



**UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE
CIÊNCIAS AMBIENTAIS**

**PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO POR CULTURAS ISOLADAS DE *Bacillus cereus*,
Enterococcus faecalis e *Enterobacter aerogenes* A PARTIR DE VINHAÇA DE
CANA-DE-AÇÚCAR**

ANA SILVIA EDER

ORIENTADORA: Profa. Dra. SUELEN PAESI

CAXIAS DO SUL, 2018

ANA SILVIA EDER

**PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO POR CULTURAS ISOLADAS DE *Bacillus cereus*,
Enterococcus faecalis e *Enterobacter aerogenes* A PARTIR DE VINHAÇA DE
CANA-DE-AÇÚCAR**

Dissertação apresentada no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciências Ambientais da Universidade de Caxias do Sul, como requisito parcial para a obtenção de grau de mestre em Engenharia e Ciências Ambientais, orientada pela Professora Dra. Suelen Paesi.

CAXIAS DO SUL, 2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade de Caxias do Sul
UCS - BICE - Processamento Técnico

E22p Eder, Ana Silvia, 1965-
Produção de hidrogênio por culturas isoladas de *Bacillus cereus*,
Enterococcus faecalis e *Enterobacter aerogenes* a partir de vinhaça de
cana-de-açúcar / Ana Silvia Eder. – 2018.
68 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado) – Universidade de Caxias do Sul, Programa de
Pós-Graduação em Engenharia e Ciências Ambientais, 2018.
Orientação: Profa. Dra. Suelen Osmarina Paesi.

1. Hidrogênio. 2. Cana-de-açúcar. 3. Álcool. 4. Vinhaça. I. Título. II.
Paesí, Suelen Osmarina, orient.

CDU 2. ed.: 546.11

Índice para o catálogo sistemático:

1. Hidrogênio	546.11
2. Cana-de-açúcar	664.111
3. Álcool	661.722
4. Vinhaça	663.551.6

Catalogação na fonte elaborada pela bibliotecária
Paula Fernanda Fedatto Leal – CRB 10/2291

"PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO POR CULTURAS ISOLADAS DE DE BACILLUS CEREUS, ENTEROCOCCUS FAECALIS E ENTEROBACTER AEROGENES A PARTIR DE VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR."

Ana Silvia Eder

Dissertação de Mestrado submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciências Ambientais da Universidade de Caxias do Sul, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciências Ambientais, Área de Concentração: Gestão e Tecnologia Ambiental.

Caxias do Sul, 09 de abril de 2018.

Banca Examinadora:

Dra. Suelen Osmarina Paesi
Orientadora
Universidade de Caxias do Sul

Dr. André Felipe Streck
Universidade de Caxias do Sul

Dr. Lademir Luiz Beal
Universidade de Caxias do Sul

Dra. Marli Camassola
Universidade de Caxias do Sul

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família, meu marido, pelo amor e companheirismo, a meu filho pelo carinho e a ambos pelo entendimento, força nos momentos de cansaço, apoio, incentivo e presença motivadora.

Agradeço ao meu pai, Silvio Eder, *in memoriam*, e a minha mãe, Glacy Eder pelo caminho de estudo, educação e valores que me foi ensinado.

Agradeço a minha orientadora Suelen Paesi e colaboradora Flaviane Eva Magrini, pela paciência, dedicação e amizade durante esta caminhada de pesquisa.

Aos meus colegas do Laboratório de Diagnóstico Molecular, especialmente às minhas bolsistas, Júlia Tonioli da Silva e Andressa Spengler, que sempre estiveram ao meu lado no trabalho de pesquisa e execução, e à Liliane Poletto pelo auxílio sempre que precisei.

Aos demais colegas, meu muito obrigado.

A Deus, obrigada.

RESUMO

A vinhaça é um resíduo da destilação de etanol de cana-de-açúcar que é gerada em grandes quantidades pela indústria sucroalcooleira. Possui altas fontes de carbono podendo ser reaproveitada como substrato para a produção biológica de hidrogênio e outros produtos de valor agregado. O hidrogênio é uma forma de energia limpa e renovável e pode ser obtido por processos fermentativos por meio microrganismos em culturas puras ou associados em co-culturas obtidos de fontes naturais de inóculo. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de hidrogênio e ácidos graxos voláteis por linhagens isoladas, em co-culturas de *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus* e *Enterobacter aerogenes*, utilizando vinhaça como substrato e com o uso da técnica de bioaugmentação do consórcio. Os microrganismos foram isolados de lodo granular anaeróbio produtor de hidrogênio. Os experimentos foram realizados em frascos com volume de 60 mL, contendo vinhaça nas concentrações de 30, 50, 70 e 100% e ensaios contendo glicose para as culturas puras e a co-cultura *B. cereus* + *E. aerogenes* + *E. faecalis*. Os microrganismos foram inoculados isoladamente, em co-culturas e comparados com o consórcio microbiano de origem. As culturas foram mantidas em agitação orbital em *shaker* a 37°C por 48 h. Foram avaliadas amostras gasosas do *headspace* e da fração líquida. As linhagens puras de *B. cereus*, *E. faecalis* e *E. aerogenes*, tiveram a maior produção de hidrogênio em 100% de vinhaça, com 85,41 mmolH₂. L⁻¹, 79,0 mmolH₂. L⁻¹ e 41,95 mmolH₂. L⁻¹, respectivamente. O consórcio, também na maior concentração de vinhaça, teve uma produção de 54,16 mmolH₂. L⁻¹. O sistema de co-cultura *E. faecalis* + *E. aerogenes* produziu mais hidrogênio (65 mmolH₂. L⁻¹) do que o consórcio. O consórcio microbiano produziu mais hidrogênio do que quando recebeu a bioaugmentação das linhagens isoladas de *B. cereus*, *E. faecalis* e *E. aerogenes*. Os ácidos acético e butírico foram produzidos em maior quantidade e o ácido propiônico foi o mais consumido em todos os experimentos, indicando uma rota favorável escolhida pelos microrganismos para a produção de hidrogênio. Os resultados obtidos indicam que houve a bioconversão da vinhaça em energia limpa e ácidos graxos voláteis, proporcionando uma destinação sustentável a este resíduo agroindustrial potencialmente poluente.

Palavras chave: Vinhaça. Hidrogênio. Co-culturas. Linhagens puras. Bioaumentação.

ABSTRACT

Vinasse is a residue from the distillation of ethanol from sugarcane that is generated in large quantities by the sugar and ethanol industry. It has high carbon sources and can be reused as a substrate for the biological production of hydrogen and other value added products. Hydrogen is a form of clean and renewable energy and can be obtained by fermentative processes by means of microorganisms in pure cultures or associated in co-cultures obtained from natural sources of inoculum. Thus, the objective of this work was to evaluate the production of hydrogen and volatile fatty acids by isolated strains in *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus* and *Enterobacter aerogenes* co-cultures, using vinasse as a substrate and using the bioaugmentation technique of the consortium. The microorganisms were isolated from hydrogen producing anaerobic granular sludge. The experiments were carried out in flasks with a volume of 60 mL, containing vinasse at concentrations of 30, 50, 70 and 100% and glucose-containing assays for the pure cultures and the co-culture of *B. cereus* + *E. aerogenes* + *E. faecalis*. The microorganisms were inoculated in isolation, in co-cultures and compared with the microbial consortium of origin. The cultures were maintained in shaker orbital shaking at 37 ° C for 48 h. Gaseous samples of the headspace and the liquid fraction were evaluated. The pure strains of *B. cereus*, *E. faecalis* and *E. aerogenes*, had the highest production of hydrogen in 100% vinasse, with 85.41 mmolH₂. L⁻¹, 79.0 mmol H₂. L⁻¹ and 41.95 mmol H₂. L⁻¹, respectively. The consortium, also in the largest concentration of vinasse, had a production of 54.16 mmolH₂. L⁻¹. The co-culture system *E. faecalis* + *E. aerogenes* produced more hydrogen (65 mmolH₂. L⁻¹) than the consortium. The microbial consortium produced more hydrogen than when it received the bioaugmentation of the isolated strains of *B. cereus*, *E. faecalis* and *E. aerogenes*. The acetic and butyric acids were produced in greater quantity and propionic acid was the most consumed in all the experiments, indicating a favorable route chosen by the microorganisms for the production of hydrogen. The results indicate that there was the bioconversion of vinasse in clean energy and volatile fatty acids, providing a sustainable destination for this potentially polluting agroindustrial residue.

Key words: Vinhaça. Hydrogen. Co-cultures. Purebred lines. Bioaugmentation.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AGV	Ácidos Graxos Voláteis
DQO	Demanda Química de Oxigênio
DBO ₅	Demanda Bioquímica de Oxigênio
D.O.	Densidade ótica
SSV	Sólidos Voláteis Suspensos
<i>g</i>	Força gravitacional

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Meio de cultivo PYG (Peptona, extrato de levedura, glicose para isolamento dos microrganismos).....	30
Tabela 2 - Características da vinhaça de cana-de-açúcar utilizada nos experimentos para produção de H ₂	31

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Etapas de processamento da cana-de-açúcar a para obtenção do etanol e açúcar	18
Figura 2 - Rotas metabólicas de bactérias acidogênicas.....	21
Figura 3 - Representação esquemática do processo de digestão anaeróbica.....	22

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.2	OBJETIVOS	14
1.2.1	Objetivo geral	14
1.2.2	Objetivos específicos	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	PANORAMA ENERGÉTICO	15
2.2	SUBSTRATOS	16
2.2.1	Carboidratos puros	16
2.2.2	Vinhaça	17
2.3	OBTENÇÃO BIOLÓGICA DO HIDROGÊNIO	19
2.4	BACTÉRIAS PRODUTORAS DE HIDROGÊNIO	24
2.4.1	Gênero <i>Enterococcus</i>	27
2.4.2	Gênero <i>Bacillus</i>	28
2.4.2	Gênero <i>Enterobacter</i>	28
3	METODOLOGIA	30
3.1	LINHAGENS BACTERIANAS	30
3.2	ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS	30
3.3	VINHAÇA	31
3.4	ENSAIOS PARA PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO	31
3.5	ANÁLISES QUÍMICAS	32
3.6	ANÁLISE DOS DADOS	33
4	RESULTADOS	34

4.1	CAPÍTULO 1	34
4.2	CAPÍTULO 2	34
5	CONCLUSÕES	59
6	RECOMENDAÇÕES	60
7	REFERÊNCIAS	61

1 INTRODUÇÃO

O aumento das necessidades energéticas mundiais e a diminuição das reservas de combustíveis fósseis, aliados aos problemas ambientais relacionados ao uso destes combustíveis, definem o novo panorama para o século XXI, indicando que novas políticas referentes a fontes de energia sejam adotadas (HALLENBECK; GHOSH, 2009).

Buscando satisfazer esta demanda energética, o hidrogênio surge como uma forma de energia limpa e renovável, pois além de possuir uma grande eficiência energética, produz apenas água como produto da sua combustão, não gerando gases causadores do efeito estufa. O hidrogênio possui um rendimento energético 2,75 vezes maior do que combustíveis derivados de petróleo (gasolina e diesel) e um poder calorífico inferior 122 kJg^{-1} a 25° C e 1 atm, sendo 50% mais eficiente do que a gasolina em automóveis (LIU, 2008; KADPAN, I.K. e KARGI, F. 2006; LAY et al., 1999).

As vantagens da utilização deste gás como fonte de energia estão relacionadas com diversificação da produção de energia e segurança no fornecimento, diminuição da poluição urbana e, diminuição dos gases do efeito estufa (ADAMSON, 2004). Por outro lado, sistemas de armazenamentos de hidrogênio, em larga escala ainda são um desafio a ser superado em um futuro próximo (ESTEVÃO, 2008).

A obtenção de hidrogênio pode ser feita por vários processos, entre eles, destacam-se os processos fermentativos, utilizando diversos tipos de substratos orgânicos e resíduos industriais, tais como sacarose, xilose, amido, celulose, glicerina, vinhaça, entre outros, reduzindo a quantidade de descarte destes no meio ambiente.

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de etanol a partir da cana-de-açúcar; sendo que a produção de etanol na safra de 2017/18 está projetada em 26,45 bilhões de litros. A produção deste combustível gera uma alta quantidade de resíduos. O principal é a vinhaça produzida na proporção de 15 litros por litro de álcool (CHRISTOFOLETTI et al., 2013).

A vinhaça possui elevada Demanda Química de Oxigênio (DQO), entre 17 e 50 g. L^{-1} , e grandes concentrações de fósforo e potássio sendo este resíduo normalmente utilizado como fertilizante no próprio cultivo da cana-de-açúcar

(NOGUEIRA et al., 2015). Entretanto, já foi constatado que seu uso na fertirrigação provoca acidificação do solo, causando a redução da produtividade e infiltração nos lençóis freáticos (CORAZZA, 2000), ocasionando diversos problemas ambientais. Devido ao grande volume de vinhaça produzido a cada safra, impõe-se a necessidade de que sejam desenvolvidas alternativas para este material.

Uma alternativa para a utilização da vinhaça é a digestão anaeróbia, onde este substrato pode ser convertido por diversos tipos de microrganismos. Vários microrganismos podem atuar isoladamente ou em associação, na produção de hidrogênio e outros co-produtos. Entre os principais microrganismos produtores de hidrogênio descritos na literatura, encontramos os gêneros *Clostridium*, *Klebsiella*, *Enterobacter* e diversas espécies de *Bacillus* (KAWAGOSHI, 2005). Estes microrganismos podem ser obtidos na natureza em consórcios microbianos de fontes naturais de inóculo, como por exemplo: amostras de solo, lodo de digestão anaeróbia, águas residuais de tratamento de esgoto, aterro sanitário doméstico, entre outros (GRANATO, 2003).

Já é bem conhecida a produção de hidrogênio por consórcios microbianos, mas pouco se sabe sobre quais os microrganismos presentes na comunidade microbiana e suas funções no processo anaeróbio. Culturas puras ou co-culturas de microrganismos também são promissoras na produção de hidrogênio despertando interesse na pesquisa. Sistemas de bioaugmentação já foram descritas para incrementar a produção de hidrogênio, empregando culturas que misturam microrganismos anaeróbios estritos e facultativos (QIAN et al., 2011; NZILA, 2017) ou utilizando somente microrganismos anaeróbios estritos (GENG et al., 2010).

Nos processos fermentativos, além da produção de hidrogênio, também são produzidos simultaneamente diversos compostos de interesse econômico. Entre os principais coprodutos derivados das rotas metabólicas microbianas estão os ácidos acético e butírico (LAZZARO et al., 2015), outros ácidos também são formados de acordo com a linhagem microbiana, substrato e tipo de processo fermentativo e podem se tornar valiosos substratos para produtos finais mais elaborados (FU; HOTZAPPLE, 2010).

Dessa forma, este estudo comparou a produção de hidrogênio e ácidos graxos voláteis de consórcio microbiano, culturas bacterianas, co-culturas e na bioaugmentação utilizando vinhaça como fonte de carbono.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Avaliar a produção de hidrogênio e ácidos graxos voláteis de culturas puras de *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus* e *Enterobacter aerogenes*, associadas em co-culturas e com o uso da bioaugmentação destes microrganismos no consórcio microbiano utilizando vinhaça e glicose como substrato.

1.2.2 Objetivos específicos

- a) Investigar a capacidade de produção de hidrogênio por *B. cereus*, *E. faecalis* e *E. aerogenes* em culturas puras e em co-cultura utilizando glicose como substrato.
- b) Analisar o consumo de glicose nas culturas puras, co-culturas e do consórcio;
- c) Investigar a capacidade de produção de hidrogênio por *B. cereus*, *E. faecalis* e *E. aerogenes* utilizando diferentes concentrações de vinhaça como substrato.
- d) Comparar a produção de hidrogênio por *E. faecalis*, *B. cereus* e *E. aerogenes* com o consórcio microbiano de onde foram obtidas.
- e) Avaliar a produção de hidrogênio por *B. cereus*, *E. faecalis* e *E. aerogenes* associados em co-culturas.
- f) Comparar a produção de hidrogênio das culturas puras e co-culturas com a bioaugmentação destes microrganismos no consórcio.
- g) Analisar o consumo de carboidratos totais da vinhaça pelos microrganismos isolados, em co-culturas, do consórcio microbiano e nos ensaios de bioaugmentação.
- h) Analisar a produção de ácidos graxos voláteis (AGVs) por *B. cereus*, *E. faecalis*, *E. aerogenes* isoladamente, em co-culturas, e com o uso da técnica de bioaugmentação no consórcio microbiano nos ensaios de produção de hidrogênio, usando vinhaça como substrato.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PANORAMA ENERGÉTICO

No mundo, há uma dependência energética dos combustíveis fósseis, fontes não renováveis de energia, que têm causado alterações climáticas e poluição atmosférica pela emissão de CO₂, CH₄, fuligem, cinzas, gotículas de alcatrão e outros componentes orgânicos (DAS; VEZIROGLU, 2001).

Devido aos problemas ambientais provocados pela queima de combustíveis fósseis, há uma necessidade mundial da redução desta dependência e a implementação de metas e políticas energéticas utilizando energias alternativas e renováveis (LAVADO, 2009).

Neste contexto, o hidrogênio é considerado um combustível promissor para o futuro por não gerar resíduos poluentes ou formadores de gases causadores de efeito estufa, por ser uma energia limpa e renovável e que pode ser usada para consumo doméstico e industrial.

A maior percentagem de produção de H₂ ocorre por refinação de hidrocarbonetos. Cerca de 40 % tem origem no gás natural, 30 % nos óleos pesados ou nafta e 18% no carvão. Apenas 5 % tem origem na eletrólise da água (DAS; VEZIROGLU, 2008; SINHA; PANDLEY, 2011).

A produção biológica do hidrogênio contribui com apenas 1% no percentual de produção de H₂. No entanto, espera-se que esta porcentagem cresça exponencialmente com o desenvolvimento de novas técnicas e processos (NEVES, 2009). O desenvolvimento de tecnologias para produção biológica de hidrogênio a partir de biomassa vegetal, lignocelulósicos ou resíduos animais consiste em uma área que vem ganhando destaque pelo reaproveitamento de materiais residuais, diminuindo assim a quantidade de subprodutos gerados nas indústrias (SÁ, 2014). E reduzir o potencial dano ambiental desses resíduos, agregando a produção de energia a um processo de produção já existente, visando um alto grau de sustentabilidade (KUMAR et al., 2016).

Embora custos para a produção e armazenamento de hidrogênio possam apresentar barreiras, o seu uso como fonte de energia deve ser considerado. Dentre os sistemas utilizados para sua produção, a fermentação anaeróbia tem se destacado, devido principalmente à maior produção deste gás quando comparada

aos outros processos biológicos e a possibilidade de utilização de diferentes materiais residuais como substrato (MATHEWS; WANG, 2009; LEVIN, PITT; LOVE, 2004). Além disso, não depende de luz, sendo, portanto, um processo contínuo o que economicamente apresenta vantagens em relação a velocidade de produção e as condições operacionais simples.

A digestão anaeróbia é uma das alternativas de tratamento biológico mais utilizada para resíduos líquidos. As condições climáticas, os baixos custos de implantação e operação, o baixo consumo de energia e a baixa geração de lodo biológico além da tolerância a altas cargas orgânicas, são fatores que confirmam seu uso preferencial, tornando-a bastante conhecida e aplicada (SHIDA, 2008).

O Brasil utiliza em 2016, 64,5% de energia hidráulica, 9,4% de biomassa e 6,7% de energia eólica em sua matriz energética destacando-se no uso de energias renováveis, conforme o Ministério de Minas e Energia (MME, 2017), com a tendência ao aumento do uso de etanol combustível, esta matriz deve se intensificar.

2.2 SUBSTRATOS

Substratos orgânicos ricos em carboidrato, proteínas e gorduras podem servir para a produção de hidrogênio (SHOW et al., 2011). O tipo de substrato determina o crescimento e a rota metabólica utilizada pelo microrganismo, assim como as necessidades nutricionais, temperatura e pH (WANG; WAN, 2009). Carboidratos além de oferecerem os maiores rendimentos são os favoritos das bactérias quando se deseja a produção de hidrogênio (BARTACEK et al., 2007).

2.2.1 Carboidratos puros

Açúcares simples como glicose, sacarose e xilose são facilmente degradados e podem ser usados como substrato modelo para a produção de hidrogênio. Celulose e amido demoram um tempo maior para serem metabolizados pelos microrganismos aumentando o tempo do processo fermentativo (SHOW et al., 2011). Carboidratos puros são matérias primas onerosas para a produção em escala industrial.

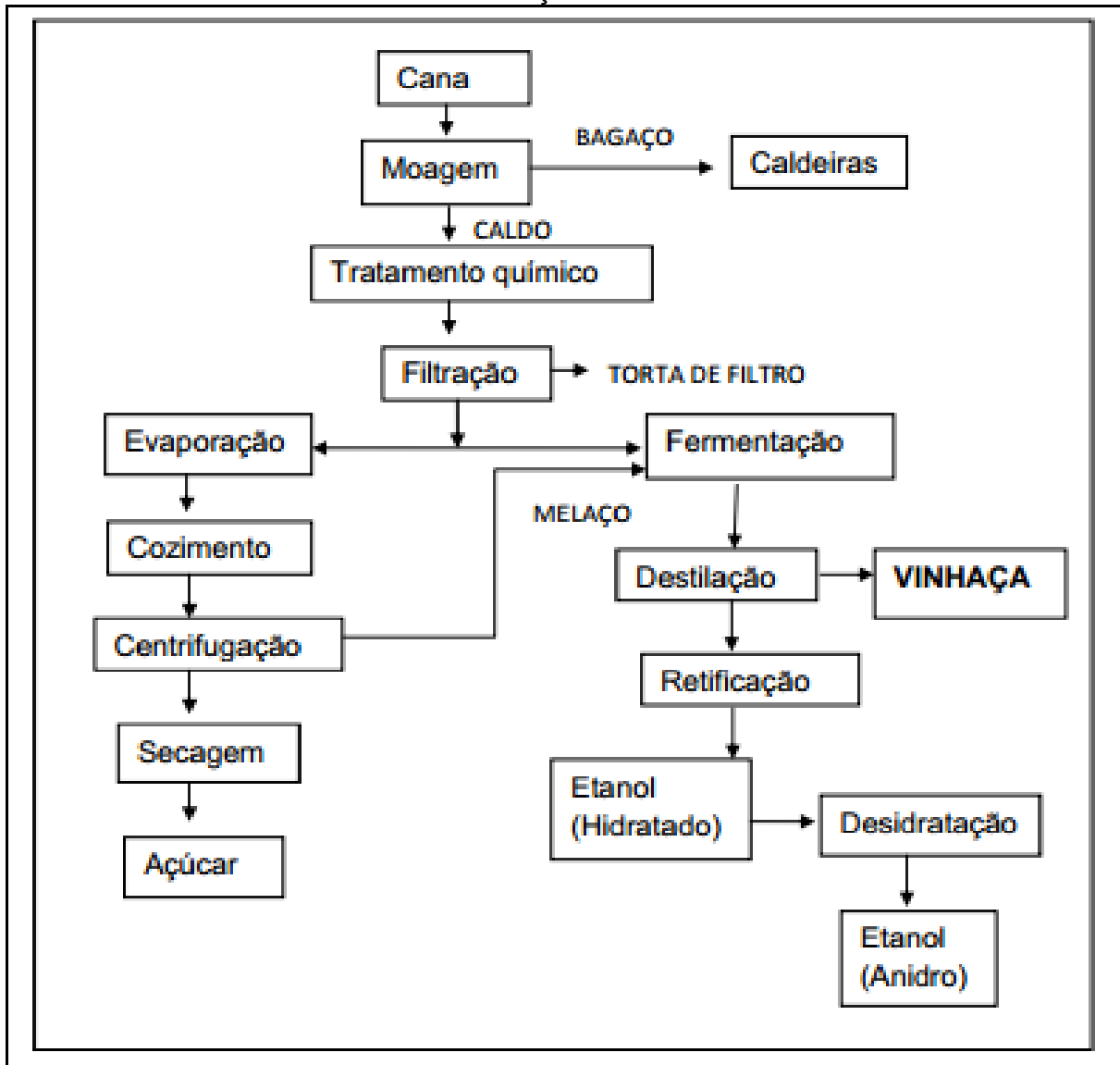
2.2.2 Vinhaça

A vinhaça é um subproduto da fabricação do etanol que até a década de 1970 era lançado no meio ambiente, em lagos de acumulação ou rios, gerando impactos devido ao seu conteúdo de matéria orgânica, baixo pH, elevada corrosividade e altos índices de demanda bioquímica de oxigênio (DBO_5), além de elevada temperatura na saída dos destiladores (FREIRE; CORTEZ, 2000 e SILVA et al., 2007). Este composto é considerado altamente nocivo à fauna, à flora, microfauna e à microflora das águas doces, além de afugentar a fauna marinha que vem às costas brasileiras para procriação, conforme FREIRE e CORTEZ (2000) e SILVA et al. (2007), porque provoca um rápido consumo de oxigênio dissolvido no meio comprometendo a microbiota aquática. A vinhaça é considerada como um resíduo sólido pela NBR 10.004 da ABNT (2004), por não ter um tratamento adequado para seu descarte nos padrões legais

Com a implantação do programa Proálcool para produzir etanol a partir da cana-de-açúcar, na década de 70, houve um aumento considerável na produção da vinhaça. Os principais subprodutos ou resíduos da indústria de etanol são o bagaço de cana-de-açúcar, um resíduo sólido e a vinhaça, um resíduo líquido. Dessa forma, para cada litro de etanol produzido são produzidos cerca de 15 litros de vinhaça, agravando ainda mais o problema da sua destinação. A projeção oficial para a produção de etanol no Brasil até 2030 é de 54 bilhões de litros (NOVACANA, 2017), tendo uma projeção para a safra de 2017/18 de 26,45 bilhões de litros (CONAB, 2017), que vai gerar uma grande produção de vinhaça.

A Figura 1 esquematiza o processamento da cana-de-açúcar para obtenção do etanol e açúcar, produzindo a vinhaça como resíduo em uma etapa intermediária do processo.

Figura 1 - Etapas de processamento da cana-de-açúcar para obtenção do etanol e açúcar



Fonte: SEABRA (2008).

A proibição legal do lançamento da vinhaça nos cursos d'água conforme Portaria nº 322 do Ministério do Interior, Portaria do Ministério do Interior n. 158, de 03/11/1980, e Resolução CNRH nº 15, de 01/06/2001, associando ao crescente aumento da sua produção levou a uma busca por possibilidades tecnológicas para o uso deste resíduo. Uma das alternativas foi seu uso na fertirrigação, no próprio cultivo da cana-de-açúcar, inicialmente com efeitos benéficos, porém quando aplicado em altas quantidades produz efeitos indesejáveis, tais como a salinização dos solos e a contaminação dos lençóis freáticos, devido ao desconhecimento de técnicas corretas de manejo da aplicação em áreas agrícolas (LYRA et al., 2003). Dentre os usos da vinhaça, objetivando-se um melhor destino a esse resíduo, está a

sua incorporação em dietas (OLIVEIRA et al., 2013) ou o enriquecimento de fontes fibrosas através de seu encharque em vinhaça (COELHO, 2010).

Segundo Bartacek et al. (2007), o substrato ideal para a produção sustentável de hidrogênio é aquele que possui elevado conteúdo de carboidratos, requer pré-tratamento mínimo, seja um recurso renovável como resíduo industrial e apresente baixo custo. Estas condições são apresentadas pela vinhaça com DBO_5 de 30 a 40 g. L^{-1} , que pode ser devolvida ao ambiente com menor carga orgânica e, portanto, menos poluente.

A composição da vinhaça varia de acordo com a composição da matéria prima, do preparo do mosto, da fermentação, do tipo de levedura, do aparelho usado para destilar e da sua operação (GLÓRIA, 1984). Segundo Hidalgo (2009) a vinhaça tem altas concentrações de potássio, cálcio, magnésio, enxofre e nitrogênio. A vinhaça usada neste trabalho corrobora com a presença destes componentes como predominantes.

Após o processo fermentativo a vinhaça ainda pode ser usada como fertilizante (BARBALHO; CAMPOS, 2010), pois embora no processo fermentativo tenha ocorrido redução do conteúdo orgânico, nutrientes como potássio, nitrogênio e fósforo restantes são ligeiramente removidos por meio de assimilação metabólica microbiana, segundo Moraes et al. (2014).

2.3 OBTENÇÃO BIOLÓGICA DO HIDROGÊNIO

Dentre os sistemas biológicos para produção de H_2 , a fermentação anaeróbia tem se destacado devido, principalmente, à maior produção deste gás quando comparada aos outros processos biológicos e à possibilidade de utilização de diferentes resíduos como substrato (MATHEWS et al., 2009).

A fermentação anaeróbia consiste em um processo biológico no qual culturas puras ou consórcios de diferentes tipos de microrganismos promovem a transformação de compostos orgânicos complexos (carboidratos, proteínas e lipídios) em produtos mais simples, tais como ácidos orgânicos voláteis (ácidos acético, propiônico, isobutírico e butírico), álcoois (etanol, butanol) e gases H_2 , CO_2 e CH_4 . A identificação dos ácidos orgânicos voláteis e dos álcoois formados durante o processo de fermentação anaeróbia revela informações importantes sobre a rota metabólica seguido pelos microrganismos. Além disso, a razão entre o ácido acético

e o ácido butírico pode ser relacionada à produção de H₂ (DE SÁ et al., 2011), porque as produções destes ácidos na fermentação anaeróbica geram respectivamente 4 mols de H₂ (Equação 1) e 2 mols de H₂ (Equação 2), segundo Peixoto (2008), resultado obtido também neste experimento.



Entretanto, se durante o processo houver uma produção de ácido propiônico (equação 3), haverá consumo de hidrogênio indicando uma rota não favorecida para a produção deste gás (LEVIN et al., 2004), Figura 2.

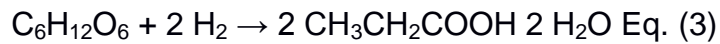
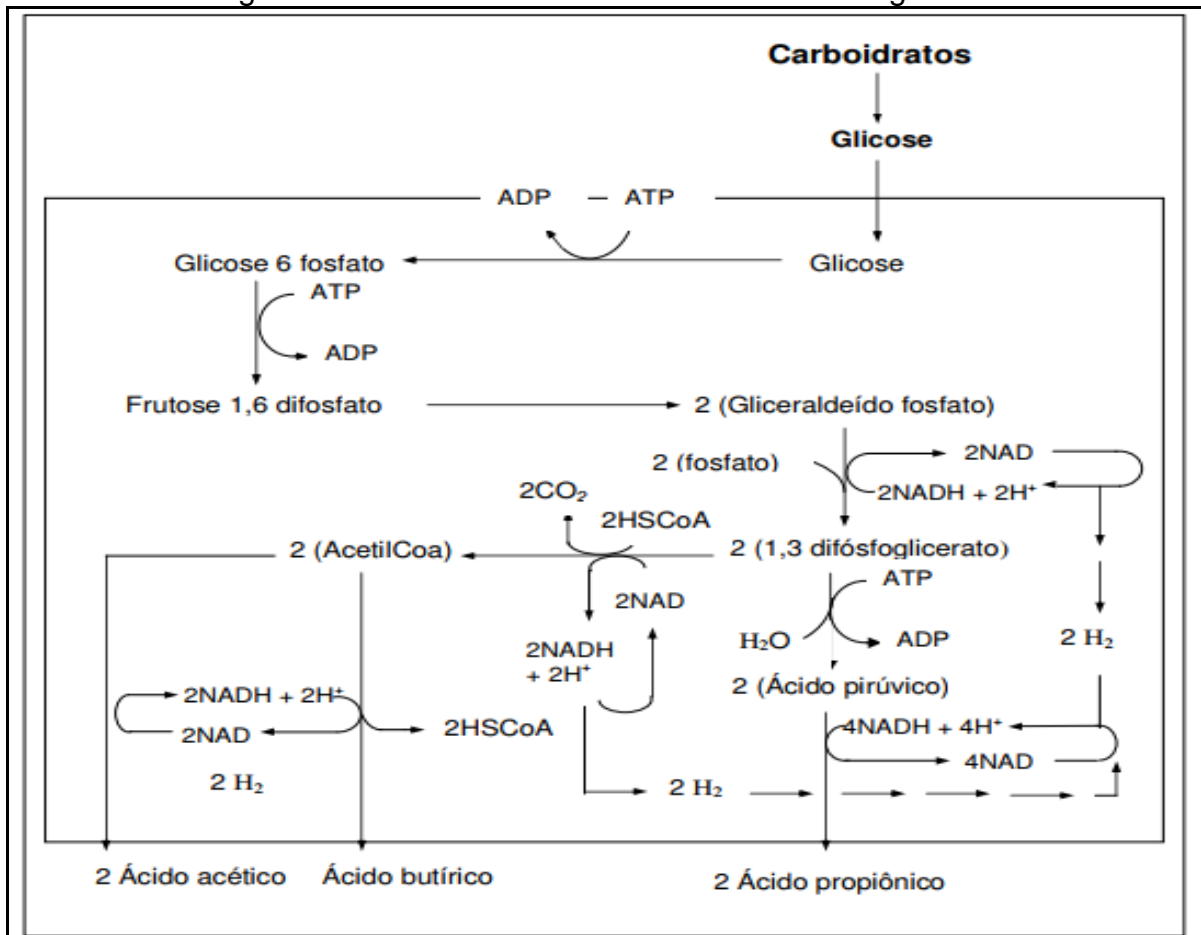


Figura 2 - Rotas metabólicas de bactérias acidogênicas



Fonte: Mosey (1983) adaptado apud Shida (2008).

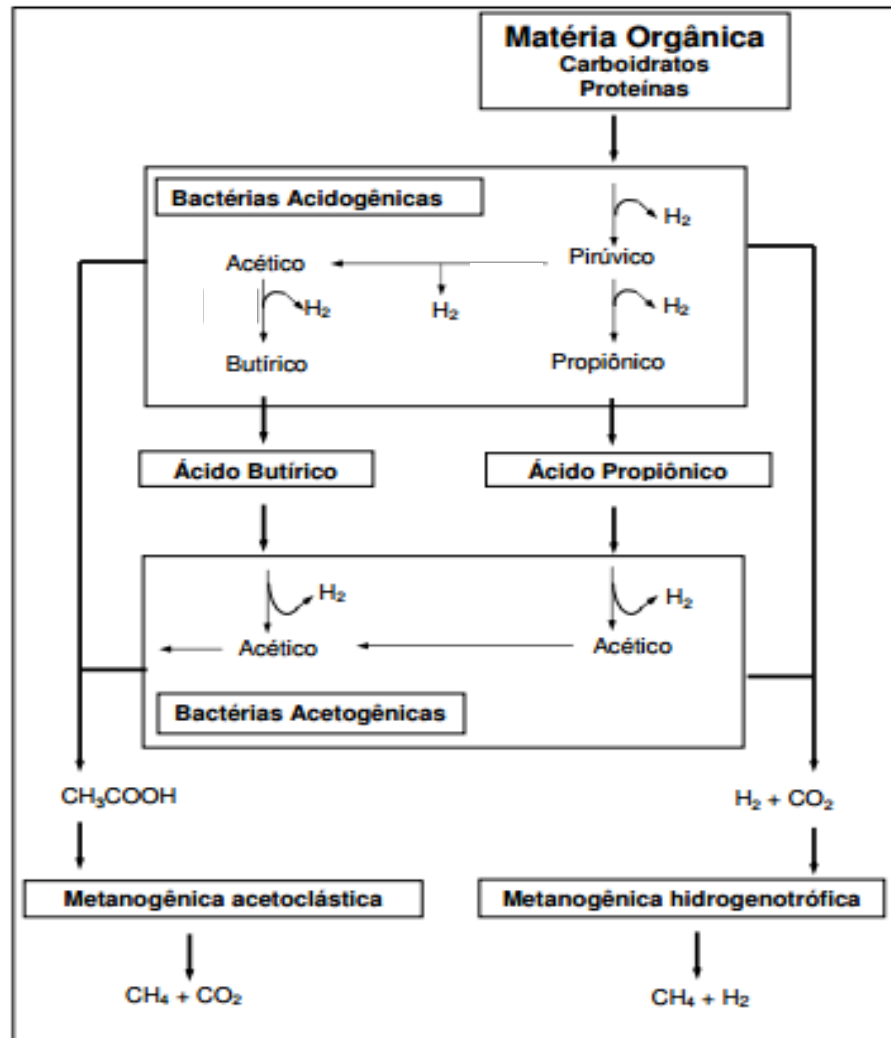
Os ácidos orgânicos produzidos podem ser usados na indústria química ou alimentícia. O ácido acético (CH_3COOH) pode ser usado como antimicrobiano (GULLO, et al., 2014) e como descongelante de pistas de aeroportos, pontes e estradas (HUO et al., 2015). O ácido butírico ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$) é usado para melhorar o sabor amanteigado nos alimentos (PLAYNE, 1985) e o ácido propiônico ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$) é utilizado como um antifúngico, como conservantes em alimentos e como um intermediário na síntese de herbicidas, acetato de celulose, propionato plásticos, solventes e produtos farmacêuticos (KOŠMIDER et al., 2010). Ácido isobutírico ($\text{CH}_3\text{CH}_3\text{CHCOOH}$) é um composto químico utilizado na indústria cosmética e na indústria alimentar como um aditivo, o ácido valérico ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$) é responsável pelo odor do queijo Roquefort (SHEREVE, 1982). A produção de dióxido de carbono também tem aplicação biotecnológica como gaseificação de alimentos.

A produção de hidrogênio por fermentação anaeróbica se torna mais

atrativa por não produzir apenas este gás durante o processo, estando associada à geração de ácidos graxos voláteis com outras aplicações (CHENG et al., 2011).

O processo de fermentação anaeróbia é desenvolvido em quatro etapas principais (Figura 3): hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese.

Figura 3 - Representação esquemática do processo de digestão anaeróbica



Fonte: Mosey (1983) adaptado *apud* Shida (2008).

Na primeira fase do processo fermentativo, bactérias hidrolíticas produzem enzimas extracelulares que promovem a degradação dos materiais particulados complexos em materiais dissolvidos mais simples, os quais são permeáveis às membranas celulares das bactérias fermentativas. Na fase acidogênica, os produtos solúveis oriundos da etapa anterior são metabolizados no interior das células das bactérias, sendo convertidos em compostos mais simples. Os compostos produzidos incluem ácidos orgânicos voláteis, álcoois, CO_2 , H_2 , além de novas células

bacterianas. As bactérias acetogênicas são responsáveis pela oxidação dos produtos gerados na fase acidogênica, em substrato apropriado (H_2 e ácido acético) para a próxima fase, que envolve as arqueias metanogênicas. Nesta etapa do processo, o H_2 pode também ser convertido em ácido acético pelas bactérias homoacetogênicas (SPEECE, 1996). Os ácidos graxos voláteis com exceção do ácido acético, tais como o ácido propiônico, butírico e valérico e os álcoois são metabolizados por bactérias acetogênicas para seu crescimento e para formar ácido acético e hidrogênio (KOTHARI et al., 2014).

A metanogênese e a produção biológica do hidrogênio compartilham as etapas de hidrólise e acetanogênese, mas para que ocorra a produção do hidrogênio em consórcios é necessária a inibição do desenvolvimento dos microrganismos consumidores deste gás no decorrer das reações de decomposição da matéria orgânica (DE SÁ et al., 2014).

A produção biológica de hidrogênio a partir de biomassa por fermentação anaeróbia é um processo de baixo custo e que utiliza materiais residuais como substrato, minimizando a produção de resíduos e contribuindo para a diversificação da matriz energética. Alguns trabalhos descrevem a produção de hidrogênio usando vinhaça.

Espinoza-Escalante et al. (2009) realizaram um estudo sobre o tempo de retenção hidráulica, pH e temperatura e a influência destes parâmetros na produção de hidrogênio em reatores de batelada, a partir da vinhaça. Estes autores estudaram as seguintes condições de pH 4,5; 5,5 e 6,5, verificando que a condição inicial de 5,5 é a mais propícia para este tipo de resíduo. Buitrón e Carvajal (2010) realizaram um estudo a partir da vinhaça de tequila e obtiveram uma produção de $50,5 \text{ mL}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{h}^{-1}$ em reatores de batelada sequencial.

Fernandes et al. (2010) também utilizando vinhaça e caldo de cana em consórcios produziu este gás, usando DQO de $250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $2,5 \text{ g} \cdot \text{SSV} \cdot \text{L}^{-1}$ de cultura mista, no qual obtiveram rendimento máximo de H_2 $579 \text{ mL } H_2/\text{g DQO}$ em uma concentração de efluente baixa ($0,25 \text{ g DQO} \cdot \text{L}^{-1}$). Qiu et al., (2011), utilizando vinhaça resíduo de etanol a partir do caule e sabugo de milho em condições termófilas em reatores de batelada, obteve hidrogênio em maior quantidade em temperatura de 70°C com uma média de $172 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1} \text{SV}_{\text{adicionado}}$. Wu et al. (2013) avaliaram a influência da concentração de vinhaça proveniente de etanol a partir do milho na produção de hidrogênio e constataram que uma vazão de produção de H_2 .

L⁻¹ em uma concentração de vinhaça na proporção em volume de 20%. Sydney et al. (2014), utilizando vinhaça suplementado com sacarose, melaço e caldo de cana-de-açúcar e em consórcios microbianos, obtiveram uma produção máxima de hidrogênio de 7,14 mol H₂. g⁻¹ de substrato.

O processo de obtenção de hidrogênio pode ser realizado utilizando culturas puras ou consórcios de bactérias presentes em lodos (AMARAL et al., 2009). Os processos de fermentação para produção de hidrogênio utilizando culturas mistas, em comparação com os que utilizam culturas puras são mais simples de manusear e controlar, podendo ser capaz de metabolizar um maior espectro de substratos. Contudo, o hidrogênio produzido pelas bactérias produtoras de hidrogênio pode vir a ser consumido pelas bactérias consumidoras de hidrogênio durante o processo global de fermentação, sendo uma desvantagem, pois induz a uma queda de rendimento final de produção, por este motivo, é necessário inativar os microrganismos produtores de metano, fazendo um pré-tratamento usando um inibidor químico como bromoetanosulfonato, acetileno e clorofórmio (GUO et al., 2010) ou altas temperaturas (90°-110° C) (ZHANG et al., 2005).

Os rendimentos de hidrogênio são significativamente influenciados pelo tipo de inóculo, pois este rendimento depende do crescimento e da via metabólica que o microrganismo irá utilizar.

2.4 BACTÉRIAS PRODUTORAS DE HIDROGÊNIO

A produção de hidrogênio via fermentação anaeróbia pode ser realizada por culturas microbianas mistas, consórcios, derivadas de ambientes naturais, por culturas puras, selecionadas a partir de bactérias produtoras de hidrogênio ou por co-culturas, mistura de culturas puras. As vantagens na utilização de culturas puras estão relacionadas à seletividade do substrato, aos elevados rendimentos de H₂ e a redução de subprodutos (VASCONCELOS, 2014), mudanças na rota metabólica da reação também são mais facilmente detectáveis quando se utiliza culturas puras (NUNES, 2015). A não necessidade de pré tratamento do inóculo pode contribuir para tornar economicamente o uso destas culturas puras mais viáveis. Porém, culturas puras são sensíveis à contaminação, o que implica, na maioria dos casos, no emprego de condições assépticas e aumento do custo global do processo (NTAIKOU, 2010).

Todavia, a maioria dos estudos foram desenvolvidos com vista a otimizar parâmetros no processo fermentativo e, deste modo, incrementar os rendimentos e as taxas de produção de H₂, tendendo a recorrer a culturas puras (ELSHARNOUBY et al., 2013).

Co-culturas de microrganismos anaeróbicos facultativos e estritos foram usadas para a produção de hidrogênio, os microrganismos facultativos no caso destas co-culturas consomem o oxigênio presente, favorecendo o crescimento dos microrganismos anaeróbios estritos (QIAN et al., 2011; BECKERS et al., 2010), co-culturas usando espécies de *Clostridium*, anaeróbio estrito, também foram estudadas por Hsiao et al., (2009). Estes autores obtiveram uma produção de 93,3 mL H₂ em co-cultura de *C. pasteurianum* e *C. sporospaheroides* e uma produção inferior quando juntaram *C. tyrobutyricum* com *C. sporospaheroides*, 30 mL H₂. Adav et al., (2009) produziram hidrogênio a partir de uma co-cultura de *Enterococcus saccharolyticus* (degradador de celulose) e *C. butyricum* (um bom produtor de H₂), obtendo um rendimento de 2,19 mol H₂. mol hexose⁻¹ a 5 g. L⁻¹ celobiose. Patel et al., (2014) obtiveram um rendimento de hidrogênio de 3,0 mol. mol⁻¹ glicose com co-culturas compostas por *Bacillus cereus* EGU43, *Enterobacter cloacae* HPC123 e *Klebsiella* sp. HPC793.

Nos consórcios há uma diversidade de microrganismos que consomem e os que produzem hidrogênio, sendo necessário submetê-los a pré-tratamentos para inativar microrganismos metanogênicos quando o objetivo for a produção de hidrogênio. O pré-tratamento térmico é usado por vários autores (SHIDA et al., 2009; BARROS et al., 2011; MAINTINGUER et al., 2011) para inativar microrganismos consumidores de hidrogênio. Culturas mistas conseguem metabolizar uma maior diversidade de substratos, não requerem esterilização do meio de cultivo e geralmente produzem mais hidrogênio quando comparados com culturas puras, apresentando vantagem para a produção de hidrogênio em grande escala. São obtidos a partir do solo, lodo de esgoto, excreta de animais ou resíduos industriais e domésticos (SÁ et al., 2014; MAINTINGUER et al., 2015).

Lazaro et al. (2015) observaram aumento da produção de hidrogênio com consórcios microbianos com o aumento da concentração de vinhaça em ensaios mesófilos. Kargi et al. (2012) estudaram a influência da concentração inicial de soro de queijo na produção de hidrogênio que aumentou de 80mL H₂ (3,22mmol H₂) para 257mL H₂ (10,34mmol H₂) com o aumento da concentração de 5,2g. L⁻¹ para 20

açúcares totais por L^{-1} em 360 horas de ensaio. Li et al. (2006), a partir de diversas concentrações de glicose (5, 7,5, 10 e 20 g. L^{-1}) e diferentes valores de pH (5, 6, 7) tiveram melhor rendimento nas maiores concentrações e com pH 7,0. Maintinguer et al., (2008) obtiveram um rendimento de 1,6 mols de H_2 . mol^{-1} de sacarose utilizando como inóculo efluente de suinocultura.

Pode-se usar em processos biológicos a técnica de bioaugmentação para melhorar a produção de hidrogênio, esta técnica consiste na adição de microrganismos, pré-selecionados como produtores de hidrogênio, em biorreatores para beneficiar a produção deste gás. Abreu et al. (2010) usaram lodo bioaugmentado e obtiveram uma taxa de produção de hidrogênio de 2,7 $L H_2. L^{-1}. dia^{-1}$. No lodo não bioaugmentado houve dois picos de produção de 0,8 $L H_2. L^{-1}. dia^{-1}$ e 1,5 8 $L H_2. L^{-1}. dia^{-1}$. Acs et al. (2015) adicionaram *Enterobacter cloacae* em digestores anaeróbicos contendo silagem de milho como substrato e obtiveram um aumento na produção de hidrogênio, 718,5 $L. kg^{-1}$ no reator inoculado e de 595 $L. kg^{-1}$ no reator controle, observaram a influência de uma única estirpe adicionada a uma comunidade microbiana natural produtora de biogás. Mohan et al. (2007) usaram águas residuais de uma estação de tratamento de efluentes da Índia como fonte de carbono para a produção de hidrogênio em reatores bioaugmentado com um consórcio obtido de um reator de lodo anaeróbio e comprovaram a eficácia do processo na produção de hidrogênio com um aumento de 0,297 a 0,483 $mol H_2. kg^{-1}$.

A bioaugmentação é um processo de aplicação de organismos de natureza selvagem ou organismos geneticamente modificados em locais de resíduos perigosos poluídos ou biorreatores, a fim de acelerar a remoção de compostos indesejados (VAN LIMBERGEN; TOP; VERSTRAETE, 1998). Esta técnica pode ser usada para melhorar o arranque de um reator (WILDERER; RUBIO; DAVIDS, 1991) ou seu desempenho e para proteger a comunidade microbiana existente contra efeitos adversos (MOHAN et al., 2007) ou para compensar a sobrecarga orgânica ou hidráulica (CHONG; PAI; CHEN, 1997).

A produção de H_2 por meio de bactérias fermentativas permite a geração de hidrogênio de modo contínuo, em ritmo sustentado e em um curto intervalo de tempo, gerando ainda subprodutos intermediários de valor agregado (DAS, 2001), como ácidos graxos voláteis.

Na literatura, há indicação de algumas espécies produtoras de hidrogênio como os gêneros *Bacillus*, *Enterobacter*, *Thermoanaerobacterium* e *Clostridium* têm

sido relatadas como potenciais produtores deste gás (KOTAY; DAS, 2008). Entretanto, o uso de culturas puras na produção de H₂ pressupõe a condução de todo o processo biológico de forma estéril, o que seria inviável do ponto de vista econômico para processos que visam à produção de combustível (XU et al., 2010). Porém, diversas culturas puras são usadas na produção biológica de hidrogênio, conforme Hallenbeck (2009), com a intenção de determinar crescimento, produtos da fermentação e rendimento de hidrogênio.

Levin et al. (2006) avaliaram a produção de hidrogênio em *Clostridium thermocellum* a partir de substratos lignocelulósicos e viram que há a capacidade de produção em cultura pura devido à produção de ácidos acético e butírico indicadores da presença de gás hidrogênio. Nath et al. (2006) usaram *Enterobacter cloacae* e produziu 1,1 mmolH₂. (L_{medium})⁻¹. h⁻¹ a partir de glicose em 36 C°, estudando o efeito da temperatura. Xu et al. (2010) usando palha de milho, conseguiram uma produção com *Ethanoligenens harbiense* a partir de palha de milho pré tratada. Chookaew et al. (2012) usando *Klebsiella pneumoniae* obtiveram uma produção máxima de hidrogênio de 0,25 molH₂ mol⁻¹ substrato usando glicerol.

Os sistemas de biohidrogênio são expressos em diferentes unidades, tornando difícil avaliar e comparar as taxas e quantidades de hidrogênio sintetizadas por diferentes tecnologias de biohidrogênio (LEVIN et al., 2004).

2.4.1 Gênero *Enterococcus*

Os *Enterococcus* foram originalmente incluídos no gênero *Streptococcus* sendo as espécies mais encontradas *S. faecalis* e *S. faecium*, contudo, na década de 80, diferenças genéticas foram observadas entre os dois gêneros, levando à criação do gênero *Enterococcus* (MURRAY, 2000).

O gênero é composto por cocos gram-positivos da família Enterococcaceae, anaeróbios facultativos, termofilo, não formador de esporo. Encontrado associado a vários ambientes e hospedeiros, destacando-se *E. faecalis* comumente encontrado no trato gastrointestinal de animais e seres humanos, sendo um risco de saúde em hospitais por ser um patógeno oportunista e *E. faecium* comuns causadores de quadros infecciosos e adaptados a ambientes pobres em oxigênio (TRABULSI, 2009). O gênero possui pelo menos 37 espécies que diferem em produção de pigmentos, motilidade e habilidade de produzir ácidos a partir de vários carboidratos.

Na literatura são escassos trabalhos com este gênero de microrganismos como produtores de hidrogênio, porém Valdez-Vazquez et al. (2015) encontraram uma produção máxima de 79,54 mL de hidrogênio por grama de xilose como fonte de carbono em um consórcio utilizando três espécies de *Enterococcus* epífitas de folhas de trigo.

2.4.2 Gênero *Bacillus*

São bactérias bastonetes gram-positivas da família Bacillaceae, anaeróbios facultativos, mesófilos, formadores de endósporos, encontrado comumente no solo e algumas patogênicas. *B. cereus*, é comum no meio ambiente e causa intoxicações alimentares relacionadas ao amido e a produtos lácteos (TRABULSI, 2009). Amplamente distribuído na natureza, é encontrado comumente no solo, como um organismo saprófito, na microflora de insetos, rizosfera de algumas plantas e pode ser encontrado em reatores de tratamento de efluentes.

Patel et al. (2011) obtiveram um rendimento de 2 mol H₂. mol⁻¹ de glicose, utilizando *B. cereus*. Lovatel (2016) identificou a presença de *B. cereus* em consórcio microbiano produtor de hidrogênio utilizando vinhaça como substrato. Descritos por Lazaro (2012), *Bacillus* são produtores de hidrogênio em reatores em condições mesófilas, possui alta capacidade de produção, 1,61- 2,36 mol de H₂. mol⁻¹ de glicose. Kotay e Das (2007) utilizaram *B. coagulans* para a produção de hidrogênio a partir de diversas fontes de substratos. Prince (1995) cita *B. cereus* e outras bactérias produtoras de hidrogênio na fase acidogênica em digestores anaeróbios. No entanto, ainda são poucos os trabalhos na literatura utilizando *B. cereus* como produtor de hidrogênio.

Kalia et al. (1994) isolaram *B. licheniformis*, do esterco bovino e obtiveram uma produção de 0,5 mol H₂.⁻¹ mol glicose. Segundo Poletto et al. (2016) um isolado de consórcio do gênero *Bacillus*, foi o microrganismo com os resultados mais promissores entre os isolados na produção de hidrogênio, produzindo 39 mL H₂ L⁻¹ de glicerol a 37°C em pressão atmosférica de 0,918 atm.

2.4.2 Gênero *Enterobacter*

São bactérias bastonetes, gram negativas pertencem à família

Enterobacteriaceae, anaeróbias facultativas, mesófilos, formadoras de esporos (LI; FANG, 2007). Encontradas na pele humana e plantas, bem como no solo, água, esgoto, trato intestinal, urinário e respiratório de humanos e animais e em alguns produtos lácteos. Fazem fermentação fórmica e fermentação do butanodiol, mas a quantidade de ácidos formados é pequena, predominando como produtos finais compostos neutros como o etanol, acetoína e butanodiol. A *E. aerogenes* prospera em ambientes como esgotos, solo e fezes e provoca uma grande variedade de doenças. O gênero *Enterobacter* tem sido largamente estudado, por ser um anaeróbio facultativo, com excelentes rendimentos de hidrogênio na fermentação de carboidratos (CONVERTI; PEREGO, 2002). Das e Veziroglu (2001) apontam *Enterobacter aerogenes* como uma das principais bactérias produtoras de hidrogênio. Kapdan e Kargi (2006) obtiveram rendimentos de $1,97 \text{ mmolH}_2 \cdot \text{g}^{-1}$ glicose com *E. aerogenes* e apontam *Enterobacteriaceae* com a capacidade de metabolizar um largo espectro de substratos por fermentação anaeróbia. Em todos os casos ocorre a produção de dióxido de carbono e hidrogênio, para a fase gasosa, e de ácidos gordos voláteis e etanol, para a fase líquida, segundo estes autores.

ZHANG et al. (2011) consideram que *E. aerogenes* tem vantagens no processo fermentativo por seu crescimento ocorrer na ausência de hidrogênio e não ser inibido com 100% deste gás, ter alta taxa de crescimento e produção de hidrogênio ($10 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol}^{-1}$ glucose) e ter um desempenho em temperaturas entre 25°C - 40°C . Tanisho et al. (1983) de uma estirpe isolada de *E. aerogenes* E.82005 das folhas de *Mirabilis jalapa* obtiveram $21 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}$ ao longo de um período de 23 h e constataram na década de 80 a capacidade de produzir hidrogênio desta bactéria.

3 METODOLOGIA

3.1 LINHAGENS BACTERIANAS

Os microrganismos *Enterococcus faecalis* e *Bacillus cereus* foram isolados de consórcios microbianos produtores de hidrogênio, proveniente de lodo anaeróbio granular de reator anaeróbio (UASB) de efluente de uma indústria de hidrolisado de soja (Esteio, RS), coletado 2014. A linhagem de *Enterobacter aerogenes* é uma cepa comercial de ATCC 13048.

3.2 ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS

O isolamento dos microrganismos do consórcio microbiano foi realizado em placa de Petri contendo meio de cultivo PYG sólido.

Tabela 1 - Meio de cultivo PYG (Peptona, extrato de levedura, glicose para isolamento dos microrganismos)

Composto	Concentração (g/L)
Glicose	10
Extrato de Carne	5
Extrato de Levedura	5
Peptona de carne	5
Ágar (meio sólido)	15

As placas foram mantidas em jarras de anaerobiose e incubadas a 37°C até a observação do aparecimento das colônias. A purificação das bactérias foi realizada por esgotamento e as linhagens foram armazenadas em tubo inclinado contendo meio PYG à 4°C e em glicerol 30% e mantidos em ultrafreezer -80°C. Os microrganismos usados nos bioensaios foram *E. faecalis* e *B. cereus*, isolados deste consórcio microbiano e *E. aerogenes* (cepa comercial ATCC 13048) foi usada como controle positivo.

3.3 VINHAÇA

A vinhaça utilizada foi proveniente da Indústria de Etanol (Guarani-Unidade Industrial Andrade- Pitangueiras/SP), coletada em setembro de 2015 e mantida armazenada em câmara fria a 4°C no Laboratório de Tecnologia Ambiental (LATAM) da UCS. Inicialmente, a vinhaça foi centrifugada a 8000g por 5 minutos para a retirada de sólidos grosseiros. A Tabela 2 mostra a composição da vinhaça usada nos experimentos.

Tabela 2 - Características da vinhaça de cana-de-açúcar utilizada nos experimentos para produção de H₂

PARÂMETROS	QUANTIDADE	METODOLOGIAS
Cálcio total (mg. L ⁻¹)	364.800	Espectrometria de Absorção atômica – APHA 3030E e 3111B
Demanda Química de Oxigênio (mg. L ⁻¹)	20,84	Método de titulação - refluxo fechado – APHA 5220 B
Fósforo total (mg. L ⁻¹)	58,787	Espectrometria de Absorção atômica – APHA 3030E e 3111B
Magnésio total (mg. L ⁻¹)	169,920	Espectrometria de Absorção atômica - APHA 3030E e 3111B
Nitrogênio Amoniacal (mg. L ⁻¹)	38,97 ± 0,16	Método de titulação – APHA 4500 NH ₃ C
Nitrogênio total kjeldahl* (mg. L ⁻¹)	394,69	Método 4500-Norg-B [LAPAM PE 013] 2,80
pH	4,22	Potenciometria
Potássio (mg. L ⁻¹)	2537,650	Fotometria em chama – APHA 3500K-B
Sódio (mg. L ⁻¹)	50,47	Fotometria em chama – APHA 3500Na-B
Sulfetos (mg. L ⁻¹)	n.d.	SMEVWV-Método 4500-S2-D [LAPAM PE 024]
Sólidos Suspensos Totais (mg. L ⁻¹)	3480	Gravimetria - APHA 2540 D
Sólidos Suspensos Voláteis (mg. L ⁻¹)	2860	Gravimetria - APHA 2540 G
Ferro Total (mg. L ⁻¹)	11,73	Manual de Métodos de Análises de Bebidas e Vinagres- Fermentados Alcoólicos Método 33
Manganês total (mg. L ⁻¹)	1,67	Manual de Métodos de Análises de Bebidas e Vinagres- Fermentados Alcoólicos Método 33
Sólidos Suspensos Fixos (mg. L ⁻¹)	250	Gravimetria - APHA 2540 E

3.4 ENSAIOS PARA PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO

As culturas puras *E. faecalis*, *B. cereus* e *E. aerogenes* foram crescidas por 24h em meio contendo vinhaça pura sem diluição e pH inicial de 6,0. O meio de

cultivo de vinhaça foi suplementado com sais nitrogenados com $7,20 \text{ g. L}^{-1}$ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, e 6 g. L^{-1} $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$, conforme Pirt e Callow (1958). Após o crescimento, foi realizada a leitura D.O. (densidade óptica) através da absorbância em espectrofotômetro (spectra Max 190) em 640 nm. O volume de inóculo foi ajustada para o correspondente a 1.0 D.O. para cada isolado separadamente e para as co-culturas foi adicionado um volume correspondente da densidade óptica das células, sendo 1:1:1 nos ensaios com três isolados, *B. cereus* + *E. aerogenes* + *E. faecalis* e 1:1 nos ensaios com dois isolados, 1) *B. cereus* + *E. aerogenes*; 2) *B. cereus* + *E. faecalis* e 3) *E. aerogenes* + *E. faecalis* (MARONE et al., 2012). Nos experimentos com o consórcio foi realizado o tratamento térmico no lodo granular, 90°C por 10 minutos, conforme Kim et al. (2006), para a eliminação das bactérias consumidoras de hidrogênio, e, posteriormente adicionado ao reator 0,34 g do inóculo com o pré-tratamento.

Também foi avaliada, a bioaugmentação do consórcio microbiano, com estes isolados, conforme metodologias descritas anteriormente, sendo: 1) Consórcio + *B. cereus*; 2) Consórcio + *E. aerogenes*; 3) Consórcio + *E. faecalis* (KUMAR et al., 2015).

No meio de cultivo composto por glicose, g.L^{-1} : NH_4Cl 0,5; KH_2PO_4 0,25; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,3; FeCl_3 0,025; NiSO_4 0,016; CoCl_2 0,025; ZnCl_2 0,0115; CuCl_2 0,0105; CaCl_2 0,005 e MnCl_2 0,015 (PRAKASHAM et al., 2009) foi adicionado 0,25 g de inóculo, com tratamento térmico, para o consórcio e as culturas puras um volume correspondente a 1.0 D.O. para cada isolado separadamente.

Os ensaios foram realizados em frascos de vidro de 60 mL, contendo 30 mL de vinhaça suplementada, como descrito acima. Os frascos foram lacrados com tampa de borracha e lacre de alumínio e no meio foi aspergido com gás nitrogênio por 5 minutos para garantir a anaerobiose. As culturas foram mantidas em agitação orbital em *shaker* (Ethik Technology) a 37°C por 48 horas.

As culturas puras e o consórcio foram cultivados a quantidades de 30, 50, 70 e 100% de vinhaça para a quantificação da produção de hidrogênio e as co-culturas na vinhaça pura (100%). Todos os ensaios serão realizados em triplicata.

3.5 ANÁLISES QUÍMICAS

O monitoramento da produção de hidrogênio foi realizado por cromatógrafo

a gás (DaniMaster – AutomaticSample AS), equipado com detector de condutividade térmica (TCD –Thermal Conductivity Detector) e coluna Carboxen™ 1006 PLOT Capillary Column (30 m × 0,53 mm), tendo gás Nitrogênio ultrapuro como gás de arraste sob fluxo de 10mL/min. A temperatura do forno foi de 35°C, e a temperatura da coluna e do detector de 100°C. Para a construção da curva de calibração foram injetados volumes de 10, 25, 50, 100, 150, 200 e 250 microlitros de gás hidrogênio puro. Os dados foram calculados por meio da equação dos gases ideais (item 3.6).

As análises de ácidos orgânicos (ácido acético, propiônico, butírico, isobutírico, valérico e isovalérico) foram realizadas em cromatógrafo gasoso (GC/MS, Shimadzu – QP2010 Ultra), equipado com coluna DN-FFAP (30 m x 0,32 mm x 0,25 µm) com detector de ionização de chama (FID - *Flame Ionization Detector*), tendo hélio como gás de arraste, além de ar sintético e nitrogênio como gases auxiliares. A temperatura da coluna foi de 100°C por 5 min, aumentando 7°C por min até 200°C. As temperaturas do injetor e do detector foram de 200° e 250°C, respectivamente.

A concentração de carboidratos totais das amostras provenientes dos bioensaios de produção de hidrogênio foi determinada por método colorimétrico de Dubois et al. (1956). Para a construção da curva padrão foram efetuadas leituras com concentrações de 10 a 100 mg/L de sacarose. As análises da composição química da vinhaça foram realizadas de acordo com *Standart Methods* (APHA, 2005).

3.6 ANÁLISE DOS DADOS

O volume de hidrogênio foi convertido em mmol aplicando a equação dos gases ideais.

$$P \cdot V = n \cdot R \cdot T$$

onde P é a pressão atmosférica em Caxias do Sul (0,918 atm), V é o volume de H₂ (litros), n é o número de mols de H₂, e R é a constante universal dos gases ideais (0,082atm L/K.mol), e T é a temperatura utilizada nos experimentos (K).

Os dados da produção de hidrogênio foram tratados no *software* GraphPad Prism 5.0 e submetidos à análise de variância e ao teste Tukey $P \leq 0,05$.

4 RESULTADOS

Os resultados foram apresentados na forma de capítulos através de artigos:

4.1 Capítulo 1 Produção de hidrogênio por consórcio microbiano em comparação com *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis* e *Enterobacter aerogenes* utilizando glicose como substrato.

4.2 Capítulo 2 Linhagens de *Bacillus. cereus* e *Enterococcus. faecalis* isoladas de um consórcio microbiano aumentam a produção de hidrogênio e ácidos graxos voláteis utilizando vinhaça.

4.1 CAPÍTULO 1

Trabalhos relacionados

Trabalhos de sua autoria enviados para o 6º Congresso Internacional de Tecnologia para o Meio Ambiente.

Título ↑	Tema	Autores	Data do em	Enviado	Operações
Produção de hidrogênio por consórcio microbiano em comparação com <i>Bacillus cereus</i>, <i>Enterococcus faecalis</i> e <i>Enterobacter aerogenes</i> utilizando glicose como substrato	Energia e energias renováveis	Ana Silvia Eder, Flaviane Eva Magrini, Andressa Spengler, Julia Tonioli da Silva, Suelen Paesi ansieder@hotmail.com , flavimagrini@hotmail.com , spengler.1@hotmail.com , juliatonioli2008@hotmail.com , sopaesi@ucs.br	10/01/2018 às 22:03	Ana Silvia Eder	Excluir

* Trabalho completo aprovado para publicação no 6º Congresso Internacional de Tecnologia para o Meio Ambiente (FIEMABRASIL – Feira de Negócios, Tecnologia e Conhecimento em Meio Ambiente), a ocorrer em abril de 2018.

PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO POR CONSÓRCIO MICROBIANO EM COMPARAÇÃO COM *BACILLUS CEREUS*, *ENTEROCOCCUS FAECALIS* E *ENTEROBACTER AEROGENES* UTILIZANDO GLICOSE COMO SUBSTRATO*

Ana Silvia Eder¹; Flaviane Eva Magrini²; Andressa Spengler³; Julia Tonioli da Silva⁴; Lademir Luiz Beal⁵; Suelen Paesi⁶

1 Universidade de Caxias do Sul (ansieder@hotmail.com)

2 Universidade de Caxias do Sul (flavimagrini@hotmail.com)

3 Universidade de Caxias do Sul (spengler.1@hotmail.com)

4 Universidade de Caxias do Sul (juliatonioli2008@hotmail.com)

5 Universidade de Caxias do Sul (llbeal@ucs.br)

6 Universidade de Caxias do Sul (sopaesi@ucs.br)

Resumo

O hidrogênio é uma forma limpa e renovável de energia que surge como uma alternativa para diversificação da matriz energética. Sua obtenção por meio da fermentação anaeróbia pode ser por consórcios microbianos ou culturas puras de diversos microrganismos, utilizando distintos substratos comerciais e resíduos industriais. O uso do substrato glicose permite saber o potencial de produção de hidrogênio por estes microrganismos. Este trabalho tem como objetivo comparar a produção de hidrogênio por consórcio microbiano obtido de lodo granular e culturas puras *Bacillus cereus*, *Enterobacter aerogenes* e *Enterococcus faecalis* em meio de glicose. Os ensaios foram realizados em frascos de 60 mL, em triplicata, contendo 30 mL de meio de glicose e 0,25 g de inóculo de consórcio microbiano após tratamento térmico

(90°C -10 min) e um volume equivalente a 1 D.O. (densidade óptica) para cada cultura pura. Os fracos foram mantidos em agitação orbital a 37°C por 48 horas. A maior produção de hidrogênio foi obtida pelo consórcio (107,06 mmol H₂. L⁻¹), com as culturas puras, a produção de hidrogênio foi reduzida, sendo 5,81 mmol H₂. L⁻¹ para *B. cereus*, 3,82 mmol H₂. L⁻¹ para *E. aerogenes* e 0,57 mmol H₂. L⁻¹ para *E. faecalis*. O maior consumo do substrato glicose foi de 68,10% pelo consórcio microbiano e o menor foi de 0,35% pelo microrganismo *E. faecalis*. Os resultados mostram que em meio com glicose, os microrganismos isolados tiveram seu potencial de produção de hidrogênio reduzido, enquanto que os consorciados apresentaram um melhor desempenho neste mesmo meio de cultivo.

Palavras-chave: Hidrogênio. Glicose. Fermentação anaeróbia

Área Temática: Energia e Energia Renováveis

HYDROGEN PRODUCTION BY MICROBIAL CONSORTIUM COMPARED TO *BACILLUS CEREUS*, *ENTEROCOCCUS FAECALIS* AND *ENTEROBACTER AEROGENES* USING GLUCOSE AS SUBSTRATE

Abstract

Hydrogen is a clean, renewable form of energy that emerges as an alternative to diversifying the energy matrix. Its obtaining through the anaerobic fermentation can be by microbial consortia or pure cultures of diverse microorganisms, using distinct commercial substrates and industrial residues. The use of the glucose substrate allows to know the potential of hydrogen production by these microorganisms. This work aims to compare the production of hydrogen by microbial consortium obtained from granular sludge and pure cultures *Bacillus cereus*, *Enterobacter aerogenes* and *Enterococcus faecalis* in glucose medium. The assays were carried out in 60 mL flasks, in triplicate, containing 30 mL of glucose medium and 0.25 g of microbial consortium inoculum after heat treatment (90 ° C -10 min) and a volume equivalent to 1 O.D. (optical density) for each pure culture. The weights were maintained in orbital agitation at 37 ° C for 48 hours. The highest hydrogen production was obtained by the consortium (107.06 mmol H₂. L⁻¹), with the pure cultures, the hydrogen production was reduced, being 5.81 mmol H₂. L⁻¹ for *B. cereus*, 3.82 mmol H₂. L⁻¹ for *E. aerogenes* and 0.57 mmol H₂. L⁻¹ for *E. faecalis*. The highest consumption of substrate glucose was 68.10% by the microbial consortium and the lowest consumption was 0.35% by the microorganism *E. faecalis*. The results showed that in the medium with glucose, the isolated microorganisms had their potential of reduced hydrogen production, while the consortium had a better performance in this same culture medium.

Keywords: Hydrogen. Glucose. Anaerobic fermentation

Subject Area: Renewable Energy and Energy

INTRODUÇÃO

Atualmente, o uso de fontes não renováveis de energia é uma problemática, por utilizar recursos esgotáveis e gerar impactos ambientais com a emissão de poluentes e gases de efeito estufa. Isso fomenta a busca de estratégias para a obtenção de energias limpas e renováveis que possam diversificar a atual matriz energética.

Neste contexto, o hidrogênio aparece como uma fonte promissora, limpa e renovável de energia que pode ser usada para consumo doméstico e industrial, possui um alto potencial energético, liberando na combustão 122 kJ. g⁻¹ (YU, 2002) sendo mais eficiente que a gasolina em automóveis.

Dentre as formas de obtenção de hidrogênio, destaca-se a produção por fermentação anaeróbia, processo realizado por consórcios microbianos, derivadas de ambientes naturais, como solo, água residual e lodos de estações de tratamento, ou por culturas puras de bactérias produtoras de hidrogênio. As vantagens na utilização de culturas puras estão relacionadas à seletividade do substrato, aos elevados rendimentos de H₂ e redução de subprodutos (VASCONCELOS, 2014), diversas culturas puras são usadas na produção biológica de hidrogênio, conforme Hallenbeck, (2009), como espécies dos gêneros *Enterobacter* e *Bacillus*.

Os consórcios microbianos, não se baseiam em uma estirpe específica de microrganismo e por isso pode ser operado em condições não estéreis, sem risco significativo de contaminação (LU et al., 2011) e metabolizam um espectro maior de substratos apresentando também vantagens na sua utilização. As bactérias constituintes de um consórcio podem ser anaeróbias estritas ou facultativas, porém as facultativas como *Enterobacter* sp. e *Bacillus* sp por serem menos sensíveis ao oxigênio são consideradas melhores para a obtenção de hidrogênio via fermentação (DAS; VEZIROGLU, 2008). Na literatura, há indicação de algumas espécies produtoras de hidrogênio como os gêneros *Bacillus*, *Enterobacter*, *Thermoanaerobacterium* e *Clostridium* têm sido relatadas como potenciais produtores deste gás (KOTAY; DAS, 2008). A busca pelo melhor microrganismo produtor de hidrogênio usando uma variedade de substratos tem sido alvo de diversas pesquisas.

Vários substratos podem ser usados na obtenção de hidrogênio, como glicose, sacarose e amido têm sido mais utilizados (WANG; WAN, 2009), porém resíduos agroindustriais também são comumente usados (KAPDAN; KARGI, 2006).

Carboidratos são preferidos como fontes de carbono no processo fermentativo, principalmente glicose, que é um açúcar simples e de fácil assimilação metabólica. O rendimento teórico para bactérias anaeróbias facultativas é de dois mols de hidrogênio por mol de glicose (FANG; LIU, 2002; MORIMOTO et al., 2004). Substratos simples servem como modelo para o entendimento do processo fermentativo para que posteriormente possa se usar um substrato mais complexo.

Dessa forma, este estudo avaliou a produção de hidrogênio por consórcio microbiano obtido de lodo granular e culturas puras de *Bacillus cereus*, *Enterobacter aerogenes* e *Enterococcus faecalis* em meio suplementado com glicose.

2 METODOLOGIA

2.1 CONSÓRCIO MICROBIANO

O consórcio microbiano utilizado foi proveniente de um lodo granular anaeróbio oriundo de uma estação de tratamento de efluente de indústria de óleo vegetal, situada no município de Esteio, RS. O lote foi mantido em refrigeração até o início dos experimentos. Os ensaios fermentativos foram realizados no Laboratório de Diagnostico Molecular, e as análises das frações líquidas e gasosas foram realizadas no Laboratório de Análises Ambientais da Universidade de Caxias do Sul.

2.2 ISOLADOS MICROBIANOS

Foram isolados os microrganismos *E. faecalis* e *B. cereus* do consórcio microbiano descrito acima. Estas bactérias foram avaliadas isoladamente na produção de hidrogênio, juntamente com a linhagem comercial de *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048).

2.3 ENSAIO DE PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO

Inicialmente, foi realizado tratamento térmico por calor (90°C por 10 min) no inóculo de lodo granular, conforme Kim et al. (2006). Após o tratamento térmico, 0,25g do inóculo foram inoculados em frascos de 60 mL em triplicata, contendo 30 mL de meio de cultivo composto de glicose 5 g.L⁻¹; NH₄Cl 0,5; KH₂PO₄ 0,25; MgCl₂.6H₂O 0,3; FeCl₃ 0,025; NiSO₄ 0,016; CoCl₂ 0,025; ZnCl₂ 0,0115; CuCl₂ 0,0105; CaCl₂ 0,005 e MnCl₂ 0,015 (PRAKASHAM et al., 2009).

As culturas puras de *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus* e *Enterobacter aerogenes* foram crescidas por 24 horas em meio suplementado com glicose (descrito acima). Após o crescimento, foi realizada a leitura da D.O. (densidade óptica) através da absorvância em espectrofotômetro (Espectra Max 190) em 640 nm. A quantidade de inóculo colocada nos experimentos foi ajustada para 1.0 D.O. para cada isolado separadamente. Os ensaios foram realizados em frascos de vidro de 60 mL, contendo 30 mL de meio. Os frascos foram lacrados com tampa de borracha e lacre de alumínio e no meio foi aspergido gás nitrogênio por 5 minutos para garantir a anaerobiose. As culturas e consórcios foram mantidos em agitação orbital em *Shaker* (Ethik Technology) a 37°C por 48 horas. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

2.4 ANÁLISES QUÍMICAS

A composição do biogás foi avaliada através de cromatografia à gás (DaniMaster – Automatic Sample AS), equipado com detector de condutividade térmica (TCD – Thermal Conductivity Detector) e coluna CarboxenTM 1006 PLOT Capillary Column (30 m × 0.53 mm), tendo gás Nitrogênio ultra puro como gás de arraste com fluxo 10 mL/min. A temperatura do forno de 35°C, e a temperatura da coluna e do detector foram de 100°C.

A concentração de carboidratos totais das amostras provenientes dos bioensaios de produção de hidrogênio foi determinada por método colorimétrico de Dubois et al. (1956). Para a construção da curva padrão, foram efetuadas leituras com concentrações de 10 a 100 mg. L⁻¹ de glicose.

2.5 ANÁLISE DOS DADOS

O volume de hidrogênio foi convertido em *mmol* aplicando a equação dos gases ideais.

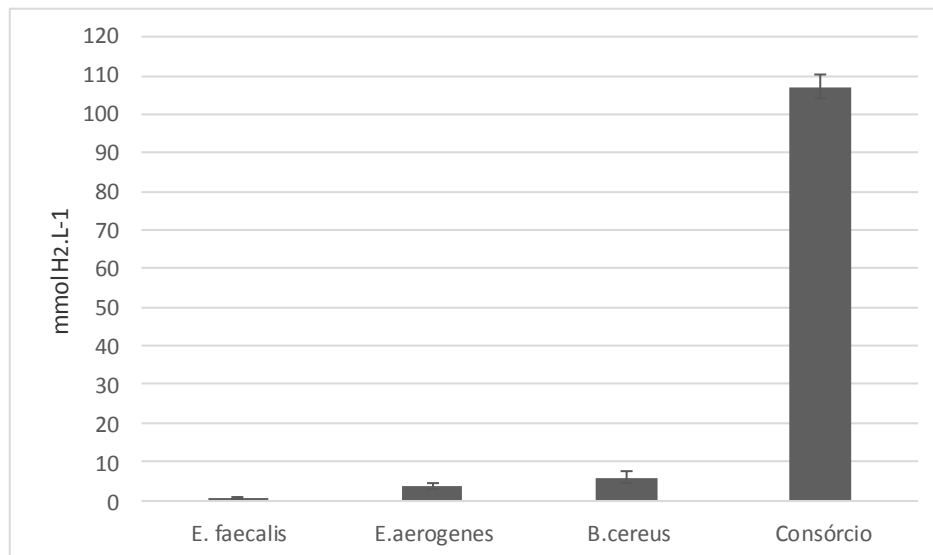
$$P \cdot V = n \cdot R \cdot T$$

Onde P é a pressão atmosférica em Caxias do Sul (0,918 atm), V é o volume de H₂ (litros), n é o número de mols de H₂, e R é a constante universal dos gases ideais (0,082 atm L. K⁻¹. mol), e T é a temperatura utilizada nos experimentos (K).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A produção de hidrogênio (Figura 1) para o consórcio microbiano teve uma elevada produção de 107,06 mmol H₂. L⁻¹, enquanto *B. cereus* produziu 5,81 mmol H₂. L⁻¹, *E. aerogenes* 3,82 mmol H₂. L⁻¹ e *E. faecalis* 0,57 mmol H₂. L⁻¹.

Figura 1 - Produção de Hidrogênio em meio suplementado com glicose



Fonte: Elaborado pelos autores.

A maior produção de hidrogênio no consórcio pode ser explicada devido a simbiose presentes nesta associação de diferentes microrganismos que compõe os grânulos do lodo. Esta associação se estabelece devido à relação fisiológica das diferentes rotas metabólicas de cada espécie, desempenhando diferentes funções no consórcio. Por isso, os consórcios são muito usados para a produção de hidrogênio (PHOWANA; DANVIRTUAL, 2014; SEM; SUTTAR, 2012; KAN, 2013). Yossan et al (2012), usando um consórcio obtido de efluente de óleo de palmeira obtiveram uma taxa de produção de hidrogênio de 74,54 mL . L⁻¹ . h⁻¹. Também, Davila-Vazquez et al. (2009), com a utilização de consórcios microbianos proveniente de lodo anaeróbico granular e soro de queijo como substrato, obtiveram 46,61 mmol H₂ . L⁻¹ . h⁻¹.

Enquanto que para as culturas puras, a produção foi muito reduzida, mostrando que este meio de cultivo não favorece a produção de hidrogênio por estes isolados. *B. cereus* foi descrito como produtor de hidrogênio no estudo de Patel et al. (2011) que usaram glicose como substrato obtendo rendimentos de 2 mols H₂ por mol de glicose. Este gênero de *Bacillus* está sendo bastante descrito na literatura para a produção de hidrogênio, devido sua capacidade de metabolizar vários substratos como vinhaça, glicerol e carboidratos para obtenção deste gás. Shah et al. (2016) utilizando cepas de *Bacillus* sp. obtiveram um rendimento de 0,16-1,53 mols de H₂ por mol de glicose consumida a partir de resíduos sólidos municipais, Das e Veziroglu (2001) apontam *Enterobacter aerogenes* como uma das principais bactérias produtoras de hidrogênio, capacidade descoberta por Tanisho, pesquisador japonês, na década de 80 em estirpes isoladas do solo, tem um rendimento teórico a partir da glicose de 10 mol H₂ . mol⁻¹ glicose (ZHANG et al., 2011) e Kapdan e Kargi, (2006) obtiveram rendimentos de 1,97 mmolH₂ . g⁻¹ glicose com *E. aerogenes*. Já o microrganismo *E. faecalis* é pouco descrito na literatura para a produção de hidrogênio, no entanto, Valdez-Vazquez et al. (2015) obtiveram uma produção de 79,54 mL de hidrogênio por grama de xilose usando três espécies de *Enterococcus*.

Os carboidratos simples são rapidamente degradados e usados para crescimento e posterior produção de hidrogênio por bactérias fermentativas. Nos bioensaios o consumo de carboidrato foi proporcional à produção de hidrogênio, sendo o maior consumo de glicose para o consórcio microbiano que utilizou 68,10% do carboidrato disponível, seguido por *B. cereus* com 14,91%, *E. aerogenes* 10,82% e *E. faecalis* com apenas 0,35%, conforme mostra

a Tabela 1. A glicose mostrou ser um substrato eficiente para a produção de hidrogênio pelos microrganismos consorciados, mas não tão eficiente para as culturas puras.

Tabela 1- Consumo de glicose nos bioensaios

Amostra	Carboidratos (mg. L ⁻¹) Inicial - final	Consumo (%)
<i>B. cereus</i>	703,09 – 622,32	14,91
<i>E. aerogenes</i>	665,51 – 593,48	10,82
<i>E. faecalis</i>	613,93 – 611,83	0,35
Consórcio microbiano	608,69 - 194,00	68,10

Fonte: Elaborado pelos autores.

Considerações Finais

Estes resultados mostram baixo potencial para a produção de hidrogênio por culturas puras utilizando glicose como fonte de carbono se comparado com o consórcio.

Referências

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

DAS, D. Advances in biohydrogen production processes: An approach towards commercialization. **International Journal of Hydrogen Energy**, p. 1-9, 2008.

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

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

HALLENBECK, P. C. Fermentative hydrogen production: principles, progress and prognosis. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, p. 7379-7389, 2009.

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

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

KOTAY, S. M.; DAS, D. Biohydrogen as a renewable energy resource- Prospects and potentials. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 3, p. 258-263, 2008.

LU, Y.; SLATER, F.R.; MOHD-ZAKI, Z.; PRATT, S.; BATSTONE, D.J. Impact of operating history on mixed culture fermentation microbial ecology and product mixture. **Water Sci. Technol**, v. 64, p. 760-765, 2011.

- MORIMOTO, M. et al. Biological production of hydrogen from glucose by natural anaerobic microflora. **International Journal of Hydrogen Energy**, p. 709-713, 2004.
- PATEL, S. K. S., SINGH, M., KALIA, V.C. Hydrogen and polyhydroxy butyrate producing abilities of bacillus spp. From Glucose in Two Stage System. **Indian Journal of Microbiology**, v. 51, n. 4, p. 418-423, 2011.
- PHOWANA, P.; DANVIRUTAI, P. Hydrogen production from cassava hydrolysate by mixed seed cultures: effects of initial ph, substrate and biomass concentration. **Biomass and Bioenergy**, v. 64, p. 1-10, 2014.
- PRAKASHAM, R. S.; BRAHMAIAH, P.; SATHISH, T.; SAMBASIVARAO, K. R. S. Fermentative biohydrogen production by mixed anaerobic consortia: Impact of glucose to xylose ratio, **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, p. 9354-9361, 2009.
- SEM, B.; SUTTAR, R. R. Mesophilic fermentative hydrogen production from sago starch processing wastewater using enriched mixed cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 20, p. 15558-1559, 2012.
- SHAH, T.; FAVARO, L.; ALIBARDI, L.; CAGNIN, A.; SANDON, R.; COSSU, S.; C ASELLA, M. Bacillus sp. strains to produce biohydrogen from the organic fraction of municipal solid waste. **Applied Energy**, v. 176, p. 116-124, 2016.
- VASCONCELOS DE SÁ, L. R.; CAMMAROTA, M. C.; FERREIRA-LEITÃO, V. S. Produção de hidrogênio via fermentação anaeróbia – aspectos gerais e possibilidade de utilização de resíduos agroindustriais brasileiros. **Química Nova**, v. 37, n. 5, p. 857-867, 2014.
- WANG, J.; WAN, W. Factors influencing fermentative hydrogen production: A review. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, p. 799-811, 2009.
- YOSSAN, S.; O-THONG, S.; PRASERTSAN, P. Effect of initial pH, nutrients and temperature on hydrogen production from palm oil mill effluent using thermotolerant consortia and corresponding microbial communities. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, p. 13806-13814, 2012.
- YU, H. Hydrogen production from rice winery wastewater in an upflow anaerobic reactor by using mixed anaerobic cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 27, n. 11-12, p. 1359-1365, 2002.
- ZHANG, C., XIANG, F., XING, X. Bioengineering of the Enterobacter aerogenes strain for biohydrogen production. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 8344-8349, 2011.

4.2 CAPÍTULO 2

LINHAGENS DE *BACILLUS CEREUS* E *ENTEROCOCCUS FAECALIS* ISOLADAS DE UM CONSÓRCIO MICROBIANO AUMENTAM A PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO E ÁCIDOS GRAXOS VOLÁTEIS UTILIZANDO VINHAÇA

Eder, Ana Silvia^{a*}; Magrini, Flaviane E.^a; Spengler, Andressa^a; Silva, Julia T.^a; Beal, Lademir L.^b; Paesi, Suelen^a

^a Universidade de Caxias do Sul, Instituto de Biotecnologia, Laboratório de Diagnóstico Molecular.

^b Universidade de Caxias do Sul, Laboratório de Tecnologias Ambientais.

***Correspondência do Autor:** Universidade de Caxias do Sul, Instituto de Biotecnologia, Laboratório de Diagnóstico Molecular. Endereço: Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130 -CEP 95070-560 - Caxias do Sul, RS- Brazil. Fone: +55 54 3218-2665. E-mail: ansieder@hotmail.com

Resumo

O hidrogênio é uma forma alternativa, limpa e renovável de energia. A produção microbiológica de hidrogênio tem grande potencial na utilização resíduos agroindustriais como substrato, contribuindo para uma destinação adequada no meio ambiente. A vinhaça é um subproduto da indústria do etanol obtido em uma proporção de 13 a 15 litros de vinhaça por litro de etanol. O aumento na produção de hidrogênio é requerido para que o processo seja economicamente viável. As alternativas de fermentação anaeróbica com culturas puras, co-culturas, consórcios microbianos ou bioaugmentação podem transformar a vinhaça em produtos de interesse biotecnológico como hidrogênio e ácidos graxos voláteis (AGVs). Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi comparar a produção de hidrogênio e AGVs por *B. cereus*, *E. aerogenes* e *E. faecalis* isolados, em co-culturas e em bioaugmentação, utilizando vinhaça como substrato. A produção de hidrogênio foi medida em ensaios usando frascos de 60 mL contendo vinhaça em distintas concentrações com pH inicial 6,0 em diferentes bioensaios: 1) linhagens isoladas (*B. cereus*, *E. aerogenes* e *E. faecalis*); 2) consórcio microbiano; 3) co-culturas (*B. cereus* + *E. aerogenes* + *E. faecalis*), (*B. cereus* + *E. aerogenes*), (*B. cereus* + *E. faecalis*), (*E. aerogenes* + *E. faecalis*); 4) bioaugmentação (Consórcio + *B. cereus*), (Consórcio + *E. aerogenes*), (Consórcio + *E. faecalis*). A maior produção de hidrogênio ocorreu com vinhaça na concentração de 100%, sendo 85,41 mmolH₂. L⁻¹ para *B. cereus*, seguido de 79,02 mmolH₂. L⁻¹ para *E. faecalis*. O desempenho na produção de hidrogênio do sistema de co-culturas *E. faecalis* + *E. aerogenes* (65 mmolH₂.L⁻¹) foi maior que o consórcio microbiano (54,16 mmolH₂.L⁻¹) porém, menor que as linhagens *B. cereus* e *E. faecalis* isoladas. O consórcio microbiano produziu mais hidrogênio do que quando recebeu a bioaugmentação das linhagens isoladas *B. cereus*, *E. aerogenes* e *E. faecalis*. O *B. cereus* foi a linhagem isolada que mais gerou AGVs, e o ácido butírico (1.131 mg. L⁻¹) foi o mais produzido, enquanto que o ácido acético foi predominante nos ensaios de co-cultura e bioaugmentação. Estes resultados mostram o potencial das linhagens isoladas *B. cereus* e *E. faecalis* na produção de hidrogênio e AGVs utilizando como substrato vinhaça, resíduo com alto potencial poluidor, dando assim uma destinação sustentável ao resíduo.

Palavras-chave: co-cultura, bioaugmentação, hidrogênio, vinhaça, *B. cereus*, *E. faecalis* e *E. aerogenes*.

Abstract

Hydrogen is an alternative, clean and renewable form of energy. The microbiological production of hydrogen has great potential in the use of agroindustry residues as substrate,

contributing to a suitable destination in the environment. Vinasse is a by-product of the ethanol industry obtained in a ratio of 13 to 15 liters of vinasse per liter of ethanol. The increase in hydrogen production is required for the process to be economically feasible. Anaerobic fermentation alternatives with pure cultures, co-cultures, microbial consortia or bioaugmentation can transform vinasse into products of biotechnological interest such as hydrogen and volatile fatty acids (VFAs). Thus, the objective of this work was to compare the production of hydrogen and AGVs by *B. cereus*, *E. aerogenes* and *E. faecalis* isolated, in co-cultures and in bio-accumulation, using vinasse as substrate. Hydrogen production was measured in assays using 60 mL vials containing vinasse at different concentrations with initial pH 6.0 in different bioassays: 1) isolated strains (*B. cereus*, *E. aerogenes* and *E. faecalis*); 2) microbial consortium; 3) co-cultures (*B. cereus* + *E. aerogenes* + *E. faecalis*), (*B. cereus* + *E. aerogenes*), (*B. cereus* + *E. faecalis*), (*E. aerogenes* + *E. faecalis*); 4) bioaugmentation (Consortium + *B. cereus*), (Consortium + *E. aerogenes*), (Consortium + *E. faecalis*). The highest hydrogen production occurred with vinasse at 100% concentration, being 85.41 mmolH₂. L⁻¹ for *B. cereus*, followed by 79.02 mmol H₂. L⁻¹ for *E. faecalis*. The performance in the hydrogen production of *E. faecalis* + *E. aerogenes* (65 mmolH₂.L⁻¹) was higher than the microbial consortium (54.16 mmolH₂.L⁻¹), but lower than the *B. cereus* and *E. faecalis* isolates. The microbial consortium produced more hydrogen than when it received the bioaugmentation of the isolated strains *B. cereus*, *E. aerogenes* and *E. faecalis*. *B. cereus* was the most isolated strain that generated AGVs, and butyric acid (1,131 mg L⁻¹) was the most produced, whereas acetic acid was predominant in the co-culture and bioassay assays. These results show the potential of the isolated strains *B. cereus* and *E. faecalis* in the production of hydrogen and AGVs using as vinasse substrate, residue with high polluting potential, thus giving a sustainable destination to the residue.

Keywords: co-culture, bioaugmentation, hydrogen, vinasse, *B. cereus*, *E. faecalis* and *E. aerogenes*

1 INTRODUÇÃO

O aumento das necessidades energéticas mundiais e a diminuição das reservas de combustíveis fósseis, aliado aos problemas ambientais relacionados à gestão de resíduos orgânicos, definem a necessidade de estratégias de energias renováveis (HALLENBECK, 2009).

Buscando satisfazer esta demanda energética, o hidrogênio surge como uma forma alternativa de energia limpa, pois além de possuir uma grande eficiência energética, produz apenas água como produto da sua combustão (MATHEWS; WANG 2009).

O etanol a partir da cana-de-açúcar surgiu como uma alternativa aos combustíveis fósseis, contudo, para cada litro de etanol produzido, são gerados 13 a 15 litros de vinhaça, que é o principal resíduo líquido desta produção. A vinhaça possui elevada Demanda Química de Oxigênio (DQO), entre 17 e 50 g.L⁻¹, e grandes concentrações de fósforo e potássio, sendo este resíduo normalmente utilizado como fertilizante no próprio cultivo da cana-de-açúcar (NOGUEIRA et al., 2015). Entretanto, o uso da vinhaça na fertirrigação, causa acidificação do solo, provocando a redução da produtividade e infiltração nos lençóis freáticos (CORAZZA, 2000), promovendo diversos problemas ambientais. Nos países tropicais, um grande volume de vinhaça é produzido a cada safra, podendo ser destinado à produção de hidrogênio através da fermentação, tornando o processo sustentável e ambientalmente correto. A vinhaça já vem sendo estudada quanto ao seu potencial na produção de hidrogênio sendo bastante promissora, quando comparada a outros resíduos orgânicos, tanto com culturas isoladas quanto com consórcios microbianos (FERNANDES et al., 2010; LAZZARO et al. 2014; SYDNEY et al. 2014; FERRAZ JÚNIOR

et al. 2015).

Na fermentação anaeróbia os carboidratos são convertidos em H₂, CO₂, CH₄ álcoois e ácidos orgânicos. Os ácidos orgânicos (ácidos graxos voláteis) acético e butírico são os principais produtos da fermentação (LAZZARO et al., 2015), outros co-produtos também são formados de acordo com o microrganismo, substrato e tipo de fermentação e podem se tornar valiosos substratos para produtos finais mais elaborados (FU; HOLTZAPPLE, 2010).

O processo fermentativo para a produção de hidrogênio pode ser obtido por culturas puras, co-culturas ou por consórcios microbianos (DAS, 2001; LEVIN, 2004). Entende-se aqui que consórcio microbiano é a associação natural entre microrganismos obtidos do meio ambiente, como por exemplo, lodo de estação de tratamento, águas residuárias, amostras de solo, entre outros (MAINTINGUER et al., 2015), e co-cultura a união *in vitro* de isolados microbianos em iguais proporções no processo fermentativo (PACHAPUR et al, 2015). Entre os principais microrganismos produtores de hidrogênio descritos na literatura, encontramos os gêneros *Clostridium*, *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Bacillus* (KAWAGOSHI, 2005). Os gêneros *Bacillus* e *Enterobacter* são muito utilizados pela capacidade de metabolizar um largo espectro de substratos e por produzirem diversas enzimas que auxiliam na hidrólise e aceleram a conversão do substrato em hidrogênio (PREETI, 2017; PATEL, 2011). O gênero *Enterococcus* é pouco descrito na literatura como produtor de hidrogênio, no entanto Adav *et al.* (2009), utilizando co-cultura de *C. butyricum* com *Enterococcus saccharolyticus* (degradador de celulose), obteve um rendimento de 2,19 mol H₂. Hexose⁻¹.

É bem conhecida a produção de hidrogênio por consórcios microbianos, devido à facilidade de manuseio, pela utilização de meios não estéreis, reduzindo o custo global da fermentação (SÁ et al., 2014). Para incrementar a produção de hidrogênio, na literatura, já foram descritos processos de bioaugmentação empregando culturas que misturam microrganismos anaeróbios estritos e facultativos (QIAN et al., 2011; NZILA, 2014) ou utilizando somente microrganismos anaeróbios estritos (GENG et al., 2010).

Dessa forma, este estudo busca comparar a produção de hidrogênio de consórcio microbiano, bactérias isoladas, co-culturas e na bioaugmentação utilizando vinhaça como fonte de carbono.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. INÓCULO

O inóculo foi obtido de lodo anaeróbio granular oriundo de reator anaeróbio de efluente de uma indústria de hidrolisado de proteínas de soja (Esteio, RS). Inicialmente, foi realizado o pré-tratamento térmico no inóculo granular, 90°C por 10 minutos conforme Kim et al. (2006), para a eliminação das bactérias consumidoras de hidrogênio.

2.2 ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS

O isolamento dos microrganismos do consórcio microbiano foi realizado em placa de Petri contendo meio de cultivo PYG sólido g L⁻¹: (glicose 10; extrato de carne 5; extrato de levedura 5; peptona de carne 5). As placas foram mantidas em jarras de anaerobiose e incubadas a 37°C até a observação do aparecimento das colônias. A purificação das bactérias foi realizada por esgotamento dessas colônias e as linhagens foram armazenadas em tubo inclinado contendo meio PYG à 4°C e em glicerol 30% e mantidos em ultrafreezer -80°C. Os microrganismos usados nos bioensaios foram *Enterococcus faecalis* e *Bacillus cereus*, isolados deste consórcio microbiano e *Enterobacter aerogenes* (cepa comercial ATCC 13048)

foi usada como controle positivo.

2.3 SUBSTRATO

Como substrato foi utilizado vinhaça de cana-de-açúcar proveniente da Indústria de Etanol (Guarani-Unidade Industrial Andrade- Pitangueiras/SP, Brasil). A vinhaça foi coletada em setembro de 2015 e mantida em refrigeração no Laboratório de Tecnologia Ambiental (LATAM) da UCS. Antes de ser utilizada foi centrifugada por 5 minutos para a retirada de sólidos grosseiros. Nos ensaios, foi utilizada vinhaça em diferentes concentrações (30, 50, 70 e 100%) suplementada com sais nitrogenados $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, sulfato de amônio em $0,21\text{mg. L}^{-1}$ e $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$, fosfato de amônio em $0,18\text{ mg. L}^{-1}$, conforme Pirt e Callow (1958). As análises da composição química da vinhaça foram realizadas de acordo com Standart methods (APHA, 2005) e estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição da vinhaça utilizada nos experimentos

Parâmetros	Concentração (mg/L)
Cálcio Total	364,80
Demanda Química de Oxigênio	20,84
Fósforo Total	58,78
Magnésio Total	169,92
Nitrogênio Amoniacal	38,97
Nitrogenio Total	394,69
Potássio	2537,65
Sódio	50,47
Sulfatos	n.d.
Ferro	11,73
Manganês	1,67
Sólidos Suspensos Total	3480
Sólidos Suspensos Voláteis	2860
Sólidos Suspensos Fixos	250
pH	4,22

2.4 ENSAIOS PARA PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO

A produção de hidrogênio das linhagens isoladas, co-culturas, consórcio microbiano e consórcio + bioaumentação, foram avaliados em frascos de vidro com volume de 60 mL, contendo vinhaça suplementada com sais nitrogenados em diferentes concentrações e pH inicial de 6,0. No ensaio do consórcio foi adicionado 0,34 g do inóculo granular após o pré-tratamento térmico. Os frascos foram lacrados com tampa de borracha e lacre de alumínio e o meio aspergido com gás nitrogênio por 5 minutos para garantir a anaerobiose. Os frascos foram mantidos em agitação orbital em a 37°C por 48 horas.

Os isolados de *B. cereus*, *E. faecalis* e *E. aerogenes* foram crescidos no meio de vinhaça, mantidos em agitação orbital em a 37°C por 24 h. Após, foram inoculados conforme metodologia descrita acima. A quantidade de inóculo foi determinada pela leitura da absorbância em espectrofotômetro a 600 nm e ajustada para 1 D.O. (densidade óptica). Nos

experimentos de co-culturas os isolados foram crescidos e realizados os seguintes ensaios: 1) *B. cereus* + *E. aerogenes* + *E. faecalis*; 2) *B. cereus* + *E. aerogenes*; 3) *B. cereus* + *E. faecalis*; 4) *E. aerogenes* + *E. faecalis*. As co-culturas foram construídas com o volume correspondente da densidade óptica das células, sendo 1:1:1 para a associação de três isolados e 1:1, para dois isolados (Marone et al., 2012). Também foi avaliada, a bioaumentação do consórcio microbiano, com estes isolados, conforme metodologias descritas anteriormente, sendo: 1) Consórcio + *B. cereus*; 2) Consórcio + *E. aerogenes*; 3) Consórcio + *E. faecalis* (Kumar et al. 2015). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

2.5 ANÁLISES QUÍMICAS

O monitoramento da produção de hidrogênio foi realizado a partir de amostras do gás do *headspace* em cromatógrafo a gás (DaniMaster – AutomaticSample AS), equipado com detector de condutividade térmica (TCD – Thermal Conductivity Detector) e coluna Carboxen™ 1006 PLOT Capillary Column (30 m × 0.53 mm), tendo gás Nitrogênio ultrapuro como gás de arraste sob fluxo de 10mL/min. A temperatura do forno foi de 35°C, e a temperatura da coluna e do detector de 100°C. Para a confecção da curva de calibração foram injetados volumes de 10, 25, 50, 100, 150, 200 e 250 microlitros de gás hidrogênio puro.

As análises de ácidos graxos voláteis (ácido acético, propiônico, butírico, isobutírico, valérico e isovalérico) foram realizadas em cromatógrafo gasoso (GC/MS, Shimadzu – QP2010 Ultra), equipado com coluna DN-FFAP (30 m x 0,32 mm x 0,25 µm) com detector de ionização de chama (FID - *Flame Ionization Detector*), tendo Hélio como gás de arraste, além de ar sintético e nitrogênio como gases auxiliares. A temperatura da coluna foi de 100°C por 5 min, aumentando 7°C por min até 200°C. As temperaturas do injetor e do detector foram de 200° e 250°C, respectivamente.

A concentração de carboidratos totais das amostras provenientes dos bioensaios foi determinada por método colorimétrico de Dubois et al. (1956). Para a construção da curva padrão, foram efetuadas leituras com concentrações de 10 a 100 mg. L⁻¹ de sacarose.

2.6 ANÁLISE DE DADOS

O volume de hidrogênio obtido foi convertido em mmol aplicando a equação dos gases ideais. Onde P é a pressão atmosférica em Caxias do Sul (0,918 atm), V é o volume de H₂ (litros), n é o número de mols de H₂, e R é a constante universal dos gases ideais (0,082atm L/K.mol), e T é a temperatura utilizada nos experimentos (K).

$$P \cdot V = n \cdot R \cdot T$$

Os dados da produção de hidrogênio foram tratados no software GraphPad Prism 5.0 e submetidos à análise de variância e ao teste Tukey $P \leq 0,05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

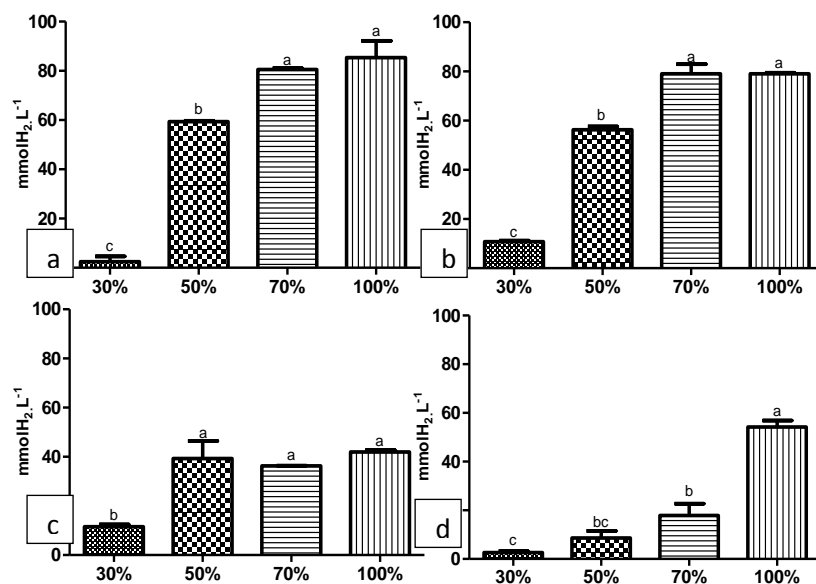
3.1 PRODUÇÃO DE H₂ POR LINHAGENS ISOLADAS

Em todos os experimentos houve produção de hidrogênio nas diferentes concentrações de substrato (Figura 1). Para o isolado *B. cereus* (Figura 1a) a menor produção

foi na concentração de 30% ($2,43 \text{ mmolH}_2 \cdot \text{L}^{-1}$) e a maior em 100% de vinhaça ($85,41 \text{ mmolH}_2 \cdot \text{L}^{-1}$). *E. faecalis* obteve produção de hidrogênio semelhante nas concentrações de 50 e 100% ($79 \text{ mmolH}_2 \cdot \text{L}^{-1}$) (Figura 1b), esses resultados são superiores a produção de hidrogênio de *E. aerogenes* (Figura 1c) ($39,32 \text{ mmolH}_2 \cdot \text{L}^{-1}$, $36,27 \text{ mmolH}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ e $41,95 \text{ mmolH}_2 \cdot \text{L}^{-1}$) nas concentrações de 50, 70 e 100% de vinhaça, respectivamente.

O consórcio microbiano também seguiu o mesmo padrão de produção dos isolados (Figura 1d), aumentado a produção de hidrogênio com o aumento da concentração de vinhaça, sendo a maior produção $54,16 \text{ mmolH}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ com vinhaça na maior concentração (100%). Resultado semelhante encontrado por Lazaro et al. (2014), que observaram aumento da produção de hidrogênio com o aumento da concentração de vinhaça em ensaios mesófilos utilizando consórcios microbianos granular. Kargi et al. (2012) estudaram a influência da concentração inicial de soro de queijo na produção de hidrogênio, aumentando de $3,22 \text{ mmolH}_2$ para $10,34 \text{ mmolH}_2$ com o aumento da concentração ($5,2\text{--}20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) de açúcares totais pôr em 360 horas de ensaio. Li et al. (2008) a partir de diversas concentrações de glicose (5, 7,5, 10 e $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) e diferentes valores de pH (5, 6, 7) obtiveram o melhor rendimento nas maiores concentrações em pH 7,0.

Figura 1 - Produção de hidrogênio em diferentes concentrações de vinhaça



a) *Bacillus cereus* b) *Enterococcus faecalis* c) *Enterobacter aerogenes* d) Consórcio microbiano

Segundo Fernandes et al. (2010) dentre substratos estudados para a produção de hidrogênio, a vinhaça foi o que apresentou maior rendimento na produção deste gás ($25 \text{ mmolH}_2 \cdot \text{g}^{-1}$ (DQO)). Sydney et al. (2014), utilizando vinhaça suplementada com caldo de cana, obtiveram uma produção de $2.25 \text{ LH}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ de meio de cultivo com consórcio microbiano obtido de fezes de morcegos frutíferos. A vinhaça é um resíduo agroindustrial com alta taxa de matéria orgânica, rica em carboidratos (simples e complexos), proteínas, lipídeos e sais minerais. Ela possui potencial para desenvolvimento de microrganismos anaeróbios estritos ou facultativos sejam eles isolados ou consorciados. Podemos observar que as altas concentrações de vinhaça não inibiram a produção de hidrogênio mostrando que as elevadas taxas de sais como potássio, cálcio e nitrogênio não atuam como inibidores bem como os grandes volumes de sólidos suspensos totais, fixo e voláteis (Tabela 1).

O gênero *Bacillus* é frequentemente descrito como produtores de hidrogênio,

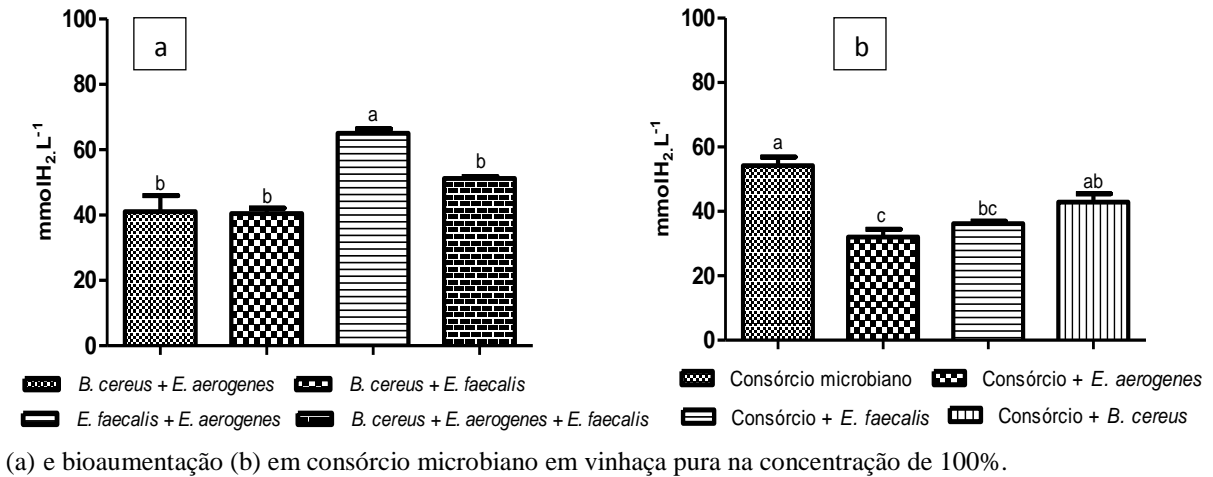
fermentando diversos tipos de carboidratos (KOTAY; DAS, 2007). Os *Bacillus* têm bom crescimento em condições aeróbicas e podem produzir H₂ sob condições anaeróbicas (VOORT; ABEE, 2009), cresce em condições mínimas e utiliza uma ampla gama de substratos, sendo um biocatalisador ideal para a degradação de lignocelulose (KOTAY; DAS, 2007). Patel et al. (2011) utilizando *B. cereus* e glicose como substrato, obteve um rendimento de 2 mols H₂ por mol de glicose. Shah et al. (2016) usando cepas de *Bacillus sp.* obtiveram um rendimento de 1,53 mol de H₂ por mol de glicose consumida a partir de resíduos sólidos municipais como substrato. Poletto et al. (2014) utilizando meio enriquecido de glicerol residual 1,5% e consórcio proveniente de lodo de estações de tratamento, identificou *Bacillus amyloliquefaciens* como produtor de hidrogênio com um rendimento de 0,5 mol H₂.mol⁻¹ de glicerol. Shin et al. (2004), utilizaram *Bacillus sp* obtendo uma faixa de produção de hidrogênio de 0,9 – 1,8 molH₂. mol hexose⁻¹ utilizando resíduos alimentares como substrato. Na literatura não foram encontrados trabalhos com *B. cereus* produzindo hidrogênio usando vinhaça, porém Patel et al. (2011) obtiveram uma ótima produção com *B. cereus* de 2 mols H₂ por mol de glicose.

O gênero *Enterococcus* também é citado em diversos trabalhos como participante, em grande abundância, de consórcios microbianos produtores de hidrogênio (GUO *et al.* 2016; Li et al. 2016). Valdez-Vazquez et al. (2015), encontraram uma produção máxima de 79,54 mL de hidrogênio por grama de xilose como fonte de carbono em um consórcio utilizando três espécies de *Enterococcus*. O gênero *Enterobacter* tem sido largamente estudado, por ser um anaeróbio facultativo, com excelentes rendimentos de hidrogênio na fermentação de carboidratos (CONVERTI, 2002; KAPDAN; KARGI, 2006) A espécie *E. aerogenes* é bem descrita como excelente produtor de hidrogênio, por ser anaeróbio facultativo, ter elevada taxa de crescimento, ter bom desempenho em regime mesófilo e apresentar um rendimento teórico de produção de hidrogênio, a partir de glicose, de aproximadamente 10 mols H₂ por mol de glicose (ZHANG et al., 2011). Das (2001) aponta *E. aerogenes* como uma das principais bactérias produtoras de hidrogênio. Kapdan e Kargi (2006) obtiveram rendimentos de 1,97mmolH₂.g⁻¹glicose com este microrganismo. Contudo, em nosso estudo, este microrganismo não mostrou este mesmo desempenho, sendo que a maior produção de hidrogênio (41,95 mmolH₂. L⁻¹) foi 50% inferior à produção de *B. cereus* nas mesmas condições avaliadas.

3.2 PRODUÇÃO DE H₂ POR CO-CULTURAS E BIOAUMENTAÇÃO

Estratégias usando duas ou mais linhagens são alternativas para aumentar a produção de hidrogênio, os ensaios da Figura 2 mostram os resultados dos bioensaios com co-culturas na produção de hidrogênio. A maior produção de hidrogênio nos ensaios com co-culturas (Figura 2a) foi para *E. faecalis* + *E. aerogenes* (65 mmolH₂. L⁻¹), mostrando que a associação entre estes dois microrganismos foi mais favorável para a produção de hidrogênio. As co-culturas *B. cereus* + *E. aerogenes* (41,06 mmolH₂. L⁻¹), *B. cereus* + *E. faecalis* (40,44 mmolH₂. L⁻¹) foram similares à produção de *B. cereus* + *E. aerogenes* + *E. faecalis* (51,17 mmolH₂. L⁻¹).

Figura 2 - Produção de hidrogênio de co-culturas de *B. cereus*, *E. aerogenes* e *E. faecalis*

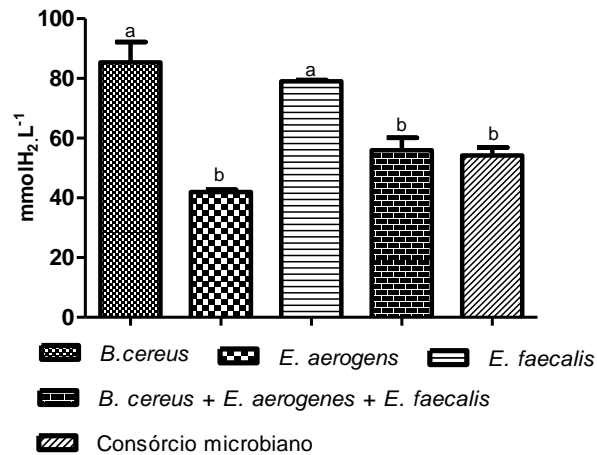


A bioaugmentação do consórcio microbiano com os três isolados é mostrada na Figura 2b, onde a produção de hidrogênio do consórcio + *E. aerogenes* (33,76 mmolH₂.L⁻¹), consórcio + *E. faecalis* (36,19 mmolH₂.L⁻¹) foi inferior ao do consórcio microbiano sem bioaugmentação (54,16 mmolH₂.L⁻¹). Já a produção do consórcio + *B. cereus* (42,83 mmolH₂.L⁻¹), foi superior às demais e estatisticamente igual à do consórcio microbiano e do consórcio + *E. faecalis* (36,19 mmolH₂.L⁻¹). Neste trabalho, foi evidenciado um sinergismo negativo, destes microrganismos nos ensaios em co-culturas dos isolados e bioaugmentação do consórcio microbiano, ao contrário de outros trabalhos na literatura, que a adição de anaeróbios facultativos em consórcios microbianos melhora o rendimento da produção de hidrogênio (MARONE et al., 2012).

Analisando todas as estratégias para o aumento da produção de hidrogênio, foi possível ver (Figura 3) que os microrganismos isoladamente são mais eficientes do que eles associados em co-cultura, pelo menos nas condições experimentais com 100% de vinhaça. Por outro lado, ensaios com os isolados *B. cereus*, *E. aerogenes* e *E. faecalis* associados em co-cultura, mostraram uma produção de hidrogênio de 51,17 mmolH₂.L⁻¹, significativamente igual ($P \leq 0,05$) à obtida pelo consórcio microbiano na mesma concentração de substrato, mas também inferior à produção dos microrganismos isoladamente (Figura 3).

A comparação da produção de hidrogênio entre os isolados e o consórcio microbiano, é um resultado que pode auxiliar no entendimento do papel dos diferentes microrganismos presentes no consórcio. O resultado obtido pode ser explicado, possivelmente, por que quando os microrganismos estão consorciados, existem reações sinérgicas que convertam os componentes da vinhaça em outros produtos que não o hidrogênio, desviando para rotas metabólicas de outros co-produtos da fermentação anaeróbica. Ou ainda, nos consórcios, estejam presentes microrganismos produtores e consumidores de hidrogênio, que mesmo após o pré-tratamento térmico, sejam mantidas bactérias metanogênicas e homoacetogênicas, que consomem hidrogênio (CASTELLÓ et al. 2018).

Figura 3 - Produção de hidrogênio de *B. cereus*, *E. aerogenes* e *E. faecalis* isolados e em co-cultura (*B. cereus* + *E. aerogenes* + *E. faecalis*) e de consórcio microbiano em vinhaça na concentração de 100%.



Muitos trabalhos descrevem o aumento do rendimento de hidrogênio utilizando co-culturas de *B. cereus* com outras enterobactérias *Citrobacter* sp., *E. cloacae* e *Klebsiella* sp. (PATEL et al., 2011). Também são relatados aumentos da produção de hidrogênio com co-culturas de *Bacillus coagulans*, *Citrobacter* e *Enterobacter cloacae* (KOTAY et al., 2010). Ainda, outros utilizam a combinação de microrganismos anaeróbios estritos como os *Clostridium* e anaeróbios facultativos, como as espécies de *Enterobacter* e *Bacillus*, que consomem o oxigênio e aumentam a eficiência da produção de hidrogênio (CHANG et al., 2008; CHOU et al., 2011). Geng et al. (2010) utilizaram co-culturas de *Clostridium thermocellum* e *Clostridium thermopalmarium* obtiveram uma produção de hidrogênio de 1,387 mL de H₂. L⁻¹ sob condições otimizadas, superior ao obtido pelas culturas puras destes mesmos microrganismos, resultado inverso ao ocorrido neste experimento onde as culturas puras produziram mais hidrogênio que associadas em co-cultura.

No entanto, Hsiao et al. (2009) utilizando co-culturas de *C. tyrobutyricum* e *C. sporospaeroides* obtiveram uma menor produção de hidrogênio (0,7 mLH₂. L⁻¹.h⁻¹), do que juntando as espécies *C. pasteurianum* e *C. sporospaeroides* (6,2 mL H₂. L⁻¹.h⁻¹), concluindo que *C. tyrobutyricum* ou *C. pasteurianum* produtores de hidrogênio podem ser usados em co-cultura com *C. sporospaeroides* que desempenha importante papel na degradação de carboidratos e glutamato. Patel et al. (2014) estudaram co-culturas de *B. cereus*, *Enterobacter cloacae* e *Klebsiella* sp. e obtiveram um rendimento de e 3 molH₂ por mol de glicose, rendimento que teve uma queda para 0,36 molH₂ por mol de glicose quando *B. cereus* foi removido da cultura. Portanto, mesmo que todos os microrganismos presentes em uma co-cultura tenham a capacidade de produzir hidrogênio não significa que a simbiose entre eles seja um fator que favoreça a produção deste gás, como foi mostrado em nossos experimentos.

Ainda, talvez seja interessante em trabalhos futuros avaliar diferentes concentrações de inóculo destes isolados, a fim de encontrar uma concentração celular ideal para que ocorra um sinergismo positivo e melhore o rendimento de hidrogênio. Pachapur et al. (2015) revisando muitos estudos, concluiu que uma boa produção de hidrogênio, depende de quem são os microrganismos da co-cultura, do tipo de substrato e das condições de fermentação. O exemplo de diferentes substratos, a revisão mostrou que os resíduos orgânicos, monossacarídeos e ácidos orgânicos foram os renderam maior produção de hidrogênio. Segundo os autores, a composição dos substratos estimula interações enzimáticas hidrolíticas e selecionam os metabolismos que geram hidrogênio na co-cultura (PACHAPUR et al., 2015).

3.3 CONSUMO DE CARBOIDRATOS TOTAIS NA PRODUÇÃO DE H₂

De acordo com Hawkes et al. (2002), os carboidratos apresentam-se como fonte preferencial de carbono orgânico para a produção de hidrogênio por meio da fermentação. A concentração de carboidrato em um determinado resíduo é um fator indicativo da sua potencialidade em produzir hidrogênio por via biológica (FANG, 2006). Em nossos bioensaios, observou-se que *B. cereus* teve seu maior consumo em vinhaça na concentração de 30% (42%), seguido por *E. faecalis*, o maior consumo de carboidratos totais foi na concentração de 70% (48,8%) (Tabela 2).

Já *E. aerogenes* teve o menor consumo de carboidratos (5-22%). Tanto para os sistemas de co-cultura e bioaugmentação o consumo de carboidratos totais não ultrapassou 38% para todas as concentrações de vinhaça. Por outro lado, o consórcio microbiano apresentou o maior consumo de carboidratos totais em relação aos demais ensaios, sendo os maiores consumos em 30 e 50% de vinhaça (78,1% e 90,9% respectivamente). A eficiência do consumo de carboidrato foi distinta entre as diferentes concentrações de vinhaça e também não corresponde à maior produção de hidrogênio. Esta particularidade dos microrganismos deve estar relacionada às suas características genéticas de repressão catabólica e permeabilidade celular do substrato. No entanto, o para o consórcio que é composto por uma maior diversidade microbiana, o consumo de carboidratos também foi maior, possivelmente, por contar com distintas rotas metabólicas, as quais facilitam a hidrólise dos diferentes compostos existentes na vinhaça.

Tabela 2 - Consumo de carboidratos totais em todos os ensaios de produção de H₂ em diferentes concentrações de vinhaça

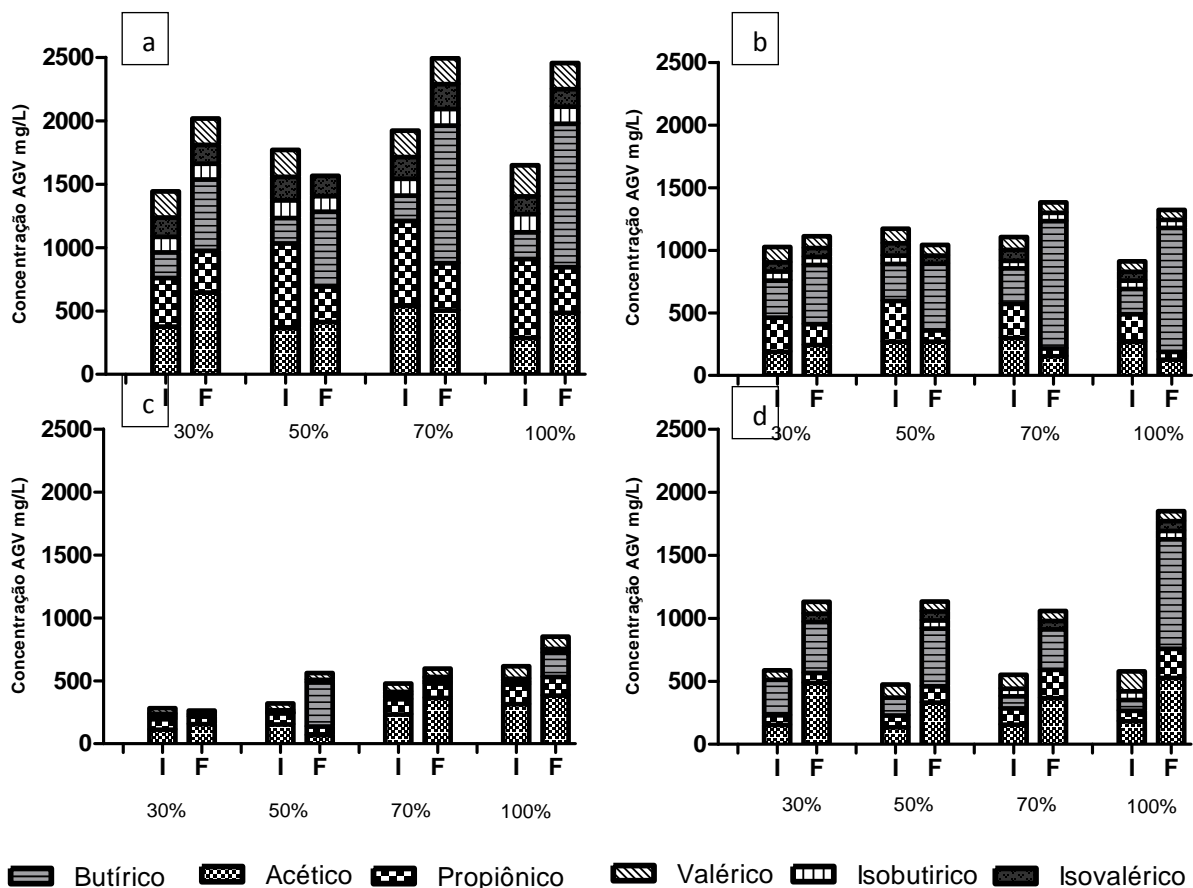
Amostra	Vinhaça (%)	Carboidratos (mg. L ⁻¹) Inicial / Final	Percentual de Consumo (%)
<i>B. cereus</i>	30	114,98 / 66,73	42,00
	50	121,71 / 82,90	31,88
	70	266,20 / 189,63	28,80
	100	301,87 / 245,92	18,53
<i>E. faecalis</i>	30	96,62 / 79,32	17,90
	50	149,77 / 121,71	18,70
	70	353,27 / 180,72	48,84
	100	298,37 / 236,31	20,80
<i>E. aerogenes</i>	30	98,55 / 79,40	19,43
	50	61,48 / 57,99	5,67
	70	202,74 / 179,14	11,64
	100	328,97 / 256,41	22,10
Consórcio microbiano	30	120,58 / 26,34	78,15
	50	168,39 / 15,24	90,94
	70	217,43 / 118,83	45,34
	100	375,30 / 212,71	43,32
<i>B. cereus</i> + <i>E. aerogenes</i> + <i>E. faecalis</i>	100	334,50 / 232,81	30,40
<i>B. cereus</i> + <i>E. aerogenes</i>	100	342,66 / 260,96	23,84
<i>B. cereus</i> + <i>E. faecalis</i>	100	392,48 / 301,43	23,19
<i>E. aerogenes</i> + <i>E. faecalis</i>	100	424,53 / 260,55	38,62
Consórcio + <i>B. cereus</i>	100	366,84 / 253,61	30,86
Consórcio + <i>E. aerogenes</i>	100	329,25 / 277,74	15,64
Consórcio + <i>E. faecalis</i>	100	307,11 / 258,68	15,76

3.4 PRODUÇÃO DE AGVs

Observou-se que na fase final dos experimentos com os isolados *B. cereus* e *E. faecalis*, e consórcio microbiano houve predominância da produção de ácido butírico, seguida por ácido acético, conforme Figura 4. As maiores produções dos ácidos acético e butírico foram para *B. cereus* (644 mg. L⁻¹ e 1.131 mg. L⁻¹, respectivamente), seguido da produção de ácido butírico para *E. faecalis* (988,56 mg. L⁻¹). Para *E. aerogenes*, houve predominância da rota metabólica acética nas concentrações de 70 e 100% de vinhaça (363 mg. L⁻¹ e 380 mg. L⁻¹, respectivamente).

A predominância destas rotas metabólicas coincide com as maiores produções de hidrogênio em 100% de vinhaça, porém quando há maior produção de H₂, há maior concentração de ácido butírico nas culturas puras (*B. cereus* e *E. faecalis*) e no consórcio, e ácido acético para *E. aerogenes*, o que demonstra as principais rotas utilizadas por estes microrganismos para a produção de hidrogênio, corroborando com outros autores (FERNANDES, 2010; KHANAL, 2004).

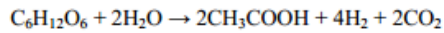
Figura 4 - Produção de ácidos graxos voláteis inicial (I) e final (F) em diferentes concentrações de vinhaça



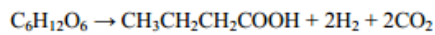
a) *Bacillus cereus* b) *Enterococcus faecalis* c) *Enterobacter aerogenes* d) Consórcio microbiano

As rotas metabólicas de produção de ácido acético e butírico produzem respectivamente 4 mols de H₂ (Equação 1) e 2 mols de H₂ (Equação 2) (LEVIN et al., 2004), pois a formação dos co-produtos lactato, etanol, butanol ou ácido butírico consome NADH, reduzindo o rendimento de hidrogênio. O rendimento de hidrogênio depende dos produtos

formados durante o processo fermentativo.



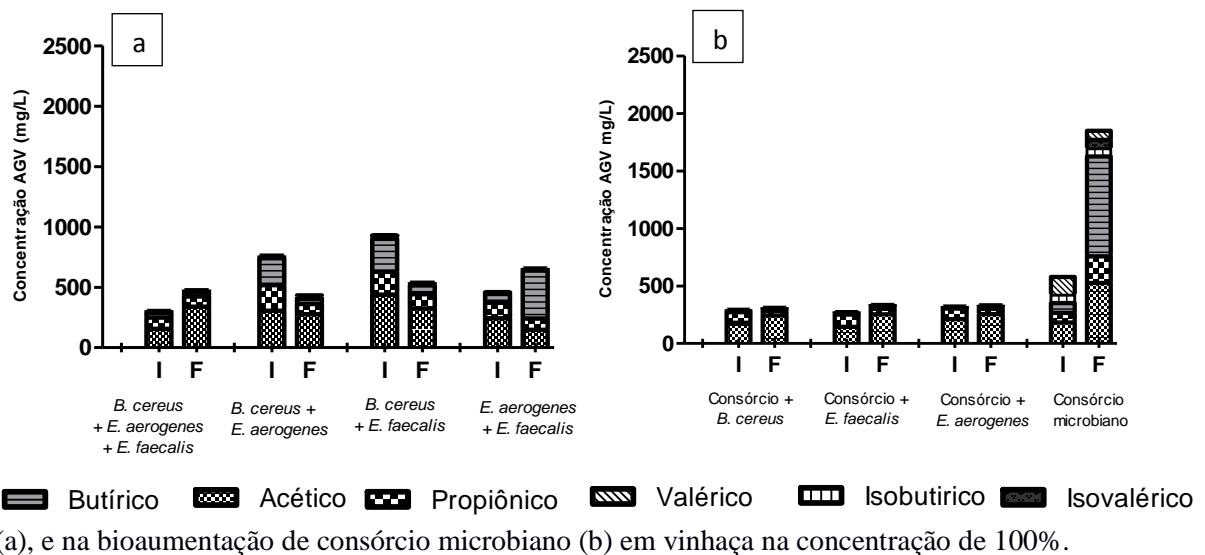
Equação 1



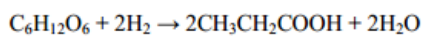
Equação 2

Nos experimentos com co-culturas (Figura 5a), observou-se predominância de ácido acético nos ensaios com *B. cereus* + *E. aerogenes* + *E. faecalis*; *B. cereus* + *E. aerogenes*; *B. cereus* + *E. faecalis*. No ensaio com *E. aerogenes* + *E. faecalis*, houve predominância da rota butírica na amostra final (F), corroborando com a maior produção de hidrogênio neste ensaio como descrito na Equação 1. Em geral, a produção de ácido acético foi similar à das culturas puras isoladamente, enquanto que a produção do ácido butírico foi bastante inferior. Nos ensaios de bioaumentação do consórcio (Figura 5b), também houve predominância da rota metabólica acética, não diferenciando entre as amostras iniciais e finais, evidenciando uma baixa interação entre estes microrganismos.

Figura 5 - Produção de ácidos graxos voláteis (I) e final (F) de *B. cereus*, *E. aerogenes* e *E. faecalis* associados em co-cultura



Nos ensaios com os isolados e co-culturas houve consumo de ácido propiônico (Figura 4 e 5), o que torna o processo mais eficiente, pois mostra que esta rota metabólica não foi favorecida, pois para a produção deste ácido ocorre o consumo de mols de hidrogênio (Equação 3) (LEVIN et al., 2004). Enquanto que no consórcio microbiano, houve aumento de ácido propiônico nas amostras finais das maiores concentrações de vinhaça, o que poderia explicar a baixa produção de hidrogênio nestes ensaios.



Equação 3

Os ácidos isobutírico, isovalérico e valérico foram produzidos em maiores quantidades pelo isolado *B. cereus*. E a menor concentração destes ácidos foi para *E. aerogenes*. É bem conhecido que concentrações de isovalerato e isobutirato no rúmen de animais são indicativos de fermentação de aminoácidos, os quais quando em altos teores,

favorecem o acúmulo de tais ácidos graxos voláteis, principal fator de redução do pH (VARGAS et al., 2001).

O monitoramento dos ácidos graxos nos permite saber a rota metabólica utilizada pelo microrganismo e prever desvios ou aperfeiçoar o processo de fermentação no sentido de obter uma maior produção de um ou outro ácido de interesse já que todos têm valor agregado e podem ser usados por indústrias químicas e de alimentos (LEITE et al., 2008).

4 CONCLUSÕES

Os avanços nos processos de produção de hidrogênio dependem entre outros fatores dos resíduos orgânicos, condições de fermentação e principalmente conhecer os consórcios microbianos envolvidos. Os resultados deste estudo mostram que o uso de vinhaça pura, sem diluição, é o mais indicado para a produção de hidrogênio tanto para linhagens isoladas como para consórcios microbianos. A comparação da eficiência da produção de hidrogênio, a partir da vinhaça, foi superior nas linhagens isoladas *B. cereus* e *E. faecalis* do que no consórcio microbiano.

O desempenho na produção de hidrogênio do sistema de co-culturas *E. faecalis* + *E. aerogenes* foi maior que o consórcio, porém menor que as linhagens *B. cereus* e *E. faecalis* isoladamente. A geração de hidrogênio, no processo anaeróbico dos consórcios e das linhagens, não está diretamente relacionada ao consumo de carboidratos totais da vinhaça. O consórcio microbiano produziu mais hidrogênio do que quando recebeu a bioaugmentação das linhagens isoladas de *B. cereus*, *E. faecalis* e *E. aerogenes*. O *B. cereus* foi o que mais gerou ácidos graxos voláteis e o ácido butírico, foi o mais produzido. A co-cultura (*B. cereus* + *E. faecalis*) destacou-se na produção de ácido acético. Estes resultados mostram o potencial das linhagens isoladas *B. cereus* e *E. faecalis* na produção de hidrogênio e ácidos graxos voláteis utilizando como substrato vinhaça, resíduo com alto potencial poluidor, dando assim uma destinação sustentável a esse substrato.

5 AGRADECIMENTOS

Este trabalho teve o apoio da Petrobrás e da Universidade de Caxias do Sul.

6 REFERÊNCIAS

ADAV, S. S.; LEE, D. J.; REN, N. Functional consortium for hydrogen production from cellobiose: concentration to extinction approach. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 2546 - 50, 2009.

AMORIM, E, L, C.; SADER, L.T.; SILVA, E.L. Effect of substrate concentration dark fermentation hydrogen production using an anerobic fluidized bed reactor. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, p. 1248-1263, 2012

APHA. **Standart methods for the examination of water and wastewater**. 20th edition. Washington: American Public Health Association, 2005.

BARROS, A. R.; SILVA, E. L. Hydrogen and ethanol production in anaerobic fluidized bed reactors: Performance evaluation for three support materials under different operating conditions. **Biochemical Engineering Journal**, v. 61, p. 59-65, 2012.

CASTELLO, E. et al. Possible causes for the instability in the H₂ production from cheese

whey in a CSTR. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 43, p. 2654-2665, 2018.

CHANG, J. J.; et al. Syntrophic co-culture of aerobic *Bacillus* and anaerobic *Clostridium* for biofuels and bio-hydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, p. 5137-5146, 2008.

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

CONVERTI, A.; PEREGO, P. Use of carbon and energy balances in the study of the anaerobic metabolism of *Enterobacter aerogenes* at variable starting glucose concentration. **Applied Microbiology and biotechnology**, v. 59, p. 3003-3009, 2002.

CORAZZA, R. I.; SALLES-FILHO, S. Soluções tecnológicas para o problema da vinhaça nos anos 80: um estudo sobre a formação de uma trajetória tecnológica. **XLIV Congresso da Sober**. Sociedade Brasileira de Economia e Sociologia Rural, 2000.

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

DOELSCH, E. et al. Characterization of organic matter of a soil and vinasse mixture during aerobic or anaerobic incubation. **Waste Management**, v. 29, p. 1929-1935, 2009.

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

FAN, Y. T. et al. Optimization of initial substrate and pH levels for germination of sporing hydrogen production anaerobes in cow dung compost. **Bioresource Technology**, v. 91, p. 189-193, 2004.

FANG, H. H. P.; ZHANG, T.; LI, C. Characterization of Fe-hydrogenase genes diversity and hydrogen-producing population in an acidophilic sludge. **Journal of Biotechnology**, v. 126, p. 357-364, 2006.

FERNANDES, B.S.; et al. Potential to produce biohydrogen from various wastewaters. **Energy for Sustainable Development**, v. 14, p. 143-148, 2010.

FERRAZ JÚNIOR, A. D. N.; ETCHEBEHERE, C.; ZAIAT, M. Mesophilic hydrogen production in acidogenic packed-bed reactors (APBR) using raw sugarcane vinasse as substrate. **Anaerobe**, v. 34, p. 94-105, 2015.

FU, Z.; HOLTZAPPLE, M. T. Anaerobic mixed-culture fermentation of aqueous ammonia-treated sugarcane bagasse in consolidated bioprocessing. **Biotechnology Bioenergy**, v. 106, p. 216-227, 2010.

GENG, A.; et al. Effect of key factors on hydrogen production from cellulose in co culture of *Clostridium thermocellum* and *Clostridium thermopalmarium*, **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4029-4033, 2010.

- GUO, Z. Y. R. et al. Bioaugmentation of *Hydrogenispora ethanolica* LX-B affects hydrogen production through altering indigenous bacterial community structure. **Bioresource Technology**, v. 211, p. 319-326, 2016.
- HALLENBECK, P. C. Fermentative hydrogen production: principles, progress and prognosis. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 34, p. 7379-7389, 2009.
- HSIAO, C. L. et al. Clostridium strain co culture for biohydrogen production enhancement from condensed molasses fermentation solubles, **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34. p. 7173-7181, 2009.
- HAWKES, F. R. et al. Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimization. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 27, p. 1339-1347, 2002.
- JIANG, L.; et al. Butyric acid fermentation in a fibrous bed bioreactor with immobilized *Clostridium tyrobutyricum* from cane molasses, **Bioresource Technology**, v. 100, p. 3403-3409, 2009.
- KALIA, C. V. et al. Fermentation of bio waste to H₂ by *Bacillus licheniformis*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 1994.
- KAPDAN, I. K.; KARGI, F. Bio-hydrogen production from waste materials. **Enzyme and Microbial Technology**, p. 569-582, 2006.
- KAN, E. Effects of pretreatments of anaerobic sludge and culture conditions on hydrogen productivity in dark anaerobic fermentation. **Renewable Energy**, v. 49, p. 227-231, 2013.
- KHANAL, S. K.; CHEN, W. H.; SUNG, L. L. S. Biological hydrogen production: effects of pH and intermediate products. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 29, p. 1123-1131, 2004.
- KARGI, F. N. S.; EREN E. O. Hydrogen gas production from cheese whey power (CWP) solution by thermophilic dark fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, p. 2260-2266, 2012.
- KAWAGOSHI, Y.; et al. Effect of seed sludge conditioning on hydrogen fermentation and Ph effect on bacterial community relevant to hydrogen production. **Journal of Bioscience and Bio engineering**, v. 100, n. 5, p. 524-530, 2005.
- KIM, S. H.; SHIN, H. S. Effect of gas sparging on continuous fermentative hydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 31, p. 2158-2169, 2006.
- KOTAY, S. M.; DAS, D. Microbial hydrogen production from sewage sludge bioaugmented with a constructed microbial consortium. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, p. 10653-10659, 2010.
- KOTAY, S. M.; DAS, D. Microbial hydrogen production with *Bacillus coagulans* IITBTS1 isolated from anaerobic sewage sludge. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1183-1190, 2007.

KUMAR, G. et al. Enhanced biohydrogen production from beverage industrial wastewater using external nitrogen sources and bioaugmentation with facultative anaerobic strains. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 120, n. 2, p. 155-160, 2015.

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. Sugarcane vinasse as substrate for fermentative hydrogen production: The effects of temperature and substrate concentration. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, p. 6407-6418, 2014.

LEITE, J. A. C. et al. Application of an anaerobic packed bed bioreactor for the production of hydrogen and organic acids. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, p. 579-586, 2008.

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

LI, Z. H.; GUO, Y.; LIU, X. Comparison of micro-aerobic and anaerobic fermentative hydrogen production from corn straw. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, p. 5456-5464, 2016.

LI, Z. H. et al. Effect of pH value and substrate concentration on hydrogen production from their anaerobic fermentation of glucose. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, p. 7413-7418, 2008.

MAINTINGUER, S. I. et al. Bacterial diversity from environmental sample applied to biohydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 40, p. 3180-3190, 2015.

MAINTINGUER, S. I. et al. Fermentative hydrogen production by microbial consortium. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, p. 4309-4317, 2008.

MARONE, A. et al. Hydrogen production from vegetable waste by bioaugmentation of indigenous fermentative communities. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, p. 5612-5622, 2016.

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

MOTTE, J. C. et al. Total solid content drives hydrogen production through microbial selection during thermophilic fermentation. **Bioresource Technology**, p. 610-615, 2014.

MIURA, H. M.; HORIGUCHI, M.; MATSUMOTO, T. Nutritional interdependence among rumen bacteria, *Bacteroides amylophilus*, *Megasphaera elsdenii*, and *Ruminococcus albus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 40, p. 294-300, 1980.

NOGUEIRA, C. E. C. et al. Exploring possibilities of energy insertion from vinasse biogas in

the energy matrix of Paraná State, Brazil. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 48, p. 300-305, 2015.

NZILA, A. Mini review: Update on bioaugmentation in anaerobic process for biogas production. **Anaerobe**, v. 46, p. 3-12, 2017.

PACHAPUR, V. L. et al. Co-culture strategies for increased biohydrogen production. **International Journal Energy Research**, v. 39, p. 1479-1504, 2015.

PATEL, S. K. S. et al. Enhancement in hydrogen production by co-culture of *Bacillus* and *Enterobacter*. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, p. 14663-14668, 2014.

PATEL, S. K. S.; SINGH, M.; KALIA, V. C. Hydrogen and polyhydroxy butyrate producing abilities of *Bacillus spp.* from glucose in two stage system. **Indian Journal of Microbiology**, v. 51, n. 4, p. 418-423, 2011.

PHOWANA, P.; DANVIRUTAI, P. Hydrogen production from cassava hydrolysate by mixed seed cultures: effects of initial ph, substrate and biomass concentration. **Biomass and Bioenergy**, v. 64, p. 1-10, 2014.

PIRT, S. J., CALLOW, D.S. Production of 2,3-butanediol by *Aerobacter aerogenes* in a single stage process. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 21, p. 188-205, 1958.

POLETO L. et al. Isolamento e identificação de microrganismos produtores de hidrogênio a partir da degradação de glicerol. Resumo **1º Workshop Latino Americano de Biohidrogênio**, São Carlos, Brasil, 2014.

PREETI, M.; DAS, D. Biohydrogen production from *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08 using distillery effluent. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 14, p. 7496-7507, 2014.

QIAN, C. X.; et al. Hydrogen production by mixed culture of several facultative bacteria and anaerobic bacteria. **Progress in Natural Science Materials International**. v. 21, p. 506-511, 2011.

SÁ, L. R. V.; CAMMAROTA, M. C.; FERREIRA-LEITÃO, V. S. Produção de hidrogênio via fermentação anaeróbia – aspectos gerais e possibilidade de utilização de resíduos agroindustriais brasileiros. **Química Nova**, v. 37, p. 857-867, 2014.

SAGNAK, R.; KAPDAN, I. K.; KARGI, F. Dark fermentation of acid hydrolysed ground wheat starch for bio-hydrogen production by periodic feeding and effluent removal. **International Journal of Hydrogen**, v. 35, p. 9630-9636, 2010.

SANJAY, K. S. P.; et al. Enhancement in hydrogen production by co cultures of *Bacillus* and *Enterobacter*, **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, p. 14663-14668, 2014.

SEM, B.; SUTTAR, R. R. Mesophilic fermentative hydrogen production from sago starch processing wastewater using enriched mixed cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 20, p. 15558-15597, 2012.

SHAH, T. et al. *Bacillus sp.* strains to produce biohydrogen from the organic fraction of municipal solid waste. **Applied Energy**, v. 176, p. 116-124, 2016.

SHARMA, P.; MELKANIA, U. Biosurfactant-enhanced hydrogen production from organic fraction of municipal solid waste using co-culture of *E. coli* and *Enterobacter aerogenes*. **Bioresource Technology** v. 243, p. 566-572, 2017.

SHIN, H. S.; YOUN, J.H.; KIM, S. H. Hydrogen production from food waste in anaerobic mesophilic and thermophilic acidogenesis, **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 29, n. 13, p. 1355-1363, 2004.

SHREVE, R. N.; BRINK Jr., J. A. Indústria de processos químicos. 4ª ed. Trad. H. Macedo. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, p. 242, 400, 483-484, 544, 689, 1980.

SYDNEY, E. B. et al. Economic process to produce biohydrogen and volatile fatty acids by a mixed culture using vinasse from sugarcane ethanol industry as nutrient source. **Bioresource Technology**, v. 159, p. 380-386, 2014.

VANDER DER VOORT, M.; ABEE, T. Transcriptional regulation of metabolic pathways, alternative respiration and enterotoxin genes in anaerobic growth of *Bacillus cereus* ATCC 14579. **J. Appl Microbiol**, v. 107, p. 795-804, 2009.

VARGAS, L.; et al. Influência de Rumensin®, óleo de soja e níveis de concentrado sobre o consumo e os parâmetros fermentativos ruminais em bovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia.**, v. 30, p. 1650-1658, 2001.

VAZQUEZ, V. I.; et al. Hydrogen and butanol production from native wheat straw by synthetic microbial consortia integrated by species of *Enterococcus* and *Clostridium*. **Fuel**, v. 159, p. 214-222, 2015.

WANG, J.; WAN, W. Effect of Fe² concentration on fermentative hydrogen production by mixed cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, p. 1215-1220, 2008.

YANG, Z. et al. Bioaugmentation of *Hydrogenispora ethanolica* LX-B affects hydrogen production through altering indigenous bacterial community structure. **Bioresource Technology**, v. 211, p. 319-326, 2016.

YANG, H.; et al. Continuous bio-hydrogen production from citric acid wastewater via facultative anaerobic bacteria. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 31, p. 1306-1313, 2006.

ZHANG, C.; LV, F. X.; XING, X. H. Bioengineering of the *Enterobacter aerogenes* strain for biohydrogen production. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 18, p. 8344-8349, 2011.

6 CONCLUSÕES

Os avanços nos processos de produção de hidrogênio dependem entre outros fatores dos resíduos orgânicos, condições de fermentação e principalmente

conhecer os consórcios microbianos envolvidos. O uso de resíduos industriais como substrato para o processo fermentativo é uma alternativa sustentável, pois colabora no gerenciamento ambiental, gerando biohidrogênio, ácidos graxos e biofertilizante. A vinhaça mostrou-se indicada para a produção de hidrogênio tanto para linhagens isoladas como para consórcios microbianos.

Substratos simples, como a glicose, servem como modelo para o processo fermentativo e confirmou neste trabalho a capacidade de produção de hidrogênio dos microrganismos utilizados e do consórcio e das rotas metabólicas escolhidas por eles para a produção deste gás.

Os microrganismos *B. cereus* e *E. faecalis* isolados produziram mais hidrogênio do que o consórcio e o sistema de co-cultura com *E. faecalis* + *E. aerogenes* foi mais eficiente na produção de hidrogênio quando comparado com o consórcio.

A bioaugmentação do consórcio não elevou a taxa de produção de hidrogênio.

A geração de hidrogênio, no processo anaeróbio dos consórcios e das linhagens, não está diretamente relacionada ao consumo de carboidratos totais da vinhaça.

Dentre os ácidos graxos voláteis produzidos destaca-se o ácido butírico e o ácido acético.

7 RECOMENDAÇÕES

A necessidade de pesquisas na área de energias renováveis e menos poluentes, buscando uma diversificação da matriz energética e a utilização de resíduos agroindustriais, visando uma forma e destinação a estes fez surgir a fermentação anaeróbia como alternativa promissora. Entende-se que pode contribuir neste aspecto sugerindo:

- a) Continuar testando a capacidade de produção de hidrogênio misturando culturas puras já produtoras visando aumentar a eficiência desta produção;
- b) Estudar a produção de hidrogênio em consórcios com bioaugmentação de microrganismos alternados;

- c) Isolar mais microrganismos anaeróbios de consórcios para caracterizar a microbiota presente no processo fermentativo;
- d) Acompanhar a formação de coprodutos da fermentação para conhecer e relacionar as rotas metabólicas utilizadas.

8 REFERÊNCIAS

ACS, N. et al. Bioaugmentation of biogas production by a hydrogen-producing bacterium, **Bioresource Technology**, v. 186, p. 286-293, 2015.

ADAMSON, K. A. Hydrogen from renewable resources - the hundred-year commitment. **Energy Policy**, v. 32, p. 1231-1242, 2004.

ADAV, S.S.; LEE, D.J.; REN, N. Functional consortium for hydrogen production from cellobiose: concentration to extinction approach, **Bioresource Technology**, v. 100, p. 2546-2550, 2009.

AMARAL et al. Glycerol valorization: New biotechnological routes. **Food and Bioproducts Processing**, v. 78, p. 179-186, 2009.

BARTACEK, J.; ZABRANSKA, P.; LENS. Developments and constraints in fermentative hydrogen production. **Biofuels Bioproducts & Biorefining-Biofpr**, v.1, p. 201-214, 2007.

BECKERS, L.; HILIGSMANN, S.; HAMILTON, C.; MASSET, J.; THONART, P. Fermentative hydrogen production by *Clostridium butyricum* CWBI1009 and *Citrobacter freundii* CWBI952 in pure and mixed cultures. **Biotechnologie Agronomie Societe Et Environnement**, 2010.

CARDOSO, M. G. **Bioaugmentação em reatores anaerobio e aerobio e uso de reator nitrificante para redução de carga orgânica e nitrogenada**. 2012. Dissertação (Mestrado em Engenharia química), Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2012.

CHENG, J. et al. Cogeneration of hydrogen and methane from *Arthrospira maxima* biomass with bacteria domestication and enzymatic hydrolysis. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, p. 1474-1481, 2011.

CHONG, N.; PAI, S.; CHEN, C. Bioaugmentation of an activated sludge receiving pH shock loadings. **Bioresource Technology**, v. 59, p. 235-240, 1997.

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

CHRISTOFOLETTI, C. A.; et al. Sugarcane vinasse: Environmental implications of its use. **Waste Management**, v. 33, n. 12, p. 2752-2761, 2013.

COELHO, C. C. G. M. **Utilização digestiva de dietas semi-simplificadas com fenos enriquecidos com vinhaça para coelhos em crescimento**. 2010.

Dissertação (Mestrado em Zootecnia: Área de Concentração em Nutrição Animal), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira da cana-de-açúcar**, v.4, n.1,2017. Disponível em: www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_04_20_14_04_31_boletim_cana_portugues_-_1o_lev_-_17-18.pdf. Acesso em: 20 nov. 2017.

CONVERTI, A.; PEREGO, P. Use of carbon and energy balances in the study of the anaerobic metabolism of *Enterobacter aerogenes* at variable starting glucose concentration. **Applied Microbiology and biotecnology**, v. 59, p. 3003-3009, 2002.

CORAZZA, R. I.; SALLES-FILHO, S. Soluções tecnológicas para o problema da vinhaça nos anos 80: um estudo sobre a formação de uma trajetória tecnológica. **Sociedade Brasileira de Economia e Sociologia Rural**. XLIV Congresso da Sober, 2000.

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

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

DE SÁ, L.R.V. et al. Hydrogenase activity monitoring in the fermentative hydrogen production using heat pretreated sludge: a useful approach to evaluate bacterial community's performance. **International Journal of Hydrogen Energy**, 2011.

ELSHARNOUBY, O. et al. Critical literature review on biohydrogen production by pure cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 12, 2013.

ESTEVIÃO, T. E. **Hidrogênio como combustível**. 2008. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, 2008.

FREIRE, W. J.; CORTEZ, L. B. **Vinhaça de cana de açúcar**. Livraria e Editora Agropecuária, Guaíba, p. 203, 2000.

FU, Z.; HOLTZAPPLE, M. T. Anaerobic mixed-culture fermentation of aqueous ammonia-treated sugarcane bagasse in consolidated bioprocessing. **Biotechnol. Bioeng**, v. 106, p. 216-227, 2010.

GENG, A.; et al. Effect of key factors on hydrogen production from cellulose in co culture of *Clostridium thermocellum* and *Clostridium thermopalmarium*, **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4029-4033, 2010.

GERALDI, M. H. **Wastewater biology: the life process**. Water Environment Federation, Library of Congress. Catalog nº ISBNI 881369-93-5, USA, 184p., 1994.

GHOSHAL, S.; BHATTACHARYA, P.; CHOWDHURY, R. De-mercurization of wastewater by *Bacillus cereus* (JUBT1): Growth kinetics, biofilm reactor study and

field emission scanning electron microscopic analysis, **Journal of Hazardous Materials**, v. 194, p. 355-361, 2011.

GLÓRIA, N. A.; ORLANDO FILHO, J. **Aplicação de vinhaça como fertilizante**. São Paulo: Coopercucar, 38p., 1983.

GRANATO, E. F. **Geração de energia elétrica pela biodigestão anaeróbia da vinhaça**. 2003. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual de São Paulo. Bauru, 2003.

GULLO, M.; VERZELLONI, E.; CANONICO, M. Aerobic submerged fermentation by acetic acid bacteria for vinegar production: Process and biotechnological aspects. **Process Biochemistry**, v. 49, p.1571–1579, 2014.

GUO, X. M.; TRABLY, E.; LATRILLE, E.; CARRERE, H.; STEYER, J. P. Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: A review. **International Journal of hydrogen Energy**, v. 35, p. 10660-10673, 2010.

HALLENBECK, P. C. Fermentative hydrogen production: principles, progress and prognosis. International. **Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, p. 7379-7389, 2009.

HIDALGO, K. et al. Utilización de la vinaza de destilería como aditivo para pollos en ceba. **Revista Cubana de Ciencia Agrícola**, San José de las Lajas, v. 43, n. 3, p. 281-284, 2009

HSIAO, C. L.; CHANG, J. J. et al. Clostridium strain co culture for biohydrogen production enhancement from condensed molasses fermentation solubles, **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, p. 7173-7181, 2009.

HUO, Z.; FANG, Y.; YAO, G.; ZENG, X.; REN, D.; JIN, F. Improved two-step hydrothermal process for acetic acid production from carbohydrate biomass. **Journal of Energy Chemistry**, v. 24, p. 207-212, 2015.

KALIA, V. C.; JAIN, S. R.; KUMAR A.; JOSHI, A. P. Fermentation of biowaste to H₂ by *Bacillus licheniformis*. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 10, p. 224-227, 1994.

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

KAWAGOSHI, Y. et al. Effect of seed sludge conditioning on hydrogen fermentation and Ph effect on bacterial community relevant to hydrogen production. **Journal of Bioscience and Bio engineering**, v. 100, n. 5, p. 524-530, 2005.

KIRTAY, E. Recent advances in production of hydrogen from biomass. **Energy Conversion and Management**, v. 52, p. 1778-1789, 2011.

- KOŚMIDER, A. et al. Propionic acid production by *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* using crude glycerol and whey lactose industrial wastes. **Polish J. of Environ. Stud.**, v. 19, p. 1249-1253, 2010.
- KOTAY, S. M.; DAS, D. Microbial hydrogen production with *Bacillus coagulans* IIT-BT isolated from anaerobic sewage sludge. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1183-1190, 2007.
- _____. Biohydrogen as a renewable energy resource- Prospects and potentials. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 3, p. 258-263, 2008.
- KOTHARI, R. et al. Different aspects of dry anaerobic digestion for bio-energy: an overview. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 39, p. 174-195, 2014.
- KUMAR, G. et al. Impact of pH control and heat pre-treatment of seed inoculum in dark H₂ fermentation: A feasibility report using mixed microalgae biomass as feedstock. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, n. 7, p. 4382-4392, 2016.
- KUMAR, G. et al. Enhanced biohydrogen production from beverage industrial wastewater using external nitrogen sources and bioaugmentation with facultative anaerobic strains. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 120, n. 2, p. 155-160, 2015.
- LAVADO, A. L. C. **Os atuais desafios da energia**. Implementação e Utilização das Energias Renováveis. Universidade de Lisboa, 2009.
- LAZARO, C.Z. **Influência da concentração de substrato na produção de hidrogênio a partir de vinhaça de cana de açúcar**. 2012. Dissertação (Mestrado), Faculdade São Carlos, SP, 2012.
- 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.
- LAY, J.; LEE, Y.; NOIKE, T. Feasibility of biological hydrogen production from organic fraction of municipal solid waste. **Water Research**, v. 33, n. 11, p. 2579-2586, 1999.
- LEVIN, D. B.; PITT, L.; LOVE, M. Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 29, p. 173-185, 2004.
- _____. Hydrogen production by *Clostridium thermocellum* 27405 from cellulosic biomass substrates. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 31, p. 1496-1503, 2006.
- LI, C.; ZHANG, T.; FANG, H. H. Fermentative hydrogen production in packed-bed and packing-free upflow reactors. **Water Science and Technology**, v. 54, p. 95-103, 2006.

LIU, D. Bio-hydrogen production by dark fermentation from organic wastes and residues. 2008. **PhD Thesis**. Department of Environmental Engineering Technical, University of Denmark, Denmark, 2008.

LOVATEL, E. R. **Produção de hidrogênio através da digestão anaeróbica de glicerol e vinhoto utilizando culturas mistas**. 2016. Dissertação (Mestrado), Universidade de Caxias do Sul, RS, 2016.

LYRA, M. R. C. C.; ROLIM, M. M.; SILVA, J. A. A. Topo sequência de solos fertirrigados com vinhaça: contribuição para a qualidade das águas do lençol freático. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 7, n. 3, p. 525-532, 2003.

MAINTINGUER, S. I. **Obtenção e caracterização filogenética de consórcio bacteriano utilizado em reator anaeróbio em batelada aplicado à produção de hidrogênio**. 2009. Tese de doutoramento. Departamento de hidráulica e Saneamento, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

MARONE, A. et al. Hydrogen production from vegetable waste by bioaugmentation of indigenous fermentative communities. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, p. 5612-5622, 2016.

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

MME. **Balanco Energético Nacional 2017: Ano Base 2016**. Ministério de Minas e Energia. p. 17, 2017.

MOHAN, S. V. et al. Enhancing biohydrogen production from chemical wastewater treatment in anaerobic sequencing batch biofilm reactor (AnSBBR) by bioaugmenting with selectively enriched kanamycin resistant anaerobic mixed consortia, **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 32, p. 3284-3292, 2007.

MOSEY, F.E. New developments in the anaerobic treatment of industrial wastes. **Journal of Water Pollution Control Federation**, v. 81, n. 4, p. 540-552, 1982.

MURRAY, B.E. Vancomycin resistant enterococcal infections. **The New England Journal of Medicine**, v. 342, p. 710-721, 2000.

NATH, K.; KUMAR, A.; DAS, D. Effect of some environmental parameters on fermentative Hydrogen production by *Enterobacter cloacae* DM11. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 52, p. 525-532, 2006.

NEVES, L. M. V. **Produção de biohidrogênio por bactérias a partir de resíduos fermentescíveis**. 2009. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, 2009.

NOGUEIRA, C. E. C.; SOUZA, S. N. M.; MICUANSKI, V. C.; AZEEDO, R. L. Exploring possibilities of energy insertion from vinasse biogas in the energy matrix of Paraná State, Brazil. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 48, p. 300-305, 2015.

NOVACANA. **Projeção da Oferta de Etanol até 2030**. Disponível em: <<http://www.novacana.com/n/etanol/mercado/governo-brasil>>. Acesso em: 01 ago. 2016.

NTAIKOU, I.; ANTONOPOULOU, G.; LYBERATOS, G. **Waste Biomass Valorization**, v.1, p. 21, 2010.

NUNES M. A. F. **Produção biológica integrada de hidrogênio e metano a partir de resíduos da indústria do biodiesel**. 2015. Dissertação (Mestrado), Universidade de Lisboa, 2015.

NZILA, A. Mini review: Update on bioaugmentation in anaerobic process for biogas production. **Anaerobe**, v. 46, p. 3-12, 2017.

OLIVEIRA, M. C. et al. Effect of including liquid vinasse in the diet of rabbits on growth performance. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 42, n. 4, p. 259-263, 2013.

PATEL, S. K. S. et al. Enhancement in hydrogen production by co-culture of *Bacillus* and *Enterobacter*. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, p. 14663-14668, 2014.

PLAYNE, M. J. **Propionic and butyric acids**. In: Moo-Young, M. (Ed.), *Comprehensive Biotechnology*. New York: Pergamon Press, p. 731 – 759, 1985.

POLETO L. et al. Selection and identification of microorganisms present in the treatment of wastewater and activated sludge to produce biohydrogen from glycerol. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, p. 4374-4381, 2016.

PRAKASHAM, R. S. et al. Fermentative biohydrogen production by mixed anaerobic consortia: Impact of glucose to xylose ratio, **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, p. 9354-9361, 2009.

PRICE, E. C.; CHEREMISINOFF, P. N. Biogas: Production and Utilization. **Ann Arbor Science**, 1995.

QIAN, C. X. et al. Hydrogen production by mixed culture of several facultative bacteria and anaerobic bacteria. **Progress in Natural Science-Materials International**, v. 21, p. 506-511, 2011.

SÁ, L. R. V.; CAMMAROTA, M. C.; FERREIRA-LEITÃO, V. S. Produção de hidrogênio via fermentação anaeróbia – aspectos gerais e possibilidade de utilização de resíduos agroindustriais brasileiros. **Química Nova**, v. 37, p. 857-867, 2014.

- SEABRA, J. E. A. **Avaliação tecnico-economica de opções para o aproveitamento integral da biomassa de cana no Brasil**. 2008. Tese (Doutorado), Universidade Estadual de Campinas, SP, 2008.
- SHIDA, G. M. **Produção de Hidrogênio e ácidos orgânicos por fermentação acidogênica em Reator Anaeróbio de Leito Fluidizado**. 2008. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, USP, 2008.
- SHOW, K. Y.; LEE, D. J.; CHANG, J. S. Bioreactor and process design for biohydrogen production. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 8524-8533, 2011.
- SHREVE, R. N.; BRINK Jr., J. A. Indústria de processos químicos. 4ª ed. Trad. H. Macedo. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, p. 242, 400, 483-484, 544, 689, 1980.
- SILVA, M. A. S. da; GRIEBELER, N. P.; BORGES, L. C. Uso de vinhaça e impactos nas propriedades do solo e lençol freático. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.11, p. 1,108-114, 2007.
- SINHA, P.; PANDLEY, A. An evaluative report and challenges for fermentative biohydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, p. 7460-7478, 2011.
- SPEECE, R. E.; Anaerobic biotechnology for industrial wastewaters. **Archaea Press**, 1996.
- TANISHO, S.; WAKAO, S.; KOSAKO, Y. Biological hydrogen production by *Enterobacter aerogenes*. **J. Chem Eng Japan**, v. 16, p. 529-530, 1983.
- TRABULSI, L. B.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5 ed. Atheneu, 2009
- VAN LIMBERGEN, H.; TOP E. M.; VERSTRAETE W. Bioaugmentation in activated sludge: current features and future perspectives. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 50, p. 16-23, 1998.
- VASCONCELOS DE SÁ, L. R. et al. Produção de hidrogênio via fermentação anaeróbia – aspectos gerais e possibilidade de utilização de resíduos agroindustriais brasileiros, **Química Nova**, v. 37, n. 5, p. 857-867, 2014.
- VAZQUEZ, V. I. et al. Hydrogen and butanol production from native wheat straw by synthetic microbial consortia integrated by species of *Enterococcus* and *Clostridium*. **Fuel**, v. 159, p. 214-222, 2015.
- XU, J. F. et al. Cell growth and hydrogen production on the mixture of xylose and glucose using a novel strain of *Clostridium* sp. HR-1 isolated from cow dung compost. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, p. 13467-13474, 2010.
- ZHANG, Y.; SHEN, J. Effect of temperature and iron concentration on the growth and hydrogen production of mixed bacteria. **International Journal of Hydrogen Energy**. v. 31, p. 441-446, 2005.

ZHANG, C.; LV, F. -X. E XING, X. "Bioengineering of the *Enterobacter aerogenes* strain for biohydrogen production." **Bioresource technology**, Elsevier Ltda, v. 102, n. 18, p. 8344-349, 2011.

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

WILDERER, P. A.; RUBIO, M. A.; DAVIDS, L. Impact of the addition of pure cultures on the performance of mixed culture reactor. **Water Res**, v. 25, p.1307-1313, 1991.