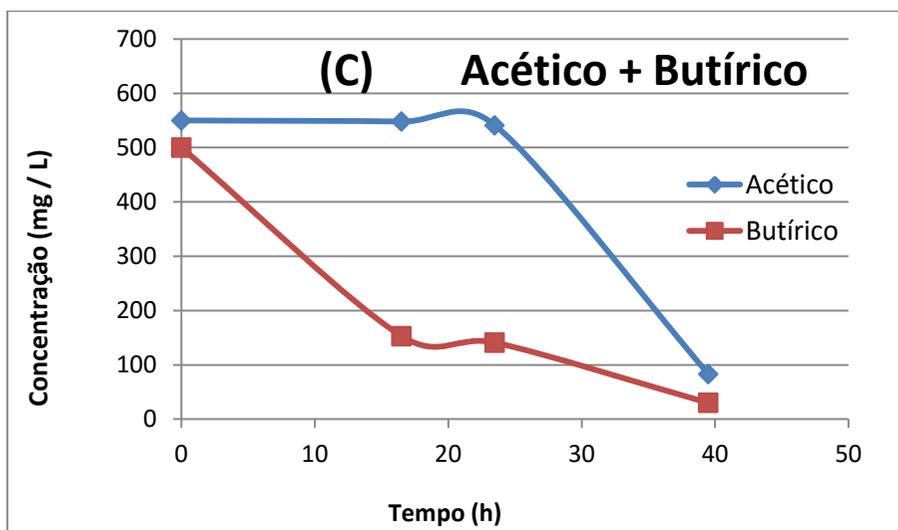
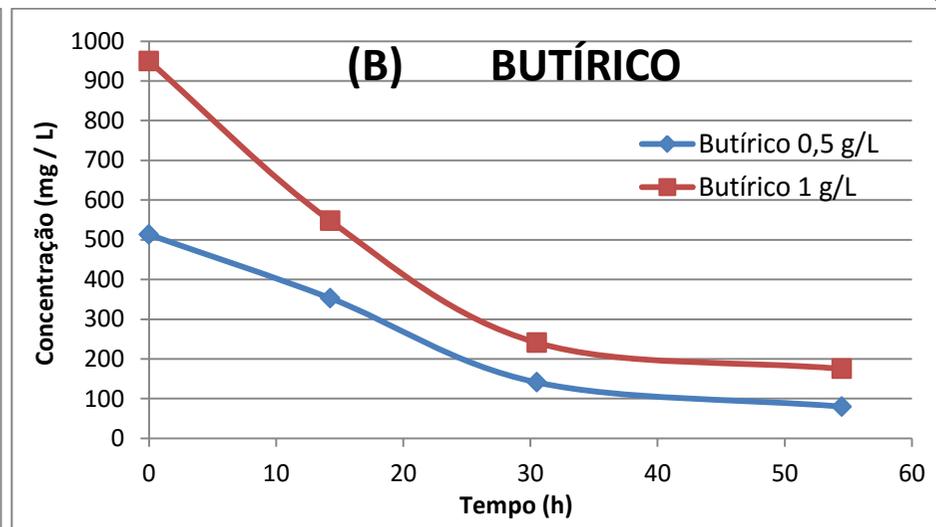
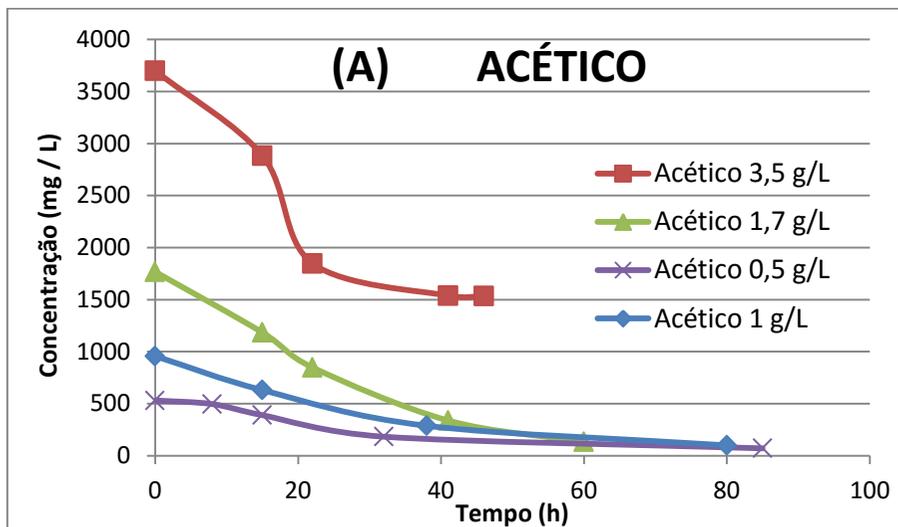
(A) Ensaios alimentados com ácido acético; (B) Ensaios alimentados com ácido butírico e a mistura de ambos; (C) Ensaios alimentados com efluentes de processos fermentativos alimentados com glicerol bruto e águas residuárias cítricas.

Figura 17 - Geração de H<sub>2</sub> durante operação dos reatores anaeróbios fotoheterotróficos.



(A) Ensaios alimentados com ácido acético e butírico; (B) Ensaios alimentados com a mistura de ambos ácidos e com os efluentes de glicerol e cítrico.

Figura 18 - Consumo de carbono nos diferentes ensaios realizados em reatores fototróficos geradores de H<sub>2</sub>.



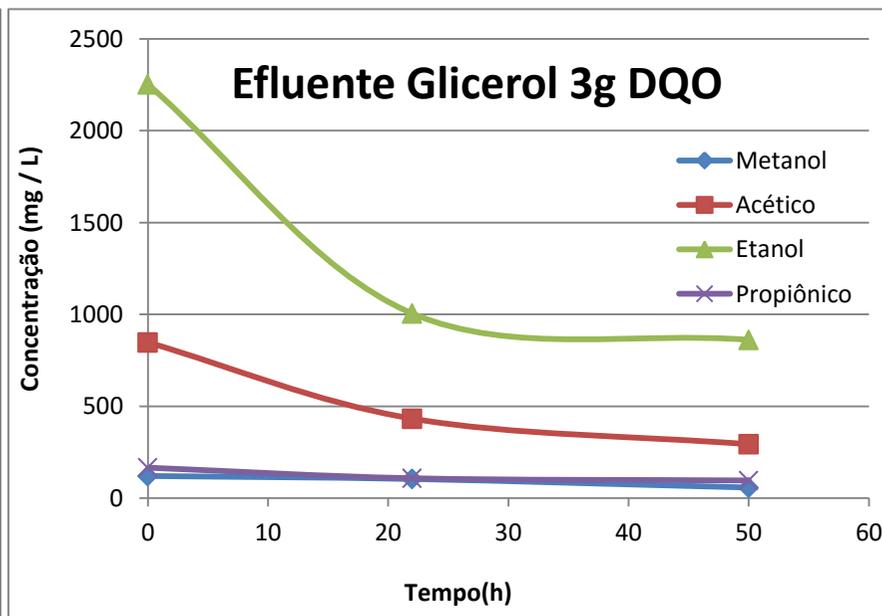
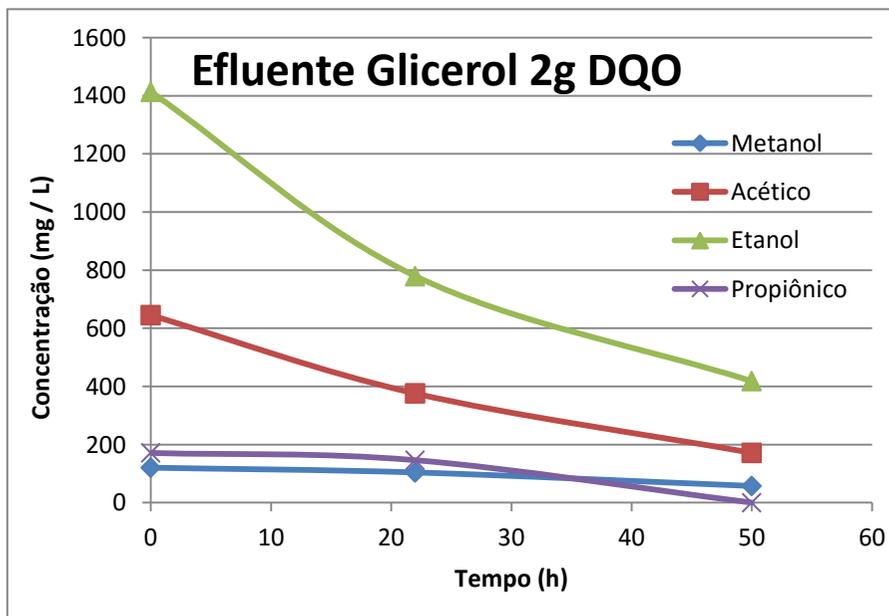
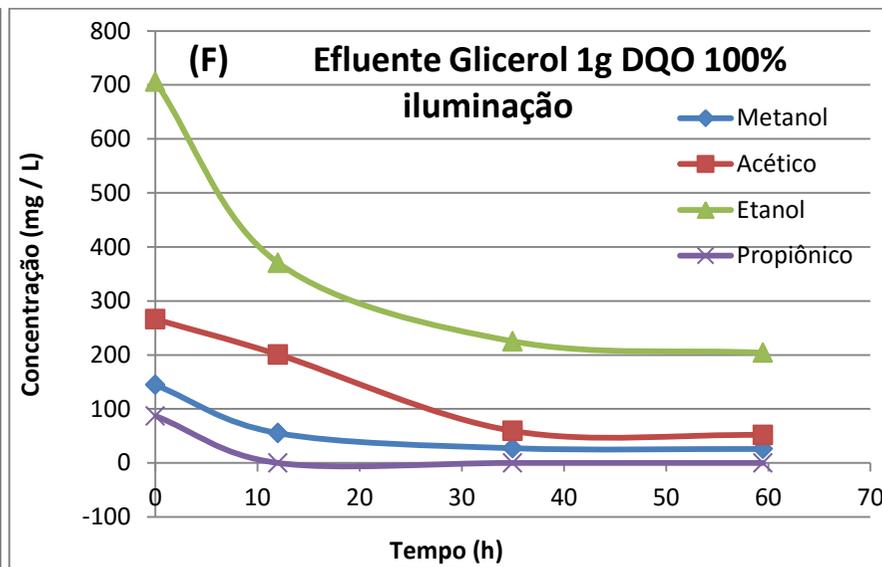
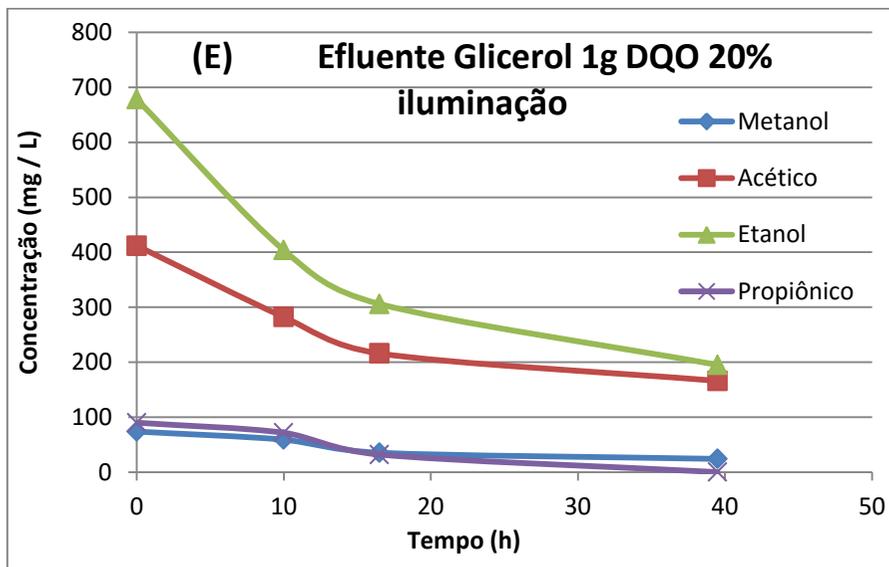
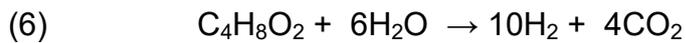
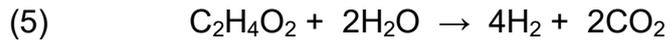


Tabela 8 - Resultados dos Ensaio em reatores anaeróbios em batelada.

	Acético 3,5 g/L	Acético 1,7 g/L	Acético 1 g/L	Acético 0,5 g/L	Butírico 1 g/L	Butírico 0,5 g/L	Acético + Butírico 1 g/L	Efluente Glicerol 1 g/L	Efluente Glicerol 1 g/L	Efluente Glicerol 2 g/L	Efluente Glicerol 3 g/L	Efluente Citrícola 0,5 g/L
<b>Potência luminosa (W/m<sup>2</sup>)</b>	18,5±1	18,5±1	8,8±1	8,8±1	8,8±1	8,8±1	18,5±1	8,8±1	18,5±1	18,5±1	18,5±1	18,5±1
<b>pH final</b>	9,8	10,1	9,2	9,2	9,8	9,7	10,2	9,5	9,9	9,6	10,1	9,7
<b>Crescimento máximo (Abs 660 nm)</b>	1,1	3,0	1,6	1,6	1,6	1,5	1,6	1,5	1,6	1,8	1,8	1,8
<b>STV (mg/L)</b>	339	1179	461	465	503	425	471	432	718	683	516	759
<b>Tempo de operação (h)</b>	88	88	62	62	84	84	51	40	40	51	40	46
<b>* P (mmol H<sub>2</sub>/ L)</b>	3,5	4,9	1,1	1,3	4,0	3,4	2,8	1,6	3,0	2,1	1,5	2,3
<b>* Rm (mmol H<sub>2</sub>/ L / h)</b>	1,3	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1
<b>*Rm (mmol H<sub>2</sub>/ g cel seca/ h)</b>	3,9	0,3	0,1	0,2	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2
<b>* Rm (ml H<sub>2</sub>/ L / h)</b>	30,66	4,62	2,43	2,33	2,36	2,31	2,32	2,35	4,65	2,42	2,37	2,31
<b>SCE (%)</b>	2,2	6,4	2,3	6,19	4,45	9,65	3,68	-	-	-	-	8,49
<b>LCE (%)</b>	4,85	0,52	0,28	0,31	0,64	0,53	2,30	1,37	2,07	1,71	1,28	1,71
<b>Remoção (%)</b>	58,5	92,5	89,7	86,8	83,6	85,7	89,5	68,1	76,1	72,5	59,04	83,1
<b>* λ (h)</b>	-0,61	-3,22	-7,23	-5,56	-9,36	-6,53	-7,95	-11,40	-4,18	-7,23	-9,61	-9,33
<b>* R<sup>2</sup></b>	0,9846	0,9831	0,9645	0,9726	0,9846	0,9809	0,9962	0,9526	0,9889	0,9654	0,9947	0,9790



A mistura dos ácidos acético e butírico em concentrações reduzidas de carbono ofereceram valores de produção de hidrogênio similares aos obtidos individualmente com as mesmas concentrações de butírico (2,8 mmol H<sub>2</sub>/L da mistura de ácidos frente a 3,4 mmol H<sub>2</sub>/L para 0,5 g/L de butírico e 1,30 mmol H<sub>2</sub>/L para 0,5 g/L de acético). Por sua vez, o consumo dos ácidos medidos por cromatografia gasosa (Figura 17 C) indicou uma metabolização em duas fases, uma primeira fase onde o ácido butírico é consumido imediatamente seguido de uma segunda fase onde ácido acético foi consumido. Ambos os fatos indicaram uma preferência inicial na metabolização do ácido butírico na rota de produção de H<sub>2</sub> frente ao ácido acético. Na bioquímica dessas reações, ambos ácidos são convertidos a acetyl-CoA para iniciar o metabolismo central dos ácidos tricarboxílicos (KOKU et al., 2002); oferecendo um maior rendimento energético no caso do butírico (4 carbonos) que no caso que do acético (2 carbonos). Além disso; ácido butírico pode ser rapidamente metabolizado a 3-hidroxi-butiril-CoA, intermediário final da rota de polimerização dos PHBs (CHEN, 2005). Esses fatos podem ter ocorrido durante a operação dos reatores anaeróbios, favorecendo assim o consumo preferencial de ácido butírico pelo consórcio fotoheterotrófico.

Testes com efluentes de reatores fermentativos geradores de H<sub>2</sub> permitiram testar a aplicação desses resíduos em escala pré-piloto. Os resultados com estes efluentes tiveram coerência nos resultados obtidos com os ácidos puros. Os efluentes de reatores fermentativos produtores de H<sub>2</sub> e alimentados com glicerol bruto (1 g DQO/L) continham concentrações de ácido acético entre 0,28 – 0,42 g/L. Assim, sob condições de iluminação reduzidas (8,8±1 W/m<sup>2</sup>), tanto em estado puro quanto diluídos em efluentes, a transformação desses ácidos em H<sub>2</sub> alcançou patamares similares (1,3 mmol H<sub>2</sub>/L para 0,5 g/L de acético, frente a 1,6 mmol H<sub>2</sub>/L do efluente de glicerol bruto). No entanto, os reatores mantidos sob intensidades luminosas mais elevadas (18,5±1 W/m<sup>2</sup>) provocaram conseqüentemente um acúmulo de equivalentes de redução que podem ser desviados a produção mais elevada de H<sub>2</sub> via nitrogenase (McKINLAY, 2014), como podemos observar no ensaio 9 (3,0 mmol H<sub>2</sub>/L para 1,0 g DQO/L). Da mesma forma observamos efeito

semelhante no efluente de reatores fermentativos produtores de  $H_2$  e alimentados com resíduos citrícolas; em concentrações de ácidos acético e butírico próximas a 0,5 g/L e uma proporção aproximada de 6:1 (acético:butírico). Nesse caso foram obtidas gerações de  $H_2$  quantitativamente superiores para as condições de intensidade luminosa mais elevada quando comparado aos reatores mantidos sob intensidades luminosas mais reduzidas que foram respectivamente de: 2,3 mmol  $H_2$ /L para 0,5 g DQO /L sob 100% iluminação e 1,3 mmol  $H_2$ /L para 0,5 g/L de acético em 20 % iluminação).

Efluentes de reatores fermentativos produtores de  $H_2$  e alimentados com glicerol bruto para cargas de carbono mais elevadas (2,0 e 3,0 g DQO/L) foram observados resultados também equivalentes, quando comparados aos reatores alimentados com cargas similares de ácidos puros. Assim, 2,0 e 3,0 g DQO /L do efluente de glicerol apresentaram concentrações de acético próximas a 0,62 e 0,89 g/L, nos quais foram observadas produções de  $H_2$  de 2,1 e 1,5 mmol  $H_2$ /L, respectivamente. Produções de  $H_2$  superiores às obtidas com ácidos puros para uma carga similar de acético (com 0,5 e 1,0 g/L de acético se obtiveram 1,3 e 1,1 mmol  $H_2$ /L respectivamente) também foram observadas. Nos ensaios alimentados com ácidos puros observamos inibição da produção de  $H_2$  (Figura 16 A) e do crescimento (Figura 15 A) em concentrações superiores a 2,0 g/L; tal fato também foi observado, nos efluentes de glicerol bruto para cargas mais elevadas de carbono (Figura 16 B e Figura 15 C). Desse modo, para os efluentes de reatores fermentativos alimentados com glicerol bruto foram observadas produções máximas de biogás para concentrações de 1,0 g DQO/L (3,0 mmol  $H_2$ /L) frente ao máximo em reatores alimentados com acético puro com 1,7 g/L (4,9 mmol  $H_2$ /L). Igualmente, processos inibitórios se iniciaram para concentrações entre 2,0 e 3,0 g/L nos reatores alimentados com ácidos puros. No entanto, para os efluentes dos reatores fermentativos produtores de  $H_2$ , os processos de inibição foram observados para concentrações entre 1,0 e 2,0 g DQO/L. Essas diferenças nos processos inibitórios por saturação de substrato observadas entre os reatores alimentados com ácidos puros e com efluentes de reatores fermentativos geradores de  $H_2$ , podem estar relacionadas às presenças de outros compostos como álcoois, estéreis e outros complexos carbônicos nos efluentes procedentes da fermentação do glicerol bruto. Como observamos na análise de ácidos do efluente de glicerol usados neste estudo (com uma DQO final

de 48 g/L e um pH final de 5,6), onde encontramos os seguintes componentes majoritários para 1g DQO / L: Metanol (104 mg/L ), Etanol (692 mg/L), Acético (346 mg/L ), Propiônico (89 mg/L). Fato que também foi observado em Chookaew; O-Thongc; Prasertsan (2015), quando operou reatores fermentativos com glicerol bruto (DQO final: 25,6 g/L), com uma remoção do 30,43% e pH final de 5,94. Os autores observaram presenças de: Glicerol ( $21,49 \pm 0,24$  mM), 1,3-Propanodiol ( $47,06 \pm 0,44$  mM), 2,3-Butanodiol ( $8,76 \pm 0,03$  mM), Etanol ( $47,29 \pm 0,14$  mM) e Acético ( $11,95 \pm 0,29$  mM) no efluente final, que posteriormente foi usado para a fase fotoheterotrófica do processo.

Na literatura podemos encontrar uma grande diversidade de parâmetros aplicados ao estudo da produção de biohidrogênio com PNS; desde a configuração do reator usado (planos, tubulares, dentre outros), tamanho do reator, tipo de alimentação (batelada, batelada alimentada, fluxo contínuo), temperatura de operação, pH inicial, tipo de inóculo (cepa purificada, mutante, ou consórcios de bactérias), quantidade de biomassa usada como inóculo, tipo e concentração de carbono, fonte e intensidade luminosa, dentre outros. Toda essa combinação de fatores torna difícil estabelecer uma comparação detalhada dos resultados. No presente estudo trabalhou-se com um consórcio bacteriano sob variações da fonte de carbono e suas concentrações, expostos a duas condições de potência luminosa e mantendo outros parâmetros operacionais fixos. Porém, os melhores resultados de produção de hidrogênio com ácidos puros reportados no presente trabalho, 4,9 e 4,0 mmol H<sub>2</sub>/L com 1,7 g/L (28,3 mM) de acético e 1,0 g/L (11,3 mM) de butírico, respectivamente; e com efluentes 3,0 e 2,3 mmol H<sub>2</sub>/L com 1,0 g/L e 0,5 g DQO /L dos efluentes de reatores fermentativos produtores de H<sub>2</sub> e alimentados com glicerol bruto e efluente citrícola respectivamente, são similares a outros trabalhos reportados na literatura (Tabela 9).

Loss (2013) trabalhando com consórcio fotoheterotrófico obteve gerações de hidrogênio similares aos resultados do presente trabalho, 5,8 e 5,4 mmol H<sub>2</sub>/L com 30 mM acético e 15 mM de butírico respectivamente. Entretanto, os resultados obtidos por esses autores para o acético demonstraram eficiências similares na conversão do substrato (5,33 mmol de H<sub>2</sub>/L com 30 mM de acético frente a 4,7 mmol de H<sub>2</sub>/L com 28,3 mM). Da mesma forma, os resultados obtidos para o butírico foram

inferiores mesmo em maiores concentrações (4,03 mmol de  $H_2$ /L com 15 mM quando comparado com o presente estudo que foram respectivamente de a 4,45 mmol de  $H_2$ /L com 11,3 mM). Trabalhos com culturas puras são reportados com produções mais elevadas de  $H_2$ , quando comparados a culturas mistas; entretanto Hongliang et al. (2012) trabalhando com *Rhodobacter sphaeroides* RV, obteve produções inferiores para o acético e butírico com concentrações similares de carbono em comparação ao presente estudo (0,55 e 0,61 mmol  $H_2$ /L com 1,2 g/L de acético e butírico respectivamente frente a 1,1 e 4,0 mmol  $H_2$ /L com 1,0 g/L de acético e butírico respectivamente). Nos reatores alimentados com mistura de ambos ácidos no presente estudo, foram também observados valores superiores de produção de  $H_2$  (2,8 mmol de  $H_2$ /L com 1,0 g/L de acético + butírico) quando comparado ao estudo de Hongliang para concentrações similares.

Em relação às taxas de produção de hidrogênio ( $R_m$ ), os melhores resultados obtidos neste trabalho (3,9 e 0,3 mmol  $H_2$ /g cel seca/h ou 1,3 e 0,2 mmol  $H_2$ /L/h para 3,5 e 1,7 g/L de acético, respectivamente) são também comparáveis com muitas das pesquisas publicadas na área nos últimos anos, principalmente para cultivos puros, como potenciais produtores em grande escala. Xiaomin (2010) testaram cultura pura de *Rhodopseudomonas palustris* W004 em meio de cultivo contendo ácido acético e obtiveram produções superiores ao presente estudo (7,4 mmol  $H_2$ /L com 20 mM frente a 4,9 mmol  $H_2$ /L com 28,3 mM) em fotobioreatores com agitação contínua, favorecendo assim a remoção da matéria orgânica e a produção de hidrogênio; mesmo assim, as taxas de produção de  $H_2$  foram muito inferiores aos resultados obtidos no presente trabalho (0,44 mmol  $H_2$ /L/h frente a 1,3 mmol  $H_2$ /L/h).

Estudos com *Rhodobacter capsulatus* (DSM 1710), reportaram valores inferiores de produção de hidrogênio (0,6 mmol  $H_2$ /L/h) usando uma mistura de fontes de carbono em concentrações mais elevadas (40 mM de ácido acético e 7,5 mM de ácido láctico frente a 58,28 mM de acético) (ANDROGA et al., 2014). Estudos descritos anteriormente usando o mesmo gênero bacteriano, desta vez *Rhodobacter sphaeroides*, reportaram taxas de produção de hidrogênio em função da biomassa seca também com valores inferiores; 1,72 mmol  $H_2$ /g cel seca/h com 2,5 g/L de acético no trabalho de Nath; Kumar; Das(2005) e 0,46 mmol  $H_2$ /g cel seca/h com 30 mM de malato no trabalho de Sasikal; Ramana; Raghuv eer (1991), frente aos 3,9 mmol  $H_2$ /g cel seca/h com 3,5 g/L de acético da presente pesquisa.

Estudos com *Rhodopseudomonas palustris* (CQK 01), obtiveram rendimentos próximos ao presente estudo (3,82 mmol H<sub>2</sub>/g cel seca/h) usando elevadas concentrações de glicose (9,9 g/L frente a 3,5 g/L de acético). Salienta-se ainda que a glicose é a fonte de carbono universal para rotas metabólicas de obtenção de energia de uma ampla variedade de microrganismos; apresentando para sua obtenção gasto elevados de recursos energéticos. Ou seja, sua utilização em bioenergética não oferece uma vantagem econômica ou ambiental. Em contrapartida, o acético, ácido de difícil metabolização, usado como fonte de carbono nos processos descritos neste estudo, pode auxiliar na bioremediação das águas residuárias urbanas (esgotos domésticos e industriais) contaminadas com elevadas concentrações destes, além de utilizar uma fonte orgânica de baixo custo, permitindo aumentar a relação custo/benefício em diversos processos industriais.

Diversos estudos de produção de biohidrogênio condições fermentativas têm sido reportados nos últimos anos (SELEMBO et al., 2009; WU et al., 2011). No entanto, o uso de efluentes de processos fermentativos com geração de Hidrogênio a partir de glicerol bruto é linha de pesquisa que não tem sido explorada (CHOOKAEW; O-THONGC; PRASERTSAN, 2015). No trabalho de Chookaew; O-Thongc; Prasertsan, a produção máxima alcançada usando pequenos reatores (32 mL de volume de trabalho) foi similar à alcançada em reatores de maior tamanho como os usados na presente pesquisa (500 mL de volume de trabalho). Assim, com 0,96 g DQO /L a partir de efluentes de Glicerol bruto, Chookaew; O-Thongc; Prasertsan. (2015) obteve 3,12 mmol H<sub>2</sub>/L quando comparado com 3,0 mmol H<sub>2</sub>/L em reatores alimentados com 1 g DQO/L do efluente de reatores fermentativos geradores de H<sub>2</sub> a partir de glicerol bruto usados neste estudo. As produções obtidas com o efluente citrícola (2,3 mmol H<sub>2</sub>/L com 0,5 g DQO /L) são também proporcionalmente próximas a estes resultados.

Tabela 9 - Comparação dos resultados obtidos com a literatura.

Inóculo	Substrato	Concentração	Produção Hidrogênio (mmol H <sub>2</sub> /L)	Rendimento Hidrogênio (mmol H <sub>2</sub> /g cel seca/h)	Rendimento Hidrogênio (mmol H <sub>2</sub> /L/h)	Remoção matéria orgânica (%)	SCE (%)	LCE (%)	Ref.
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	Málico	30 mM	-	0,46	-	-	-	-	Sasikala et al., 1991
<i>Rhodobacter capsulatus</i> DSM 1710	Acético + láctico	40 mM + 7,5mM	-	-	0,6	-	-	-	Androga et al., 2014
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> O.U. 001	Acético	2,5 g/L	-	1,72	-	-	-	-	Nath K et al., 2005
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> CQK 01	Glucose	9,9 g/L	-	3,82	-	-	-	-	Zhang C et al., 2010
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> W004	Acético	20 mM	7,4	-	0,44 *	40,6	51,6	-	Xiaomin et al., 2010
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> RV	Acético	1,2 g/L	0,55	-	-	-	4,1	-	Longliang et al., 2012
	Butírico	1,2 g/L	0,61	-	-	-	2,4	-	
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	Málico	30mM	-	-	0,9 *	-	-	1,1 (200W/m <sub>2</sub> )	İroglu et al., 1998
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> TN1	Efluente Glicerol	0,96 g DQO /L	3,12	-	-	41,81	-	0,72	Chookaew et al., 2015
<i>Rhodopseudomonas faecalis</i>	Acético	4,1 g/L	-	-	1,46 *	77	-	0,96 (150W/m <sub>2</sub> )	Xie et al., 2012
Cultivo fotoheterotrófico misto	Acético	30 mM	5,8	-	-	-	5,33	-	Ross, et al., 2013
	Butírico	15 mM	5,4	-	-	-	4,03	-	
consórcio fotoheterotrófico	Acético	1,7 g/L (28,3 mM)	4,9	0,3	0,2	92,5	6,4	0,52	Presente estudo
	Acético	3,5 g/L (58,28 mM)	3,5	3,9	1,3	58,5	2,2	4,85	
	Butírico	1 g/L (11,3 mM)	4,0	0,2	0,2	83,6	4,45	0,64	
	Efluente glicerol	1 g DQO /L	3,0	0,1	0,1	76,1	-	2,07	
	Efluente cítrica	0,5 g DQO /L	2,3	0,2	0,1	83,1	8,49	1,71	

(\*) Valores em ml de H<sub>2</sub>/L/h convertidos a mmol de H<sub>2</sub>/L/h.

A eficiência de conversão do substrato (SCE) e a eficiência de conversão da luz (LCE) são parâmetros que ajudam a entender melhor o potencial dos microrganismos na bioprodução do hidrogênio; apesar de que não serem frequentemente reportados na literatura. Mesmo assim, tais parâmetros permitem oferecer pontos de referência entre ensaios com diferentes concentrações e fontes de carbono (SCE), e entre ensaios com diferentes fontes de carbono e intensidades de energia (LCE). Para esse último parâmetro, a máxima LCE em fotobioreatores tem sido estimada menor do 10% (NAKADA et al, 1995). Assim, em condições experimentais, Miyake, J.; Kawamura, S. (1987) usando um microrganismo de referencia entre organismos fotoheterótrofos (*Rhodobacter* sp.), determinou a eficiência máxima destes microorganismos entre 6-8%. Nesse sentido, o desenho dos fotobioreatores tem sido um dos focos mais importantes em estudos similares com o objetivo de aumentar a LCE. O fotobioreator em batelada usado no presente estudo apresenta uma taxa de eficiência de iluminação (área iluminada/volume do reator) de  $22,6 \text{ m}^{-1}$ . Contrariamente, os fotobioreatores tubulares podem apresentar taxas de eficiência de iluminação próximas a  $100 \text{ m}^{-1}$  e tanques abertos  $10 \text{ m}^{-1}$  (CARVALHO et al., 2014). Quanto maior for a taxa de iluminação, menor será o efeito de auto-sombreado no leito do reator ao diminuir a trajetória de penetração da luz. A eficiência de conversão da luz por parte dos microrganismos fototróficos pode influenciar a disponibilidade de energia luminosa na massa líquida. Em geral, configurações em batelada não apresentam as melhores eficiências na iluminação do cultivo, mas permitem estabelecer um ponto de partida prático para conhecer a viabilidade de consórcios bacterianos em metabolizar ácidos orgânicos e produzir hidrogênio. As melhores eficiências de conversão da luz oferecidas pelo consórcio no presente estudo (4,85% com  $18,5 \text{ W/m}^2$ ) foram comparáveis a diversas pesquisas recentes da literatura. Xie et al. (2012) utilizaram cultivo puro de *Rhodopseudomonas faecalis* e obtiveram taxas de produção de hidrogênio próximas às relatadas no presente estudo com concentrações de acético mais elevadas ( $1,46 \text{ mmol H}_2/\text{L/h}$  com  $4,1 \text{ g ácido acético/L}$  quando comparado ao presente estudo que foi de  $1,3 \text{ mmol H}_2/\text{L/h}$  com adições de  $3,5 \text{ g ácido acético/L}$ ); porém, os autores (Xie et al., 2012) obtiveram LCE três vezes menor usando uma potência luminosa superior ao presente estudo (0,96% com  $150 \text{ W/m}^2$ ). Chookaew; O-Thong; Prasertsan (2015), usando cepa bacteriana, *Rhodopseudomonas palustris* TN1,

conseguiu produções de H<sub>2</sub> também similares trabalhando com potência luminosa de 3000 lux; porém a LCE obtida na citada pesquisa (0,72%) foi inferior às eficiências obtidas para os efluentes de reatores fermentativos geradores de H<sub>2</sub> alimentados com glicerol bruto e resíduos citrícolas usados neste trabalho. Além disso, foram utilizadas potências de 5500 lux e foram observados valores superiores de eficiências; tanto em densidade energética reduzida (1,37% para o efluente de glicerol bruto com  $8,8 \pm 1 \text{ W/m}^2$ ) quanto em densidade energética elevada (2,07% e 1,71% com  $18,5 \pm 1 \text{ W/m}^2$  para os efluentes de glicerol bruto e águas citrícolas, respectivamente). Eroglu et al. (1998) também apresentaram rendimentos e eficiências inferiores com uma potência dez vezes superior e concentrações de carbono similares, com fontes de carbono diferentes (0,9 mmol H<sub>2</sub>/L/h e LCE de 1,1% com 30 mM de Málico e  $200 \text{ W/m}^2$ ).

Em geral, podemos afirmar que a produção de H<sub>2</sub> aliado à elevação do pH durante o final dos ensaios indicaram o consumo dos ácidos orgânicos em estudo, como foi observado nos reatores anaeróbios alimentados e confirmados por cromatografia gasosa (Figura 17). Não entanto, uma baixa relação C/N no caso dos ensaios com menor carga de carbono, pode ter afetado ao sistema de bioprodução de hidrogênio, reativando a atividade nitrogenase e provocando a liberação de amônio no meio (CARVALHO et al., 2014). O amônio poderia ter agido aumentando o pH e limitando a atividade hidrogenase da enzima, com a conseguinte diminuição da produção de hidrogênio. Tal hipótese não tem sido confirmada, mas desde o presente trabalho se sugere a consideração deste ponto em próximas pesquisas relacionadas. Por sua vez, os resultados confirmaram uma remoção superior a 80% das concentrações iniciais impostas na maioria dos reatores, com uma media aproximada de 20 horas para as operações com acético e 80 horas para o butírico. Remoções máximas observadas foram de 92,5% e 89,5 % para reatores alimentados com 1,7g/L de acético e 1 g/L da mistura de ambos ácidos, respectivamente, ambos com a máxima intensidade luminosa usada neste estudo ( $18,5 \pm 1 \text{ W/m}^2$ ). Valores próximos a 90% de remoção são similares aos máximos reportados em estudos recentes da literatura com bactérias PNS (LAZARO; VARESCHE; SILVA, 2015; WU et al., 2010). No caso dos efluentes, em 40 horas de operação, as remoções máximas foram de 83,1% e 76,1% para 0,5 g DQO/L do efluente de reator fermentativo produtor de H<sub>2</sub> alimentado com águas residuárias

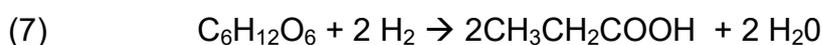
citrícolas e 1,0 g DQO/L do efluente de reator fermentativo produtor de H<sub>2</sub> alimentado com glicerol bruto, respectivamente, ambos com elevada intensidade luminosa (18,5±1 W/m<sup>2</sup>). Por outro lado, remoções mais reduzidas foram reportadas para cargas de carbono mais elevadas, tanto para os ácidos (58,55% com 3,5 g/L acético) quanto para o efluente de reator fermentativo produtor de H<sub>2</sub> alimentado com glicerol bruto (59,04% com 3,0 g DQO/L efluente glicerol). Novamente, ambos com condições de iluminação mais elevadas (18,5±1 W/m<sup>2</sup>). Foi observado também que a redução na intensidade luminosa sobre uma mesma carga de carbono, pode ocorrer diminuição do crescimento do consórcio, aliada à redução na remoção da matéria orgânica. Assim no efluente de reator fermentativo produtor de H<sub>2</sub> alimentado com glicerol bruto com concentração de 1 g DQO /L, em condições de iluminação elevada (18,5±1 W/m<sup>2</sup>) se observou um aumento da biomassa de 718 mg STV/L e 76,1% de remoção frente a mesma carga de carbono. Contrariamente, em condições de iluminação reduzida, foram verificado crescimentos de 432 mg STV/L e remoções de 68,1% respectivamente, para o mesmo efluente.

A grande vantagem da aplicação de reatores fotoheterotróficos é que permite trabalhar em sistemas integrados de geração de H<sub>2</sub> a partir de resíduos orgânicos. Na primeira etapa reatores operados por processos fermentativos serão gerados H<sub>2</sub>, ácidos orgânicos e alcoóis. Numa segunda etapa a matéria orgânica remanescente da fermentação representada por alcoóis e ácidos orgânicos poderá ser aplicada em reatores sob incidência luminosa onde ocorreria seu consumo e a geração de mais H<sub>2</sub>. Neste trabalho, os principais compostos caracterizados no efluente do reator fermentativo produtor de H<sub>2</sub> alimentado com glicerol bruto foram: etanol (2 Carbonos), metanol (1 Carbonos), ácido acético (2 Carbonos) e ácido propiônico (3 Carbonos). Entretanto, no efluente do reator fermentativo produtor de H<sub>2</sub> e alimentado com água residuária citrícola foram observados os ácidos acético e butírico. Na Tabela 10 se representam a porcentagem de remoção para cada um desses compostos nos ensaios realizados, junto com o valor ponderado médio da remoção.

Tabela 10 - Valores de remoção (%) para os ensaios com efluentes.

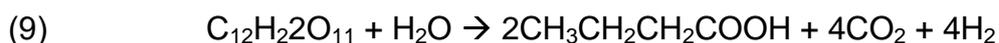
	Efluente Glicerol 1 g/L (8,8±1 W/m <sup>2</sup> )	Efluente Glicerol 1 g/L (18,5±1 W/m <sup>2</sup> )	Efluente Glicerol 2 g/L	Efluente Glicerol 3 g/L	Efluente Citrícola 0,5 g/L
<b>Metanol</b>	67,4	82,0	52,3	56,4	-
<b>Etanol</b>	59,7	80,5	73,4	65,4	-
<b>Propiônico</b>	100	100	100	42,0	-
<b>Acético</b>	71,2	71,1	70,4	61,7	70,9
<b>Butírico</b>	-	-	-	-	92,0
<b>Remoção Ponderada</b>	<b>68,1</b>	<b>76,1</b>	<b>72,5</b>	<b>59,04</b>	<b>83,1</b>

Etanol foi o principal produto gerado durante a primeira fase de geração de hidrogênio sob condições fermentativas. Tal álcool foi consumido pelo consórcio fotoheterotrófico quase na sua totalidade nas condições mais favoráveis de produção de hidrogênio (máximo de 80,5% de remoção para 1,0 g DQO/L com 18,5±1 W/m<sup>2</sup> de intensidade luminosa). A presença de metanol foi devido à sua adição nos processos de durante a fabricação do biodiesel que também foi consumido em grande proporção (máximo de 82,0% de remoção para 1,0 g DQO/L com 18,5±1 W/m<sup>2</sup> de intensidade luminosa). Importante ressaltar que metanol é considerado tóxico para consórcios de bactérias fermentativas. Nesse caso, metanol foi consumido pelo consórcio fotoheterotrófico. Ácido acético e propiônico foram os ácidos orgânicos gerados com remoções de 71,2 e 100% respectivamente. Segundo Levin; Pitt; Love (2014), produções elevadas de hidrogênio por processos fermentativos estão associadas à formação de produtos tais como, ácido acético e ácido butírico; enquanto que produções reduzidas de hidrogênio estão associadas à formação de ácido propiônico (equação 7) e produtos finais menos reduzidos como álcoois e ácido láctico que consomem hidrogênio para sua formação (MOSEY, 1983).



O trabalho com consórcios bacterianos que utilizam diversas rotas de metabolização da matéria orgânica gera uma ampla diversidade de produtos finais. Nesse sentido, a versatilidade das bactérias PNS foi verificada com consequente adaptação a substratos orgânicos diversos desde um ponto de vista bioquímico, cumprindo assim o papel de bioremediação previsto no estudo.

Resíduos de indústrias citrícolas são ricos em açúcares procedentes do processamento de frutas, como são glicose, sacarose e frutose. Na operação de reatores anaeróbios fermentativos produtores de H<sub>2</sub> e alimentados com tais resíduos rotas acidogênicas são favorecidas produzindo assim ácidos orgânicos voláteis. O efluente em estudo apresentou perfil cromatográfico, com dois ácidos em destaque: o acético e o butírico, conforme descrito anteriormente (Tabela 10). A geração de ácido acético (8) e ácido butírico (9) a partir de frutose, principal açúcar de frutas, nos processos de geração de hidrogênio, esta descrita a seguir (KHANAL et al. 2005) :



Apesar das eficiências de produção de hidrogênio no presente trabalho estarem similares às reportadas na literatura; resultados mais elevados poderiam ter sido observados. Provavelmente, uma das principais razões foi o estabelecimento de rotas metabólicas alternativas que permitiram reconduzir o fluxo de elétrons gerado para o consumo de ácidos orgânicos. As bactérias fotoheterotróficas podem apresentar capacidade de acumular metabólitos secundários como armazenamento intracelular de carbono e energia em resposta a condições adversas. Tais metabólitos podem ser acumulados em forma de biopolímeros, como por ex, Polihidroxibutirato (PHB) o primeiro a ser descoberto e o mais conhecido dentre eles (CHEN et al., 2000). Apesar da variedade de usos que apresentam industrialmente, as rotas metabólicas dos mencionados poliésteres e do biogás hidrogênio, competem pelo fluxo de elétrons e por ATP. O controle do pH próximo a 7,0 durante todo o bioprocessamento permitiu reconduzir uma grande parte da energia de redução para a formação de H<sub>2</sub> (KIM, MI-SUN et al., 2011). No entanto, configurações de

reatores em batelada como o usado no presente estudo, é limitado apenas ao controle do pH inicial. Por outro lado, ácido acético e ácido butírico podem ser metabolizados como intermediários finais da rota de síntese de biopolímeros, acumulando-se no interior da célula microbiana de maneira mais efetiva que outros ácidos; e ao mesmo tempo, limitar a sua disponibilidade para a fotoprodução do hidrogênio (KOKU et al., 2003). Além disso, *inputs* de carbono em bactérias PNS também são destinados numa proporção considerável a elevar a carga de pigmentos na célula (BASAK et al., 2014). Tais processos não foram quantificados no presente estudo, entretanto a ocorrência deles não poderá ser descartada, já que vários estudos com bactérias mutantes nas rotas de biopolímeros (KIM et al., 2012; WANGA et al., 2010) e na produção de pigmentos (VASILYEVA et al., 1999; KONDO; WAKAYAMA; MIYAKE, 2006) revelaram que a supressão de enzimas dessas rotas repercutem positivamente no rendimento do H<sub>2</sub> produzido.

Além disso, biomassa microbiana é gerada em bioprocessos fotoheterotróficos; a qual é fonte rica de macro e micronutrientes, que poderá ser reutilizada em diversos usos agro-industriais. Entre alguns dos destinos recentemente reportados, salienta-se o uso do lodo final procedente de biorreatores anaeróbios como um efetivo fertilizante orgânico em cultivos destinados a bioenergia (SELEIMAN et al., 2013). Como fertilizante, pode favorecer a disponibilidade de Nitrogênio e Fósforo, além de reduzir a captação dos metais pesados, aumentando a biomassa e o rendimento energético da colheita, favorecendo assim a sustentabilidade dos cultivos ao diminuir os *inputs* de energia, em comparação aos fertilizantes sintéticos.

## 4 CONCLUSÕES

As técnicas utilizadas para a purificação (diluições, plaqueamento e *roll-tubes*) da amostra proveniente do sistema de lodos ativados foram eficientes na obtenção do consórcio fotoheterotrófico nas condições estudadas. Bacilos Gram-negativos em aglomerados em formato de roseta observados permitiram corroborar as morfologias típicas de consórcios fotoheterotróficos presentes. A adaptação às condições operacionais impostas foi confirmada com o crescimento do consórcio fotoheterotrófico obtido. O meio de cultivo *Rhodospirillaceae* favoreceu, por sua vez, as condições necessárias para a geração de hidrogênio em valores entre 1,1 e 4,9 mmol H<sub>2</sub>/L para os ensaios realizados a partir de ácidos e efluentes. Métodos cromatográficos e monitoramentos do pH durante a operação permitiram corroborar o consumo ou remoção da matéria orgânica presente nos diversos ensaios realizados. Remoções elevadas e próximas a 80% das concentrações iniciais impostas foram observadas, durante 20 h, 80 h e 40h de operação nos reatores alimentados com acético, butírico e efluentes respectivamente. O consórcio fotoheterotrófico obtido foi capaz de consumir ácidos puros e efluentes de processos fermentativos prévios a partir de resíduos de glicerol bruto e águas residuárias citrícolas. Processos fotoheterotróficos podem ser aplicados com diferentes resíduos de fermentações industriais ou de tratamento de esgoto doméstico que contenham ácidos orgânicos aliando não somente a remoção da matéria orgânica, mas também o seu reaproveitamento bioenergético.

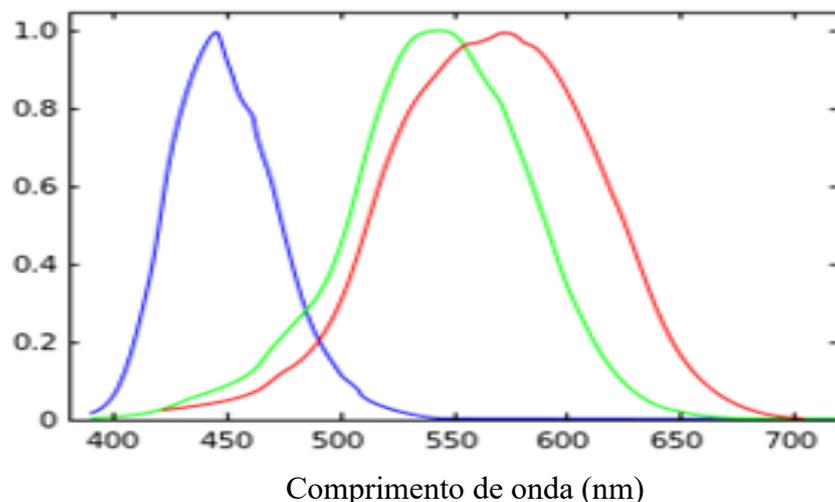
### 4.1 Considerações finais

Esse estudo sugere a compreensão da física dos processos luminosos como ponto de partida para entender as necessidades de cultivos mantidos sob incidência luminosa com o fim de trabalhar com configurações de reatores mais eficientes na bioprodução do hidrogênio.

Luxímetros comerciais são utilizados com frequência em trabalhos e pesquisas publicadas na área biotecnológica para quantificar a potência luminosa. Porém, apresentam configurações baseadas nas necessidades da fotografia profissional com *standards* próximos à curva CIE ou também conhecida como

espaço de cor RGB ( Figura 19 ), a qual foi determinada pela Comissão Internacional da Iluminação em 1931. Dita curva expressa o espectro das três cores principais (azul, verde e vermelho), cujo comprimento de absorção, não está em relação com as absorções medidas em cultivos fotoheterotróficos. Aliás, esses luxímetros comerciais apresentam filtros de atenuação da cor absorvida pelo o fotodiodo de silício da célula fotossensível do aparelho, para aproximar a absorção ao espectro visível do espaço RGB (comprimento entre 400 e 700 nm), diminuindo assim a sensibilidade a outros comprimentos de onda do espectro, como aqueles próximos ao infravermelho, onde residem as necessidades energéticas dos cultivos fotoheterótrofos.

Figura 19 - Espaço de cor RGB.



Porem, um medidor de potência de maior amplitude espectral seria mais adequado para conhecer a densidade eletrônica emitida pela fonte de energia que incide sobre a superfície do reator; a qual por sua vez, pode ser modificada com um alterador da potencia elétrica (variak). A partir da intensidade de energia luminosa conhecida para a faixa específica do espectro onde residam as necessidades energéticas do cultivo, poder-se-ia calcular a eficiência luminosa deste; e assim, otimizar a configuração dos reatores fotoheterotróficos avaliando o gasto energético em função da produção de hidrogênio. Futuros trabalhos com cultivos fotoheterotróficos deveriam considerar tais pontos da física dos bioprocessos para maximizar seus resultados.

## REFERÊNCIAS

- ALBARELLI, J. Q.; SANTOS, D. T.; HOLANDA, M. R. Energetic and economic evaluation of waste glycerol cogeneration in Brazil. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 28, n. 4, p. 691-698, 2011.
- AKKERMAN, I. et al. Photobiological hydrogen production: photochemical efficiency and bioreactor design. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 27, p. 1195-1208, 2002.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION; AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION; WATER ENVIRONMENT FEDERATION. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 21th ed. Washington, DC, 2005.
- ANDRADE, A. C. F. F. **Evacuação da produção de hidrogênio por bactérias purpuras não sulfurosas em reatores em batelada**. 2007. 89 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.
- ANDROGA, D. et al. Optimization of temperature and light intensity for improved photofermentative hydrogen production using *Rhodobacter capsulatus* DSM 1710. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 6, p. 2472-2480, 2014.
- BASAK, N.; DAS, D. The prospect of purple non-sulfur (PNS) photosynthetic bacteria for hydrogen production: the present state of the art. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 23, p. 31-42, 2007.
- BASAK, N. et al. Photofermentative molecular biohydrogen production by purple-non-sulfur (PNS) bacteria in various modes: the present progress and future perspective. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, p. 6853-6871, 2014.
- BLANKENSHIP, R. E. Early evolution of photosynthesis. **Plant Physiology**, v. 154, n. 2, p. 434-438, 2010.
- BOHNET, M. et al. (Ed.). **Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry**. 6th ed. c2003. Weinheim: Wiley-VCH.
- BOLTON, J. R. Solar photoproduction of hydrogen. **Solar Energy**, v. 57, p. 37-50, 1996.
- BRENTNER, L.; PECCIA, J.; ZIMMERMAN, J. B. Challenges in developing biohydrogen as a sustainable energy source: implications for a research agenda. **Environmental Science Technology**, v. 44, p. 2243-2254, 2010.
- BURGESS, B. K.; LOWE, D. J. Mechanism of molybdenum nitrogenase. **Chemical Reviews**, v. 96, p. 2983-3011, 1996.
- CARVALHO, J. C. et al. Microalgae bioreactors. In: BAJPAI, R. K.; PROKOP, A.; ZAPPI, M. E. (Ed.). **Algal biorefineries**. New York: Springer, 2013. v. 1, p. 83-126.

CHANDLER, D.; HSIN, J.; GUMBART, J. C. **Case study**: light harvesting complex 2. Disponível em: <<http://www.ks.uiuc.edu/Training/CaseStudies/pdfs/lh2.pdf>>. Acesso em: 15 fev. 2016.

CHEN, G. Q. Polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. **Biomaterials**, v. 26, p. 6565-6578, 2005.

CHEN, G. Q. et al. Chiral biopolyesters - polyhydroxyalkanoates synthesized by microorganisms. **Chinese Journal of Polymer Sciences**, v. 18, p. 389-396, 2000.

CHOOKAEW, T.; O-THONG, S.; PRASERTSAN, P. Biohydrogen production from crude glycerol by two stage of dark and photo fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 40, n. 24, p. 7433-7438, 2015.

CLAYTON, R. K.; SISTROM, W. R. **The photosynthetic bacteria**. New York: Plenum Press, 1978. 946 p.

COGDELL, R. J.; GALL, A.; KÖHLER, J. The architecture and function of the light-harvesting apparatus of purple bacteria: from single molecules to in vivo membranes. **Quarterly Review of Biophysic**, v. 39, p. 227-324, 2006.

COGDELL, R. J. et al. Rings, ellipses and horseshoes: how purple bacteria harvest solar energy. **Photosynthesis Research**, v. 81, p. 207-214, 2004.

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

DAS, D.; VEZIROGLU, T. N. Advances in biological hydrogen production processes. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, p. 6046-6057, 2008.

DASGUPTA, C. N. et al. Recent trends on the development of photobiological processes and photobioreactors for the improvement of hydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, p. 10218-10238, 2010.

DEISENHOFER, J.; MICHAEL, H. The crystal structure of the photosynthetic reaction center from *Rhodospseudomonas viridis*. In: BEYERLE, M. M. E. (Ed.). **Antennas and reaction centers of photosynthetic bacteria**: structure, interactions, and dynamics: proceedings of an international workshops. Feldafing, Bavaria, F. R G., Marck 23-25, 1985. Berlin: Springer-Verlag, c1985. p. 94-96.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.

EROGLU, I. et al. Continuous hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* O.U. 001. In: ZABORSKY, O. R. **Biohydrogen**. London: Plenum Press, 1998. Chap. 18, p. 143-151.

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

FASCETTI, E.; TODINI, O. *Rhodobacter sphaeroides* RV. cultivation and hydrogen production in one and two-stage chemostat. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 44, p. 300-305, 1995.

FOUNTOULAKIS, M. S.; MANIOS, T. Enhanced methane and hydrogen production from municipal solid waste and agroindustrial by-products co-digested with crude glycerol. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 5325-5329, 2009.

GALLON, J. R. Reconciling the incompatible: N<sub>2</sub> fixation and O<sub>2</sub>. **New Phytologist**, v. 122, p. 571-609, 1992.

GEST, H. et al. Photoproduction of molecular hydrogen by *Rhodospirillum rubrum*. **Science**, v. 109, p. 558-559, 1949.

HALLENBECK, P. C. et al. Recent advances in hydrogen production by photosynthetic bacteria. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 11, p. 10-90, 2015.

HAN, H. et al. Effect of carbon sources on the photobiological production of hydrogen using *Rhodobacter sphaeroides* RV. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, p. 12167-12174, 2012.

HAWKES, F. R. et al. Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: principles and progress. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 32, p. 171-184, 2007.

HERBERT, D.; PHIPPS, P. J.; STRANGE, R. E. Chemical analysis of microbial cells. **Methods in Enzymology**, v. 5B, p. 209-344, 1971.

HOLT, J. G et al. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9th ed. Baltimore: Williams&Wilkins, c1984.

HONDA, R.; FUKUSHI, K.; YAMAMOTO, K. Optimization of wastewater feeding for single-cell protein production in an anaerobic wastewater treatment process utilizing purple non-sulfur bacteria in mixed culture condition. **Journal of Biotechnology**, v. 125, p. 565-573, 2006.

JONES, M. R. The petite purple photosynthetic powerpack. **Biochemical Society**, v. 37, p. 400-407, 2009.

KARS, G.; GUNDUZ, U. Towards a super H<sub>2</sub> producer: improvements in photofermentative biohydrogen production by genetic manipulations. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, p. 6646-6656, 2010.

KARS, G. et al. Improved hydrogen production by uptake hydrogenase deficient mutant strain of *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001. **International Journal of Hydrogen Energy**, v 33, p. 3056-3060, 2008.

KHANAL, S. K. et al. Biological hydrogen production: effects and intermediate products. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 29 p. 1123-1131, 2004.

KIM, M.-S. et al. Enhancing photo-fermentative hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* KD131 and its PHB synthase deleted-mutant from acetate and butyrate. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, p. 13964-13971, 2011.

KIM, M. S. et al. Effect of carbon and nitrogen sources on photo-fermentative H<sub>2</sub> production associated with nitrogenase, uptake hydrogenase activity, and PHB accumulation in *Rhodobacter sphaeroides* KD131. **Bioresource Technology**, v. 116, p. 179-183, 2012.

KIVISTO, A.; SANTALA, V.; KARP, M. Hydrogen production from glycerol using halophilic fermentative bacteria. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 8671-8677, 2010.

KLAUS, S. From simplicity to complexity and back: function, architecture and mechanism of light harvesting systems in photosynthetic bacteria. In: FRAUENFELDER, H.; DEISENHOFER, J. (Ed.) **Simplicity and complexity in proteins and nucleic acids**. Berlin: Dahlem University Press, 1999. v. 4, p. 227-253.

KOCSISOVA, T.; CEVENGROS, J. G-phase from methyl ester production e splitting and refining. **Petroleum & Coal**, v. 48 p. 1-5, 2006.

KOKU, H. et al. Aspects of the metabolism of hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides*. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 27, p. 1315-1329, 2002.

KOKU, H. et al. Kinetics of biological hydrogen production by the photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* O.U. 001. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 28, p. 381-388, 2003.

KONDO, T.; WAKAYAMA, T.; MIYAKE, J. Efficient hydrogen production using a multi-layered photobioreactor and a photosynthetic bacterium mutant with reduced pigment. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 31, p. 1522-1526, 2006.

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

LAZARO, C. Z.; VARESCHE, M. B. A.; SILVA, E. L. Effect of inoculum concentration, pH, light intensity and lighting regime on hydrogen production by phototrophic microbial consortium. **Renewable Energy**, v. 75, p. 1-7, 2015.

LAZARO, C. Z. et al. Hydrogen production and consumption of organic acids by a phototrophic microbial consortium. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, p. 11691-11700, 2012a.

LAZARO, C. Z. et al. Hydrogen production in an upflow anaerobic packed bed reactor used to treat cheese whey. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, p. 54-62, 2012b.

- LEVIN, B.; PITT, L.; LOVE, M. Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 29, p. 173-185, 2004.
- LOSS, R. A. et al. Biohydrogen production by a mixed photoheterotrophic culture obtained from a Winogradsky column prepared from the sediment of a southern Brazilian lagoon. **Renew Energy**, v. 50, p. 648-654, 2013.
- MADIGAN, M. T. et al. **Biology of microorganisms**. 13th ed. New Jersey: Prentice Hall, 2013.
- MAHMOUD, F. S. et al. Biomass yield and quality of bioenergy crops grown with synthetic and organic fertilizers. **Biomass and Bioenergy**, v. 59, p. 477-485, 2013.
- MAINTINGUER, S. I.; HATANAKA R. R.; OLIVEIRA, J. E. de. Glycerol as a raw material for hydrogen production. In: BIERNAT, K. (Ed.) **Biofuels: status and perspective**. Rijeka: Intech, 2015. Chap. 32, p. 477-497.
- MAINTINGUER, S. I. et al. Fermentative hydrogen production by microbial consortium. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, p. 4309-4317, 2008.
- MAINTINGUER, S. I. et al. Fermentative hydrogen production with xylose by *Clostridium* and *Klebsiella* species in anaerobic batch reactors. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, p. 13508-13517, 2011.
- MAINTINGUER, S. I. et al. Bacterial diversity from environmental sample applied to bio-hydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 40, p. 3180-3190, 2015.
- MANGAYIL, R.; KARP, M.; SANTALA, V. Bioconversion of crude glycerol from biodiesel production to hydrogen. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, p. 12198-12204, 2012.
- MASEPOHL, B. et al. Regulation of nitrogen fixation in the phototrophic purple bacterium *Rhodobacter capsulatus*. **Lehrstuhl für Biologie der Mikroorganismen**, v. 4, n. 3, p. 243-248, 2002.
- McDERMOTT, G. et al. Crystal structure of an integral membrane light-harvesting complex from photosynthetic bacteria. **Nature**, v. 374, p. 517-521, 1995.
- McKINLAY, J. B. Systems biology of photobiological hydrogen production by purple non-sulfur bacteria. In: ZANNONI, D.; DE PHILIPPIS, R. (Ed). **Microbial bioenergy: hydrogen production**. New York: Springer, 2014. Chap. 7, p. 155-172. (Advances in photosynthesis and respiration, v. 38).
- McKINLAY, J. B.; HARWOOD, C. S. Photobiological production of hydrogen gas as a biofuel. **Current Opinion Biotechnology**, v. 21, p. 244-251, 2010.
- MIDILLI, A.; DINCER, I.; AY, M. Green energy strategies for sustainable development. **Energy Policy**, v. 34, p. 3623-3633, 2006.

MIYAKE, J.; KAWAMURA, S. Efficiency of light energy conversion to hydrogen by photosynthetic bacteria *Rhodobacter sphaeroides*. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 12, p. 147-149, 1987.

MIYAKE, J.; MIYAKE, M.; ASADA, Y. Biotechnological hydrogen production: research for efficient light energy conversion. **Journal of Biotechnology**, v. 70, p. 89-101, 1999.

MOSEY, F. E. Mathematical modelling of the anaerobic digestion process: regulatory mechanisms for the formation of short-chain volatile acids from glucose. **Water Science and Technology**, v. 15, p. 209-232, 1983.

MOTA, C. J. A.; SILVA, C. X. A. da; GONÇALVES, V. L. C. Gliceroquímica: novos produtos e processos a partir da glicerina de produção de biodiesel. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 639-648, 2009.

MÜLLER, A. et al. Relevance of individual Mo-box nucleotides to DNA binding by the related molybdenum-responsive regulators MopA and MopB in *Rhodobacter capsulatus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 307, n. 2, p. 191-200, 2010.

NAKADA, E. et al. Light penetration into cell suspensions of photosynthetic bacteria and relation to hydrogen production. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 80, p. 53-59, 1995.

NATH, K.; KUMAR, A.; DAS, D. Hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* strain O.U. 001 using spent media of *Enterobacter cloacae* strains DM11. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 68, n. 4, p. 533-541, 2005.

NEVES, M. F. et al. **O retrato da citricultura brasileira**. Ribeirão Preto: Markestrat. Disponível em: <[http://www.citrusbr.com.br/download/biblioteca/o\\_retrato\\_da\\_citricultura\\_brasileira\\_baixa.pdf](http://www.citrusbr.com.br/download/biblioteca/o_retrato_da_citricultura_brasileira_baixa.pdf)>. Acesso em: 1 mar. 2016.

ODA, Y. et al. Functional genomic analysis of three nitrogenase isozymes in the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. **Journal of Bacteriology**, v. 187, p. 7784-7794, 2005.

OHASHI, S. et al. An overview on chlorophylls and quinones in the photosystem I-type reaction centers. **Photosynthesis Research**, v. 104, p. 305-319, 2010.

ORTIGUEIRA, J. et al. Third generation biohydrogen production by *Clostridium butyricum* and adapted mixed cultures from *Scenedesmus obliquus* microalga biomass. **Fuel**, v. 153, p. 128-134, 2015.

PAPIZ, M. et al. The structure and thermal motion of the B800-850 LH2 complex from *Rhodospirillum rubrum* at 2.0 Å resolution and 100 K: new structural features and functionally relevant motions. **Journal of Molecular Biology**, v. 326, p. 1523-1538, 2003.

PETERS, J. W.; SZILAGYI, R. K. Exploring new frontiers of nitrogenase structure and mechanism. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 10, p. 101-108, 2006.

REZZADORI, K.; BENEDETTI, S. Proposições para valorização de resíduos do processamento do suco de laranja. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ADVANCES IN CLEANER PRODUCTION, 2nd, 2009, São Paulo. **Trabalhos...** [S.l.: s.n.], 2009. Disponível em:

<<http://www.advancesincleanerproduction.net/second/files/sessoes/6a/4/K.%20Rezzadori%20-%20Resumo%20Exp%20-%206A-4.pdf>>. Acesso em: 19 mar. 2016.

ROSSI, D. M. et al. Bioconversion of residual glycerol from biodiesel synthesis into 1,3-propanediol and ethanol by isolated bacteria from environmental consortia. **Renewable Energy**, v. 39, n. 1, p. 223-227, 2012.

ROSZAK, A. W. et al. Crystal structure of the RC-LH1 core complex from *Rhodospseudomonas palustris*. **Science**, v. 302, p. 1969-1972, 2003.

SABOURIN-PROVOST, G.; HALLENBECK, P. C. High yield conversion of a crude glycerol fraction from biodiesel production to hydrogen by photofermentation. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 3513-3517, 2009.

SASIKALA, K.; RAMANA, C. H. V.; RAGHUVVEER, P. R. Environmental regulation for optimal biomass yields and photo production of hydrogen by *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 16, p. 597-601, 1991.

SCHEURING, S.; STURGIS, J. N. Chromatic adaptation of photosynthetic membranes. **Science**, v. 309, p. 484-487, 2005.

SCHNEIDER, K. et al. Comparative biochemical characterization of the iron-only nitrogenase and the molybdenum nitrogenase from *Rhodobacter capsulatus*. **European Journal of Biochemistry**, v. 244, p. 789-800, 1997.

SEEFELDT, L. C.; HOFFMAN, B. M.; DEAN, D. R. Electron transfer in nitrogenase catalysis. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 16, p. 19-25, 2012.

SELEMBO P. A, et al. Enhanced hydrogen and 1,3 propanediol production from glycerol by fermentation using mixed cultures. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 104, p. 1098-1106, 2009.

SUNDSTRÖM, V. Femtobiology. **Annual Review of Physical Chemistry**, v. 59, p. 53-77, 2008.

SUNDSTRÖM, V.; PULLERITS, T. Photosynthetic light-harvesting: reconciling dynamics and structure of purple bacterial LH2 reveals function of photosynthetic unit. **Journal of Biophysical Chemistry**, v. 103, p. 2327-2346, 1999.

SUZUKI, Y. On hydrogen as fuel gas. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 7, p. 227-230, 1982.

THORNELEY, R. N. F. et al. Kinetics and mechanism of the nitrogenase enzyme system In: SPIRO T. G. (Ed.). **Molybdenum enzymes**. New York: John Wiley, 1985. p. 221-284.

VAN NIEL, C. B. The culture, general physiology, morphology, and classification of the non-sulfur purple and brown bacteria. **Bacteriology Reviews**, v. 8, p. 1-118, 1944.

VASILYEVA, L. G. et al. Enhanced hydrogen production by a mutant of *Rhodobacter sphaeroides* having an altered light-harvesting system. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 87, p. 619-624, 1999.

WANG, D. et al. Elimination of Rubisco alters the regulation of nitrogenase activity and increases hydrogen production in *Rhodospirillum rubrum*. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, p. 7377-7385, 2010.

WU, K. J. et al. Converting glycerol into hydrogen, ethanol, and diols with a *Klebsiella* sp. HE1 strain via anaerobic fermentation. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 42, p. 20- 25, 2011.

WU, X. et al. A comparison of hydrogen production among three photosynthetic bacterial strains. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, p. 7194-7199, 2010.

XIE, G. J. et al. Enhanced photo-H<sub>2</sub> production by *Rhodopseudomonas faecalis* RLD-53 immobilization on activated carbon fibers. **Biomass Bioenergy**, v. 44, p. 122-129, 2012.

ZHANG, C. et al. Performance of a groove-type photobioreactor for hydrogen production by immobilized photosynthetic bacteria. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, p. 5284-5292, 2010.

ZHANG, Y. et al. Regulation of nitrogen fixation by multiple PII homologs in the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. **Symbiosis**, v. 35, p. 85-100, 2003.