

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 04/04/2018.

FRANCISCO ABRAHAM RÍOS ALCARAZ

**OBTENÇÃO DE CONSÓRCIO DE BACTÉRIAS FOTOHETEROTRÓFICAS
GERADORAS DE H₂ 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	Ríos Alcaraz, Francisco Abraham Obtenção de consórcio de bactérias fotoheterotróficas geradoras de H₂ visando sua produção em reator anaeróbio em batelada / Francisco Abraham Ríos Alcaraz. – Araraquara : [s.n], 2015 80 f. : il. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química Orientador: Sandra Imaculada Maintiguer 1. Hidrogênio. 2. Biocombustíveis. 3. Bactérias fotossintéticas. 4. Águas residuais - purificação. 5. Bioengenharia. I. Título
-------	---

Elaboração: Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química de Araraquara
Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

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

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.

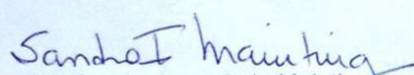
- 1º Workshop Latinoamericano do Biohidrogênio, no período de 28 a 30 de Julho de 2014, São Carlos/ SP Brasil.
- II workshop de Bioenergía. - IPBEN - Instituto de Pesquisa em Bioenergia. UNESP Rio Claro/ SP Brasil, 4 -5 de Dezembro de 2014. Apresentação do poster: *Obtenção de consórcio fotoheterotrófico gerador de H₂ 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 H₂.*
- 28º Congresso Brasileiro de Microbiologia. Florianópolis, 18-22 de Outubro de 2015. Apresentação do poster: *Hydrogen generation by photoheterotrophic bacterial consortia with organic wastes.*

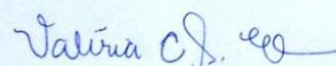
FRANCISCO ABRAHAM RÍOS ALCARAZ

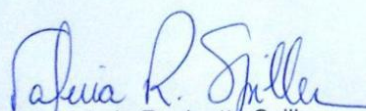
Dissertação apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual
Paulista, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia.

Araraquara, 04 de abril de 2016.

BANCA EXAMINADORA


Profª. Drª. Sandra Imaculada Maintinguer (Orientadora)
Instituto de Pesquisa em Bioenergia / UNESP / Rio Claro - SP


Profª. Drª. Valéria de Carvalho Santos Ebinuma
Faculdade de Ciências Farmacêuticas / UNESP / Araraquara - SP


Profª. Drª. 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 de 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 N₂ (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/m²) 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/m² 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 H₂/L, eficiência de remoção de 92.5, 83.6, 76.1, 83.1%, e crescimento celular (ABS₆₆₀) 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 H₂. 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 N₂ (100%), pH 7.0±1, at 37°C. Effects with two potencies of light intensity (8.8±1 and 18.5±1 W/m²) 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/m² 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 H₂ L⁻¹ with a removal efficiency of 92.5, 83.6, 76.1, 83.1% respectively, was obtained. High cellular growth (ABS₆₆₀) 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 H₂-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 ₂ durante operação dos reatores anaeróbios fotoheterotróficos	54
Figura 18 -	Consumo de carbono nos diferentes ensaios realizados em reatores fototróficos geradores de H ₂	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 ₁₂	37
Tabela 5 -	Composição do meio de cultivo para produção de H ₂	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
Bchl _s	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>Photosistem II</i>) FOTOSISTEMA II
PHB	Poli-hidroxibutirato
RC	Centro de Reação
R _m	Taxas de produção de hidrogênio
STV	Sólidos Totais Voláteis
SCE	Eficiência de conversão do substrato
λ	Fase Lag

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Revisão bibliográfica	16
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 ₂ por bactérias PNS	29
1.1.7	Glicerol	30
1.1.8	Resíduos citrícolas	32
2.	PARTE EXPERIMENTAL	33
2.1	Objetivos	33
2.2	Fluxograma experimental	33
2.3	Fonte de inóculos	35
2.4	Enriquecimento celular	35
2.4.1	Obtenção de consórcios fotoheterotróficos	35
2.4.2	Enriquecimento celular de bactérias PNS	36
2.5	Técnicas de isolamento das PNS	38
2.6	Ensaio de produção de hidrogênio	41
2.6.1	Montagem dos reatores anaeróbios em batelada	41
2.7	Análises físico-químicas	43
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 ₂ 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

3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.	CONCLUSÕES	70
4.1	Considerações finais	70
	REFERÊNCIAS	72

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°C que podem favorecer a diversidade microbiana (MAINTINGUER et al., 2015).

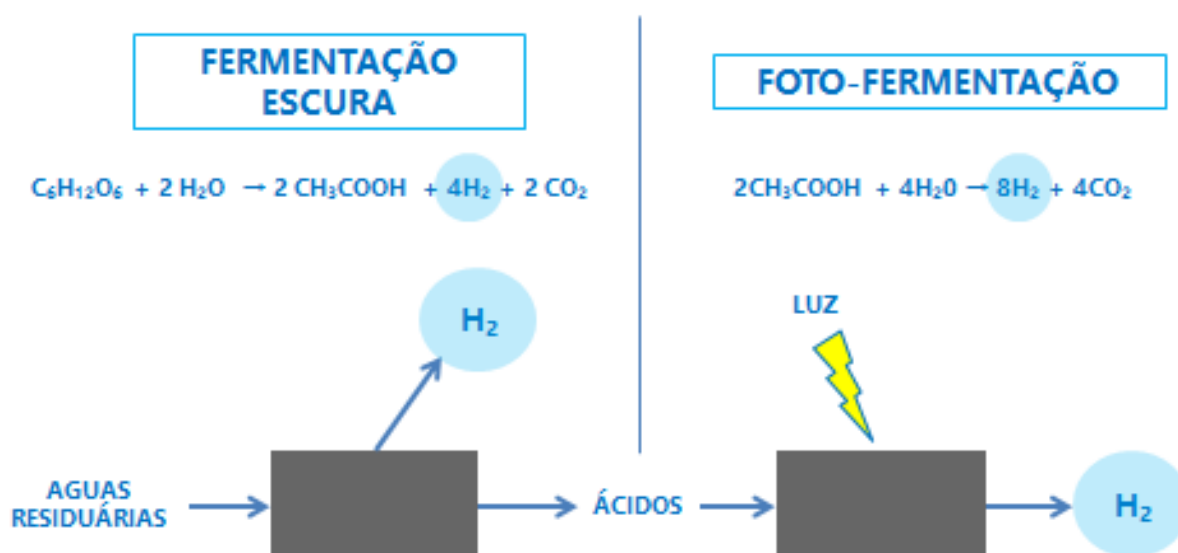
O biohidrogênio pode ser produzido através de três vias biológicas: a fermentação, a fotofermentação e a biofotólise. A produção biológica de hidrogênio pode ser operada a temperatura e pressão atmosférica ambiente, apresentado um menor consumo de energia em comparação com os processos termoquímicos 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.



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 H₂/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.

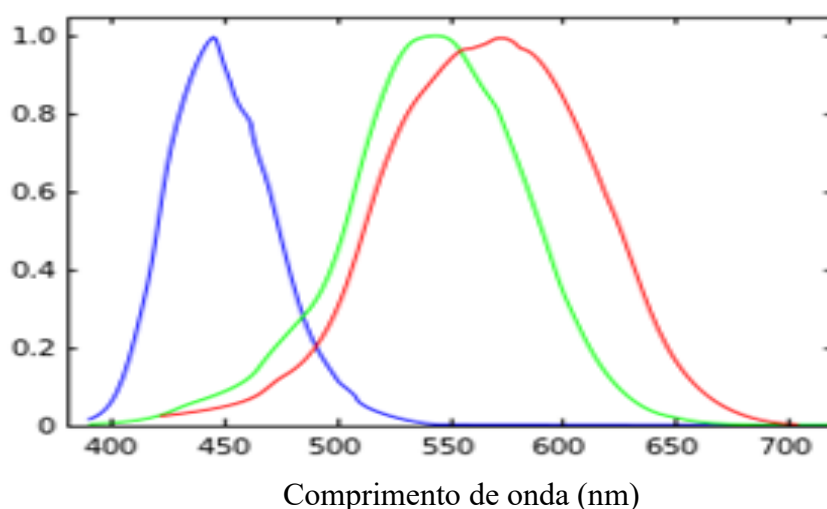
4.1 Considerações finais

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 *Rhodopseudomonas 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: N₂ fixation and O₂. **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 H₂ 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 H₂ 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>. 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 *Rps. acidophila* 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-H₂ 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.