

**UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**Isolamento e identificação de microrganismos produtores de hidrogênio a  
partir do glicerol residual**

**Liliane Poletto**

**Caxias do Sul, novembro de 2014.**

**Liliane Poletto**

**Isolamento e identificação de microrganismos produtores de hidrogênio a  
partir do glicerol residual**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção de grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Dra. Suelen Paesi

Co-orientador: Dr. Jomar Pereira Laurino

Colaboradora: Dra. Scheila de Ávila e Silva

Caxias do Sul, novembro de 2014.

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

P765i Poletto, Liliane, 1984-  
Isolamento e identificação de microrganismos produtores de hidrogênio a partir do glicerol residual / Liliane Poletto. – 2014.  
134 f. : il. ; 30 cm

Apresenta bibliografia.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2014.

Orientadora: Profa. Dra. Suelen Paesi. Coorientador: Prof. Dr. Jomar Pereira Laurino. Colaboradora: Dra. Scheila de Ávila e Silva.

1. Biocombustíveis. 2. Hidrogênio como combustível. 3. Óleos animais e vegetais como combustível - Biodiesel. 4. Bactérias. I. Título.

CDU 2.ed.: 620.91

Índice para o catálogo sistemático:

1. Biocombustíveis	620.91
2. Hidrogênio como combustível	662.769.2
3. Óleos animais e vegetais como combustível - Biodiesel	662.756
4. Bactérias	579.8

Catalogação na fonte elaborada pela bibliotecária  
Roberta da Silva Freitas – CRB 10/1730

Liliane Poletto

**Isolamento e identificação de microrganismos produtores de hidrogênio a partir do glicerol residual**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção de grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Dra. Suelen Paesi

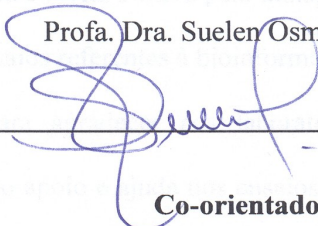
Co-orientador: Dr. Jomar Pereira Laurino

Colaboradora: Dra. Scheila de Ávila e Silva

**Dissertação aprovada em 14 de novembro de 2014.**

**Orientador:**

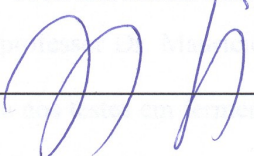
Profa. Dra. Suelen Osmarina Paesi



---

**Co-orientador:**

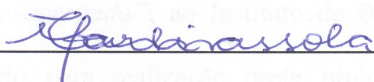
Prof. Dr. Jomar Pereira Laurino



---

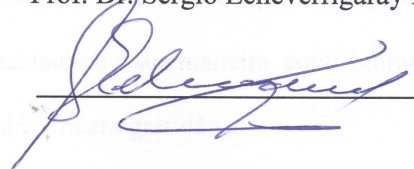
**Membros da Banca:**

Profa. Dra. Marli Camassola



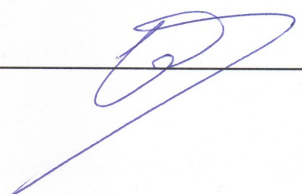
---

Prof. Dr. Sergio Echeverrigaray Laguna



---

Profa. Dra. Claudia Etchebehere



---

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço aos meus pais, pelo apoio incondicional, principalmente ao que se refere ao conhecimento, paciência e amor; à minha família e especialmente ao meu noivo, Eduardo, por me ouvir, pelo apoio, carinho, companheirismo e paciência em todas as horas; à equipe do Laboratório de Diagnóstico Molecular, pois além de ceder o espaço para a realização do projeto, criou-se uma nova família com muito apoio e amizade; em especial à Patrícia Souza, minha bolsista, que acompanhou todo o projeto sempre ao meu lado; à professora Dra. Suelen Paesi e ao professor Dr. Jomar Laurino pela orientação, conhecimentos, apoio e amizade, sem dúvida excelentes professores e orientadores; à professora Dra. Scheila e Ávila e Silva pela indispensável colaboração, empenho e dedicação a este trabalho nos ensaios referentes à bioinformática.

Aproveito para agradecer aos laboratórios que fazem parte da equipe BioH<sub>2</sub> (LATAM e LBio) pelo apoio e ajuda nos ensaios. Um agradecimento especial para a técnica do LATAM, Jocelene Soares, pela paciência em testar todas as minhas amostras em cromatografia gasosa; ao professor Dr. Maurício Moura da Silveira e sua aluna de mestrado Viviane Girardi, pela ajuda nos testes em fermentador, cálculos e amizade criada ao longo do projeto; à Petrobras pela bolsa de estudos e auxílio financeiro no projeto: *“Digestão anaeróbia de resíduos e efluentes agroindustrias para a produção de biohidrogênio e bioprodutos de alto valor agregado”*; ao Instituto de Biotecnologia que disponibilizou o espaço e apoio necessário para realização deste projeto; aos membros da banca por disponibilizarem do seu tempo e colaboração com sugestões para melhoria do trabalho; por fim, às pessoas que, cada uma à sua maneira, contribuíram para a realização deste trabalho.

A todos minha sincera gratidão.

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus familiares, meu noivo Eduardo, meus amigos e à equipe do Laboratório de Diagnóstico Molecular, pessoas que sempre me apoiaram com muito amor e muita paciência para que meus objetivos e sonhos fossem alcançados e realizados.

## ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	8
LISTA DE TABELAS .....	10
LISTA DE FIGURAS .....	11
RESUMO .....	12
ABSTRACT .....	13
1 INTRODUÇÃO.....	14
2 OBJETIVO .....	16
2.1 OBJETIVO GERAL .....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	16
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	17
3.1 BIOCOMBUSTÍVEIS E A PROBLEMÁTICA DO GLICEROL .....	17
3.2 GLICEROL.....	19
3.3 HIDROGÊNIO .....	21
3.4 PROCESSOS METABÓLICOS PARA A PRODUÇÃO DE H <sub>2</sub> A PARTIR DE GLICEROL.....	24
3.4.1 O glicerol e o metabolismo microbiano .....	24
3.4.2 Processo fermentativo microbiológico para geração de H <sub>2</sub> a partir do glicerol.....	25
3.4.3 Fatores que influenciam na produção biológica de H <sub>2</sub> .....	29
3.4.4 Principais microrganismos envolvidos na produção biológica de H <sub>2</sub> .....	32
3.5 ENZIMAS ENVOLVIDAS NA PRODUÇÃO DE H <sub>2</sub> .....	35
3.5.1 [NiFe] hidrogenases .....	36
3.5.2 [FeFe] hidrogenases .....	38
3.5.3 [Fe] hidrogenases .....	38
3.6 LODOS E EFLUENTES .....	38
3.7 CARACTERIZAÇÃO BACTERIANA .....	41
3.7.1 O gene 16S do rRNA .....	42
3.7.2 Técnicas moleculares de identificação microbiana.....	43
3.8 PERSPECTIVAS DA PRODUÇÃO DE H <sub>2</sub> .....	44
4. MATERIAL E MÉTODO .....	46
4.1 INÓCULO .....	46
4.2 MEIOS DE CULTIVO .....	46

4.3 ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA DO SUBSTRATO.....	49
4.4 PRÉ –TRATAMENTO DO INÓCULO.....	49
4.5 ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS.....	49
4.6 EXTRAÇÃO DOS ÁCIDOS NUCLEICOS.....	50
4.7 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE – PCR.....	52
4.8 PURIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS E SEQUENCIAMENTO DE DNA.....	52
4.9 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE H <sub>2</sub> .....	53
4.10 QUANTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE H <sub>2</sub> .....	54
4.10.1 Correção do volume de gás.....	55
4.10.2 Cálculo da concentração de gás no biorreator.....	56
4.10.3 Avaliação do glicerol consumido.....	56
4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	57
4.12 ANÁLISE DOS GENES RELACIONADOS COM A PRODUÇÃO DE H <sub>2</sub> NAS BACTÉRIAS ISOLADAS.....	57
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO SUBSTRATO.....	59
5.2 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS MICRORGANISMOS CRESCIDOS EM GLICEROL.....	61
5.3 PRODUÇÃO DE H <sub>2</sub> .....	69
5.4 QUANTIFICAÇÕES DA PRODUÇÃO DE H <sub>2</sub> .....	72
5.4.1 Produção de H <sub>2</sub> em meio de cultivo MG1.....	72
5.4.2 Produção de H <sub>2</sub> em meio de cultivo MG2.....	76
5.5 ANÁLISE DE GENES PRODUTORES DE H <sub>2</sub> .....	82
6. CONCLUSÃO.....	89
7. PERSPECTIVAS.....	90
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91
ANEXOS.....	116



## LISTA DE ABREVIATURAS

**Acetil- CoA:** acetil coenzima A

**ATP:** adenosina trifosfato

**CN<sup>-</sup>:** cianeto

**DBO:** demanda bioquímica de oxigênio

**DGGE:** eletroforese em gel com gradiente desnaturante

**ddNTP:** didesoxinucleotídeos

**dNTP:** desoxinucleotídeos

**DNA:** ácido desoxirribonucléico

**DHA:** dihidroxiacetona

**DHAK:** dihidroxiacetona quinase

**DQO:** demanda química de oxigênio

**DTN:** di (tiometil)- amina

**ETE:** estação de tratamento de efluentes

**Fdh:** formiato desidrogenase

**FHL:** ferredoxina hidrogênio liase

**GDH:** glicerina desidrogenase

**GDHE:** glicerol desidratase

**HPA:** hidroxipropionaldeido

**KOH:** hidróxido de potássio

**LB:** meio de cultivo Luria Bertani

**NAD:** nicotinamida adenosina difosfato

**NADH<sub>2</sub>:** nicotinamida adenosina difosfato reduzida

**NaOH:** hidróxido de sódio

**pb:** pares de base

**PCR:** reação em cadeia da polimerase

**PDOR:** propanodiol oxidoreductase

**PFL:** piruvato formiato liase

**VSS:** sólidos suspensos voláteis

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Propriedades físico-químicas do glicerol.....	20
<b>Tabela 2.</b> Microrganismos capazes de produzir hidrogênio pela metabolização do glicerol puro ou residual. ....	35
<b>Tabela 3.</b> Composição do meio de cultivo MG1(g/L).....	47
<b>Tabela 4.</b> Composição da solução de elementos traço (g/L), utilizado no MG1.....	47
<b>Tabela 5.</b> Composição do meio de cultivo Luria Bertani (LB) (g/L). ....	47
<b>Tabela 6.</b> Composição do meio mínimo de cultivo (mL/L) .....	48
<b>Tabela 7.</b> Composição da solução 5× M9 sais, utilizado no meio mínimo de cultivo (g/L). .	48
<b>Tabela 8.</b> Composição do meio de cultivo MG2 (g/L).....	48
<b>Tabela 9.</b> Análise físico-química do glicerol e do glicerol residual, metodologia segundo <i>Standard Methods For Examination of Water and Wastewater</i> (2012). ....	59
<b>Tabela 10.</b> Microrganismos identificados de amostras de lodos de estações de tratamento de efluentes de setores petrolífera e agroindustrial, por meio de comparação de sequências genéticas depositadas no <i>Gen Bank</i> (NCBI). ....	64
<b>Tabela 11.</b> Lista dos microrganismos isolados que possuem capacidade de produção de hidrogênio e microrganismos que não possuem esta capacidade, análise por cromatografia gasosa. ....	70
<b>Tabela 12.</b> Quantificação de H <sub>2</sub> (mmol/L) produzido utilizando diferentes meios de cultivo em 48h de cultivo, pH 6,8 e temperatura de 37 <sup>0</sup> C. Testes com apenas uma repetição. ....	78
<b>Tabela 13.</b> Rendimento da produção de hidrogênio, utilizando glicerol ou glicerol residual como fonte de carbono e meio de cultivo MG2. ....	80
<b>Tabela 14.</b> Análise das sequências do operon hyc, resultados da análise de proteínas do gene HycF, atravésde <i>BLAST (All)</i> .....	85
<b>Tabela 15.</b> Análise das sequencias do operon hyf, resultados da análise de proteínas do gene HyfH, atravésde <i>BLAST (All)</i> . ....	87

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Produção do biodiesel a partir da transesterificação de óleos vegetais.....	17
<b>Figura 2.</b> Estrutura molecular do glicerol.....	19
<b>Figura 3.</b> Rota bioquímica da fermentação do glicerol, indicando outros produtos de interesse, além do H <sub>2</sub> . .....	27
<b>Figura 4.</b> Estrutura dos três tipos de enzima hidrogenase, enfatizando seus sítios ativos.....	36
<b>Figura 5.</b> Figura do gasômetro invertido.....	54
<b>Figura 6.</b> Gel de agarose, representativo da amplificação (720 pb) do gene 16SrRNA.....	62
<b>Figura 7.</b> Modelo de eletroferograma gerado após sequenciamento de DNA. ....	63
<b>Figura 8.</b> Análise cromatográfica da produção de hidrogênio por <i>E. aerogenes</i> . Fermentação de 48h, 37°C, pH 6,8 e meio de cultivo MG1. ....	70
<b>Figura 9.</b> Área (%) de hidrogênio em relação a outros gases produzidos pelos microrganismos isolados em meio de cultivo, MG1. Área obtida por cromatografia gasosa. Medidas de triplicata e estimativa de desvio padrão. ....	71
<b>Figura 10.</b> Área (%) de hidrogênio em relação a outros gases produzido pelos microrganismos isolados em meio de, contendo MG1. Área obtida por cromatografia gasosa. Área obtida por cromatografia gasosa. Medidas de triplicata e estimativa de desvio padrão..	72
<b>Figura 11.</b> Análise de cromatografia gasosa da fermentação em frasco invertido utilizando <i>E. aerogenes</i> . Amostra retirada da saída coletora do frasco invertido. Análise realizada em 48 horas de fermentação, pH 6,8, temperatura 37°C e meio de cultivo MG2.....	73
<b>Figura 12.</b> Produção de H <sub>2</sub> em frasco invertido com 1L de meio de cultivo MG1 contendo glicerol como única fonte de carbono, em 48h de cultivo, pH 6,8 e temperatura 37°C. Testes com apenas uma repetição.....	74
<b>Figura 13.</b> Produção de H <sub>2</sub> em frasco invertido com 1L de meio de cultivo MG1 contendo glicerol residual como única fonte de carbono, em 48h de cultivo, pH 6,8 e temperatura 37°C. Testes com apenas uma repetição.....	75
<b>Figura 14.</b> Produção de H <sub>2</sub> (mL), utilizando meio de cultivo MG2, em 48h de cultivo, pH 6,8 e temperatura 37°C. Medidas de triplicata e estimativa de desvio padrão. ....	77

## RESUMO

Um dos grandes desafios para os próximos anos é desenvolver alternativas de produção para energias sustentáveis. O biodiesel vem se posicionando como uma opção para a substituição dos combustíveis fósseis. Sua produção se dá pela transesterificação entre uma gordura e um monoálcool, liberando glicerol, que corresponde a 10% do volume da reação. Grandes incrementos na produção de biodiesel resultarão em volumes proporcionais de glicerol residual. Estudos têm mostrado que bactérias anaeróbias estritas e bactérias fermentativas são capazes de produzir hidrogênio, um combustível de alto valor energético, que não gera gases poluentes durante a sua queima. Visto a importância de aumentar o valor agregado do glicerol residual, o presente trabalho teve como objetivo isolar e identificar por técnicas moleculares, bactérias presentes em lodos de estações de tratamento de resíduos, capazes de produzir hidrogênio utilizando glicerol residual da indústria de biodiesel como fonte de carbono. As amostras foram submetidas a choque térmico para eliminação de bactérias hidrogenotróficas, crescidas em meio contendo glicerol em condições de anaerobiose e analisadas para a formação de hidrogênio. Foram identificadas por sequenciamento do gene 16S rRNA, quinze espécies bacterianas capazes de crescer em meio com glicerol, sendo que destas nove apresentaram capacidade de produção de hidrogênio, correspondendo a *Enterobacter ludwigii*, *Shigella sonnei*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Staphylococcus warneri*, *Alcaligenes faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus atrophaeus* e *Citrobacter freundii*. Os isolados de *Bacillus amyloliquefaciens* mostraram maior rendimento na produção de hidrogênio com valores de  $0,50 \pm 0,20$  mol H<sub>2</sub>/mol de glicerol, utilizando o meio enriquecido com 1,5% de glicerol residual. Adicionalmente, foi realizada análise de *BLAST* para verificar a presença dos genes HycC, HycE, HycF, HyfC, HyfF e HyfH relacionados à produção de hidrogênio. Este estudo foi desenvolvido utilizando apenas os microrganismos do gênero *Bacillus*, uma vez que, dentre os microrganismos isolados, apenas os *Bacillus* apresentam sequenciamento completo disponível na rede de bioinformática. Foi verificado que *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* e *B. atrophaeus* não possuem os genes específicos analisados, mas estes genes possuem similaridade com outros genes e proteínas que parecem desempenhar funções no transporte de hidrogênio para exterior da célula. Os resultados indicam que existe um grande potencial para a seleção de bactérias produtoras de hidrogênio nos efluentes avaliados que são capazes de metabolizar o glicerol residual com a geração de hidrogênio, como combustível de energia renovável.

**Palavras-chave:** biodiesel, glicerol, glicerol residual, microrganismos, hidrogênio

## ABSTRACT

One of the major challenges for the coming years is to develop alternative forms of production for sustainable energy. The biodiesel is positioning itself as an option for the replacement of fossil fuels. Its production is by transesterification between a fat and a monoalcohol, releasing glycerol, which corresponds to 10% of the volume of the reaction. Large increases in the production of biodiesel result in proportional amounts of crude glycerol. Studies have shown that strict anaerobic and fermentative bacteria are able to produce hydrogen, a fuel of high energy value, which does not generate polluting gases, during its burning. Given the importance of increasing the added value of crude glycerol, the purpose of this study was to isolate and identify by molecular techniques, bacteria present in sewage sludge from waste treatment plants, it is capable of producing hydrogen using crude glycerol of biodiesel industry, as a carbon source. The samples were subjected to thermal shock to eliminate hydrogenotrophic bacterias, grown in the medium containing glycerol under anaerobic conditions and analyzed to produce hydrogen. Were identified by sequencing of the 16S rRNA gene, 15 bacterial species able to grow in medium with glycerol, and from these, nine showed the ability of hydrogen production, corresponding to *Enterobacter ludwigii*, *Shigella sonnei*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Staphylococcus warneri*, *Alcaligenes faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus atrropheus* and *Citrobacter freundii*. The *Bacillus amyloliquefaciens* isolate showed higher yield in the production of hydrogen, with values of  $0.50 \pm 0.20$  mol H<sub>2</sub>/mol of glycerol, using the enriched medium with 1.5% crude glycerol. In addition, BLAST analysis were performed to check the presence of genes HycC, HycE, HycF, HyfC, HyfF and HyfH related to hydrogen production. This study was developed using microorganisms of genus *Bacillus*, since, among the isolated microorganisms, only the *Bacillus* have complete DNA sequencing available. It was found that *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* and *B. atrropheus* do not have the specific genes analyzed, but these genes have similarity with other genes and proteins that appear to perform roles in the transport of hydrogen to outside the cell. The results indicate that there is a great potential for the selection of bacteria producing hydrogen in the effluents evaluated, that are able to metabolize crude glycerol with the generation of hydrogen as a fuel for renewable energy.

**Keywords:** biodiesel, glycerol, glycerol residual, microorganisms, hydrogen

# 1 INTRODUÇÃO

Atualmente, devido às questões ambientais provocadas pelas atividades antropogênicas que estão modificando o clima do planeta, está havendo um esforço coletivo pela busca de fontes de energia alternativa e de processos sustentáveis visando à redução da poluição ambiental e do aquecimento global do planeta. Frente a esta problemática, o mercado dos biocombustíveis, cita-se o biodiesel e etanol, representa uma alternativa em substituição aos combustíveis fósseis. O biodiesel é obtido a partir de fontes renováveis, tais como óleos vegetais e gordura animal, é biodegradável e apresenta baixa emissão de gases tóxicos durante a sua queima. O Brasil é um dos pioneiros na utilização desse tipo de combustível, pois desde a década de 70 já utiliza o álcool etílico oriundo da fermentação da cana-de-açúcar.

O Rio Grande do Sul é o principal estado produtor de biodiesel do país, sendo responsável por 25% da produção nacional. A demanda e a produção do biodiesel, no Brasil, aumentaram de forma vertiginosa, diante da obrigatoriedade da adição do composto ao diesel (lei 11.097/2005). Como consequência, os subprodutos da fabricação deste biocombustível também aumentam, principalmente o glicerol residual, que corresponde a 10% do volume do biocombustível produzido. Hoje em dia, uma pequena parte deste subproduto purificado é usada principalmente nas indústrias químicas, farmacêuticas e de alimentos. Para evitar um acúmulo do glicerol residual e garantir a sustentabilidade das empresas produtoras de biodiesel, tornam-se necessários estudos de novas alternativas para a utilização desse elemento.

Algumas pesquisas de interesse econômico mostram que a utilização do glicerol como fonte de carbono em processos fermentativos poderia se tornar mais vantajoso frente aos substratos utilizados tradicionalmente.

Os processos biotecnológicos têm se tornado uma alternativa para a produção de energia e a utilização de resíduos industriais. Neste contexto, as fermentações ocorridas

principalmente em anaerobiose, têm se destacado por demandarem pouca energia para a realização, sendo os produtos finais compostos químicos que podem ser aproveitados como fonte de energia, como exemplo, o hidrogênio ( $H_2$ ). Dessa forma,  $H_2$ , em longo prazo, parece ser uma opção razoável como fonte de energia para sustentar o contínuo crescimento da economia mundial, além de amenizar a situação dos combustíveis fósseis e aquecimento global.

Estrategicamente, o desenvolvimento de processos de produção de  $H_2$  via fermentação microbiológica por culturas mistas ou puras isoladas de lodos oriundos de processos anaeróbios ou lodos ativados, constitui um processo biotecnológico alternativo para produção de energia menos poluente e o aproveitamento do glicerol residual.

As bactérias capazes de produzir  $H_2$  em grande escala são encontradas naturalmente em solos, águas e esgotos. Esses materiais podem ser usados como inóculo em meios para produção fermentativa de  $H_2$ . Uma variedade de culturas puras ou mistas de bactérias tem sido usada para a produção de  $H_2$ , a partir de diferentes substratos. *Clostridium* e *Enterobacter* são as mais largamente utilizadas em inóculos para a produção de  $H_2$ . Muitos estudos em culturas puras de bactérias para fermentação de  $H_2$  têm sido conduzidos em bateladas usando glicerol como substrato. Revisões da literatura mostram que outros gêneros, além das bactérias citadas anteriormente, estão envolvidos na produção de  $H_2$ . São elas: *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Thermococcus*, *Thermotoga*, *Ruminococcus*, *Hafnia*, *Citrobacter* e *Ethanoligenense*.

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo isolar e caracterizar bactérias de reatores de tratamento de efluentes e lodos ativados capazes de produzir  $H_2$  a partir de glicerol.



## **2 OBJETIVO**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Isolar e caracterizar bactérias de reatores de tratamento de efluentes e lodos ativados capazes de produzir  $H_2$  combustível a partir de glicerol.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Como forma de atingir o objetivo geral do trabalho, teve os seguintes objetivos específicos:

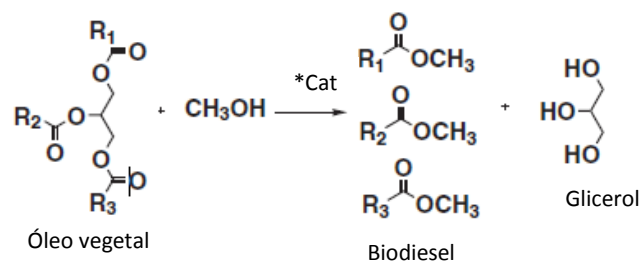
- obter culturas puras de microrganismos anaeróbios facultativos produtores de  $H_2$  a partir de glicerol e glicerol residual oriundo da fabricação de biodiesel;
- comparar a produção de  $H_2$  dos microrganismos isolados com linhagens padrão conhecidamente produtoras de  $H_2$  utilizando glicerol e glicerol residual;
- conhecer gênero e espécie dos microrganismos isolados através de sequenciamento de DNA;
- verificar a presença dos genes HycC, HycE, HycF, HyfC, HyfF e HyfH nos microrganismos isolados e relacionados à produção de hidrogênio no Domínio Bactéria.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 BIOCOMBUSTÍVEIS E A PROBLEMÁTICA DO GLICEROL

Biocombustíveis são combustíveis biodegradáveis e podem ser produzidos por produtos agrícolas renováveis (Chaganti *et al.*, 2012; Quispe *et al.*, 2013). O Brasil tem se destacado desde a década de 70 pelo seu programa de etanol a partir da cana-de-açúcar. Outro biocombustível de destaque no Brasil é o biodiesel.

O biodiesel possui características que lhe conferem o título de combustível limpo (Anitescu & Bruno, 2012). Este tipo de combustível elimina vários tipos de agressões ao meio ambiente como, por exemplo: evita-se utilizar combustíveis fósseis com reservas limitadas, diminui a emissão de substâncias tóxicas pelos escapamentos de motores e o biodiesel é degradado facilmente (Plá, 2002). Durante sua fabricação ocorre a reação de um álcool com uma gordura – transesterificação com a formação de ésteres metílicos (biodiesel), ácidos graxos e glicerol. Para cada três mols de ésteres metílicos é gerado um mol de glicerol, ou seja, aproximadamente 10% da massa do produto formado (Karinen & Krause, 2006; Mota *et al.*, 2009; Beatriz *et al.*, 2010, Quispe *et al.*, 2013). Esta reação pode ser observada na Figura 1.



**Figura 1.** Produção do biodiesel a partir da transesterificação de óleos vegetais. \* O catalisador utilizado na reação pode variar entre KOH e NaOH.  
Adaptado: Mota *et al.*, 2009.

Os cinco maiores produtores de glicerol residual de biodiesel no mundo são: Alemanha, Estados Unidos, França, Argentina e Brasil, sendo responsáveis por 68,4% da produção do biodiesel do mundo (Sarma *et al.*, 2012). O estado brasileiro com maior produção de biodiesel e conseqüentemente glicerol é o Rio Grande do Sul, sendo responsável por mais de 25% da produção nacional (Feix, 2012).

A crescente produção brasileira de biodiesel deve-se principalmente à lei 11.097/2005 que tornou obrigatória a adição de 2% de biodiesel ao diesel até 2008 e adição de 5% em 2013 (Leoneti *et al.*, 2012), sendo que para novembro de 2014 a estimativa é que este valor aumente para 7%. Estima-se que diante dessa lei o excedente de glicerol no país em 2013 tenha ultrapassado a produção de 250.000 toneladas (Beatriz *et al.*, 2010; Umpierre & Machado, 2013). Para 2020, a estimativa é que a produção mundial de glicerol chegue a três milhões de toneladas, enquanto que sua demanda não deve ultrapassar a 500 mil toneladas/ano (Lin, 2013). Portanto, destinação do glicerol é um problema para a produção do biodiesel, sendo fundamental buscar formas de consumo deste glicerol (Leoneti *et al.*, 2012).

As aplicações do glicerol bruto, oriundo da fabricação do biodiesel, que estão em estudo, vão da fabricação de novos produtos químicos, passando pela fabricação de aditivos para combustíveis de automóveis, metanol, alimento para animais. Além disso, o glicerol pode ser usado como fonte de carbono para a produção de H<sub>2</sub>, dihidroxicetona, ácido succínico, ácido propiônico e ácido cítrico (Leoneti *et al.*, 2012).

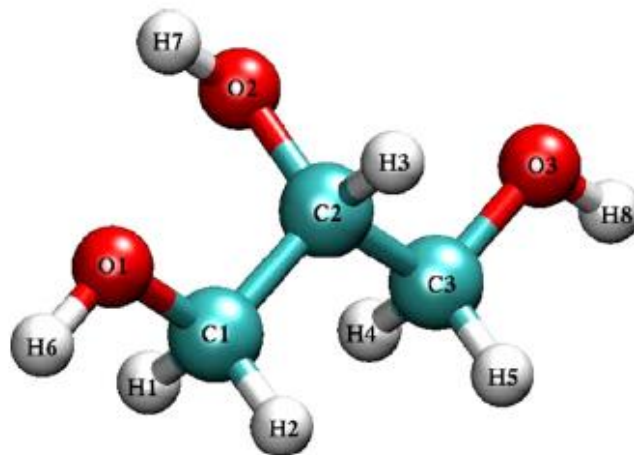
Diante disso, a produção de H<sub>2</sub> por bioconversão do glicerol residual pode ser uma opção adequada para a utilização deste resíduo, já que esse tenderá a se acumular no meio ambiente.

O H<sub>2</sub> tem um teor energético elevado e é uma fonte de energia limpa, tendo potencial para ser uma alternativa aos combustíveis fósseis (Chaganti *et al.*, 2012; Sarma *et al.*, 2012).

### 3.2 GLICEROL

Glicerol é o nome comum do composto orgânico 1,2,3-propanotriol, descrito por Carl W. Scheele em 1779 durante uma separação aquecida de PbO (monóxido de chumbo) preparado com óleo de oliva (Arruda *et al.*, 2007; Rivaldi *et al.*, 2007). Em 1858, Pasteur também observou sua formação como um subproduto da fermentação alcoólica em concentrações de 2,5-3,6% do conteúdo de etanol, podendo ser o glicerol o terceiro maior produto formado durante a fermentação alcoólica (Tosetto & Andrietta, 2003; Arruda *et al.*, 2007).

É um composto orgânico pertencente à função álcool, líquido à temperatura ambiente, higroscópico e inodoro (Quispe *et al.*, 2013). Este pode ser obtido mediante à saponificação de ácidos graxos com hidróxidos de sódio ou potássio, que são coprodutos da fabricação do biodiesel. A Figura 2 representa a estrutura química do glicerol.



**Figura 2.** Estrutura molecular do glicerol.  
Fonte: Quispe *et al.* (2013).

O termo glicerol está presente em todos os óleos e gorduras de origem animal e vegetal em sua forma combinada, ou seja, ligado a ácidos graxos tais como o ácido esteárico, oleico, palmítico e láurico para formar a molécula de triacilglicerol. Devido à reação ocorrida durante sua formação, o glicerol residual pode conter uma série de impurezas como sais

inorgânicos, ácidos, água, metanol e uma variedade de componentes (Lin, 2013). As propriedades físico-químicas do glicerol estão representadas na Tabela 1.

**Tabela 1.** Propriedades físico-químicas do glicerol.

<b>Características físico – químicas do glicerol</b>	
Peso molecular	92,09
Densidade (glicerol 100%) 25°C	1,262Kg/m <sup>3</sup>
Viscosidade 20°C	939cps
Ponto de ebulição (101.3Kpa)	290°C
Ponto de fusão	18°C
Ponto de inflamação	177°C
Tensão superficial 20°C	63,4mN/m
Calor específico (glicerol 99,94%) 26°C	2,435J/g
Calor de evaporação 55°C	88,125J/mol
Calor de dissolução	5,8KJ/mol
Calor de formação	667,8KJ/mol
Condutividade térmica	0,28W/(m.K)

\*Adaptado de Arruda *et al.*, 2007.

O termo glicerina refere-se ao produto na forma comercial, com pureza acima de 95% (Quispe *et al.*, 2013). Esta tem aplicação em larga escala nos setores: cosmético, higiene pessoal, alimentos, medicamento, fumo, crioprotetores e na indústria têxtil (Arruda *et al.*, 2007; Mota *et al.*, 2009). Para que o glicerol atinja este grau de pureza, ele deve ser submetido à destilação, o que agrega alto custo ao processo (Rivaldi *et al.*, 2007). O glicerol também pode ser usado como um agente crioprotetor, pois não permite a formação de cristais de gelo na célula, mantendo a estabilidade da parede celular e vitalidade da mesma durante o processo de congelamento para sua conservação (Arruda *et al.*, 2007; Rossi, 2011).

Estudos demonstram que o glicerol em sua forma bruta contém elementos nutricionais (fósforo, enxofre, magnésio, cálcio, nitrogênio e sódio) que podem ser usados por microrganismos durante seu crescimento em fermentações, o que baixa consideravelmente o preço do processo, uma vez que carboidratos puros, como a glicose, por exemplo, possuem um preço superior (Arruda *et al.*, 2007; Rivaldi *et al.*, 2007; Sabaratnam & Ali Hassan, 2012).

### 3.3 HIDROGÊNIO

O hidrogênio é o elemento mais simples e abundante do universo, representando  $\frac{3}{4}$  de toda a matéria existente (Neves, 2009). Trata-se de um gás incolor, inodoro, insípido e muito mais leve que o ar (Lamaison, 2009).

A ideia de usar o gás hidrogênio ( $H_2$ ) como fonte de energia não é nova. Iniciou em 1868 com os trabalhos do cientista E. Viel. Trata-se de um combustível eficiente com rendimento energético de 122 kJ/g, podendo representar até 2.4, 2.8 e 4 vezes mais rendimento energético se comparado ao metano, gasolina e carvão, respectivamente (Lovato, 2014). O valor energético elevado da queima do  $H_2$  está relacionado ao fato do rompimento da ligação covalente da molécula, fazendo com que toda molécula seja reativa (Sandalci & Karagöz, 2014).

O interesse pelo  $H_2$  tem aumentado devido aos avanços tecnológicos nas células de combustíveis, o sucessor em potencial das baterias de produtos eletrônicos, plantas de potência e motores de combustão interna (Dunn, 2002). Acredita-se que o  $H_2$  será essencial para a sustentabilidade energética e ambiental. Trata-se de uma fonte limpa de energia, pois quando ocorre sua combustão na presença de oxigênio, há apenas a formação de água, por isso seu uso futuro está relacionado ao setor de transportes, onde irá ajudar na redução da poluição (Barros *et al.*, 2011).

Segundo o Programa Americano de Hidrogênio, estima-se que até 2040 haverá veículos a  $H_2$  em todos os estados americanos (Costa, 2010). Entretanto, o gás  $H_2$  não está disponível em quantidade suficiente na natureza e sua produção economicamente viável continua a ser um desafio (Tansksale *et al.*, 2010). Neves (2009) afirma que para suprir estas necessidades, principalmente energéticas, são necessários novos estudos para tornar possível a produção biológica de  $H_2$ .

Estima-se que 96% do H<sub>2</sub> produzido no mundo são provenientes de fontes fósseis de energia (Ewan & Allen, 2005; Guo *et al.*, 2012), mas pesquisas na área tentam produzir o H<sub>2</sub> por fermentação microbiana, assim como ocorrem com o etanol e o biogás (Hallenbeck & Benemann, 2013). Este tipo de produção pode ser uma alternativa favorável, por ter menor gasto energético e ser realizada em temperatura e pressão favorável (Carminato & Zaiat, 2014; Lovato, 2014).

A produção biológica de H<sub>2</sub> pode se dar das seguintes formas (Maintinguer *et al.*, 2008; Das, 2009; Lazaro *et al.*, 2014; Hallenbeck & Benemann, 2013; Yasin *et al.*, 2013) :

- i) biofotólise da água utilizando algas e cianobactérias;
- ii) fotossíntese anoxigênia;
- iii) produção fermentativa de H<sub>2</sub> a partir de compostos orgânicos, sendo esta possível, utilizando uma variada gama de substratos e;
- iv) sistemas híbridos utilizando bactérias fototrófica e fermentativa.

As bactérias fermentadoras alcançam maiores rendimentos em H<sub>2</sub> na transformação de substratos, enquanto as fotossintéticas convertem 1% da energia solar, as fermentativas são capazes de converter de 20-25% da energia contida em açúcares e outros substratos em H<sub>2</sub> (Hallenbeck & Ghosh, 2009; Hallenbeck & Benemann, 2013).

Para Costa (2010), a produção biológica de H<sub>2</sub> por fermentação anaeróbia promete ser um meio econômico viável, mas tem sido tratada com pouca atenção se comparada à produção por microrganismos fotossintéticos. Embora sejam vários os mecanismos para a produção de H<sub>2</sub>, o processo que vem se destacando é a fermentação anaeróbia (Chaganti *et al.*, 2012). Trata-se de um processo que envolve uma entrada mínima de energia, de uma variada gama de substratos (glicose, sacarose, xilose e amido, etc.) e os inóculos microbianos podem ser obtidos das mais variadas fontes (Das, 2009; Barros *et al.*, 2011), incluindo vários materiais que seriam descartados no ambiente (Lamaison, 2009), inclusive lodos industriais.

A utilização destes resíduos se justificaria pela necessidade de tornar a produção de  $H_2$  um processo economicamente viável (Lamaison, 2009). Portanto, é um processo que combina a produção de energia e a utilização de resíduos, podendo até mesmo estar acoplada a uma estação de tratamento de água residuárias (Barros *et al.*, 2011, Braga & Zaiat, 2014).

A fermentação é tecnicamente mais simples que o processo fotossintético e apresenta bons rendimentos tendo como vantagens altas velocidades de produção de  $H_2$ . As fontes de inóculo para produção fermentativa de  $H_2$ , descritas e testadas com eficiência, se referem a inóculos vindos de países de clima temperado, como por exemplo: lodo de estações de tratamento de esgoto sanitário, sedimentos de lagoas e águas residuárias. Portanto, há a necessidade de se estudar inóculos provenientes de ambiente tropical como o Brasil (Maitinguer *et al.*, 2008). Além disso, a dificuldade da fermentação está em selecionar culturas de microrganismos que não contenham nenhum tipo de bactéria consumidora de  $H_2$ , tais como as metanogênicas (Costa, 2010).

Os microrganismos consumidores de  $H_2$  podem ser eliminados por tratamento térmico da amostra antes da fermentação. No entanto, não há muitos registros da eficiência dos tratamentos que visam eliminar bactérias consumidoras de  $H_2$ . Portanto, há necessidade de novos estudos para que se desenvolva um tratamento eficiente (Selembro *et al.*, 2009; Sarma *et al.*, 2012).

Após o processo fermentativo, o  $H_2$  resultante pode ser armazenado de três formas diferentes. Na sua forma gasosa, sendo comprimido, como é o caso dos carros com pilhas movidas a  $H_2$ . Em sua forma líquida, precisa ser mantido em torno  $-253^\circ\text{C}$  para evitar a sua evaporação, sendo praticamente inviável economicamente. Finalmente, pode sofrer armazenamento por reabsorção de um metal, formando um hidreto metálico. Para liberação posterior do  $H_2$ , a combinação precisa ser aquecida a  $300^\circ\text{C}$ . Todos estes métodos ainda



possuem custos elevados e precisam ser aperfeiçoados, já que se tornam perigosos, uma vez que o H<sub>2</sub> é inflamável e explosivo em contato com o ar (Santos & Santos, 2004).

### **3.4 PROCESSOS METABÓLICOS PARA A PRODUÇÃO DE H<sub>2</sub> A PARTIR DE GLICEROL**

#### **3.4.1 O glicerol e o metabolismo microbiano**

O glicerol residual originado da fabricação de biodiesel pode conter resíduos de substâncias usadas na sua fabricação, como por exemplo: sabões, metanol e cristais de hidróxido de sódio usado como catalisador. Essas substâncias são conhecidas por inibir o crescimento microbiano, por isso, o pré-tratamento do glicerol residual é recomendado para a máxima produção de H<sub>2</sub> (Sarma *et al.*, 2012). Após o pré-tratamento, o glicerol é considerado uma fonte de carbono altamente reduzida e assimilável pelos microrganismos, seja sob condições aeróbias ou anaeróbias, agindo como regulador do potencial redox e para a reciclagem de fosfato inorgânico para dentro da célula (Rivaldi *et al.*, 2007).

O glicerol é um dos poucos substratos que atravessa a membrana celular por difusão facilitada nas células procarióticas (Rossi, 2011). Após a passagem do glicerol através da membrana plasmática, pode ser catabolizado por várias rotas metabólicas. Em presença de glicose, os genes que controlam a síntese da enzima glicerol-quinase e fosfo – albiquinona oxidoreductase são reprimidos, mas desreprimidos quando o glicerol ou etanol são usados como única fonte de carbono (Rivaldi *et al.*, 2007).

Sarma *et al.* (2012) descrevem que ambos os mecanismos, oxidativos e redutores de glicerol são conhecidos em espécies como *Klebsiela*, *Citrobacter*, *Clostridium* e *Enterobacter*. Na via oxidativa, o glicerol é primeiramente convertido a dihidroxiacetona sob a ação da enzima desidrogenase. Após, a dihidroxiacetona é fosforilada pela dihidroxiacetona quinase, e, finalmente, o produto é metabolizado através da glicólise. Na redução, o glicerol é

finalmente convertido a propanodiol através da produção do intermediário 3-hidropropionaldeído.

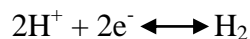
Vários subprodutos da fermentação do glicerol têm destaque no mercado brasileiro: 1,3 propanodiol, etanol, ácidos orgânicos, polihidroxialcanoatos, ácidos graxos poli-insaturados e ômega -3 (Rivaldi *et al.*, 2007; Sarma *et al.*, 2012).

### 3.4.2 Processo fermentativo microbiológico para geração de H<sub>2</sub> a partir do glicerol

Em procariotos, evolutivamente, a produção de H<sub>2</sub> é essencialmente um meio para liberar o excesso de prótons através das enzimas hidrogenases ou nitrogenases, sensíveis ao oxigênio, por isso as condições de fermentação são anaeróbias (Sabaratnam & Ali Hassan, 2012; Tsygankov & Tekuncheva, 2012; Hallenbeck & Benemann, 2013; Kumar *et al.*, 2013). Biologicamente, o H<sub>2</sub> pode ser produzido por microrganismos anaeróbios fermentativos que utilizam carboidratos para sua formação (Maintinguer *et al.*, 2008). O grande problema é que o microrganismo pode produzir este gás e também consumi-lo (Tsygankov & Tekucheva, 2012).

A maioria das espécies associadas à produção de H<sub>2</sub> durante a acidogênese de carboidratos são: *Enterobacter*, *Bacillus* e *Clostridium* ( Kapdan & Kargi, 2006; Mohan, 2009; Barros *et al.*, 2011).

A produção de H<sub>2</sub> por via microbiológica é baseada na reação redox:



(Equação 1)

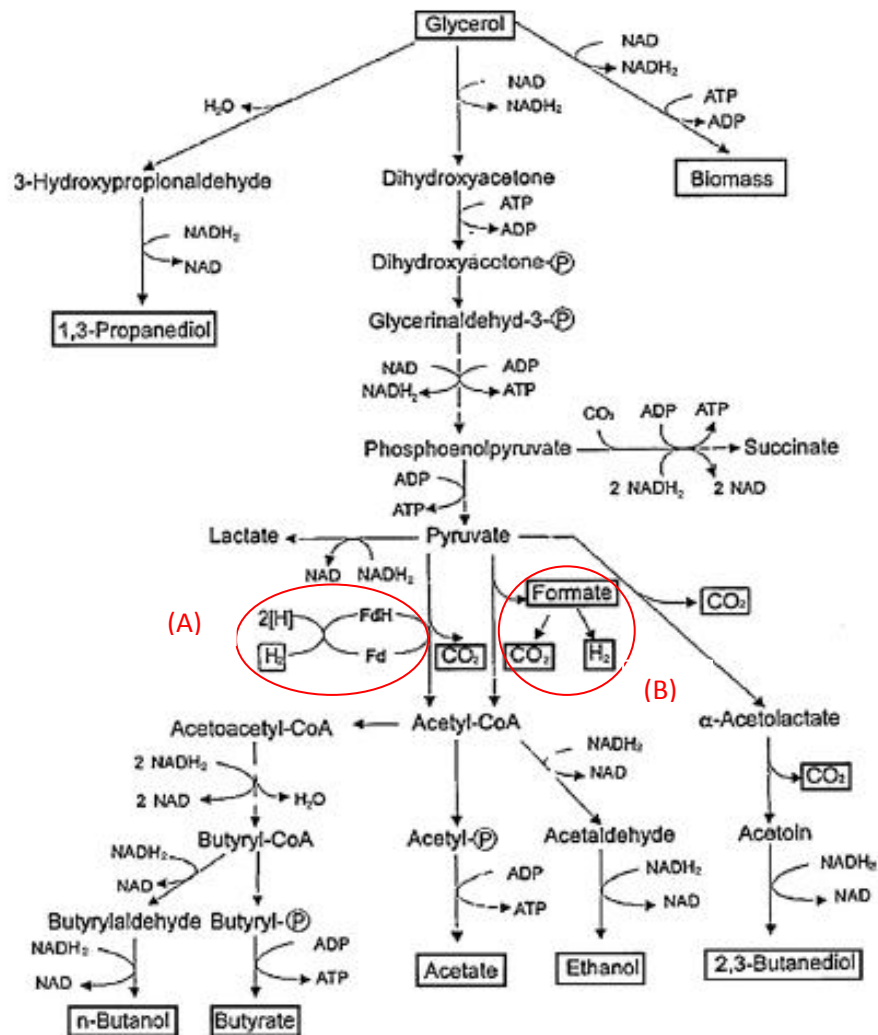
Portanto, o H<sub>2</sub> é gerado durante a via oxidativa do metabolismo do glicerol, e o propanodiol é produzido pelo metabolismo redutor. Quando as duas vias existem no mesmo microrganismo parte da produção de H<sub>2</sub> é consumida para a fabricação do propanodiol (Sarma *et al.*, 2012).

Segundo Kim *et al.* (2006), ainda há algumas limitações na produção do gás H<sub>2</sub>: apenas 10-20% da energia do substrato é recuperada, devido à baixa energia metabólica

originada da fermentação. Ainda não foi obtida uma estabilidade operacional, daí a necessidade de estudos que relacionem parâmetros como pH, tempo de retenção hidráulica, fonte de carbono e a própria pressão que o gás formado pode causar no cultivo.

O efeito inibitório que a pressão parcial do H<sub>2</sub> pode causar é o principal fator limitante para sua produção em grande escala, já que a pressão do gás diminui a atividade da enzima hidrogenase responsável pela produção e utilização de H<sub>2</sub> pelos microrganismos (Kalia *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2006; Maintinguer *et al.*, 2008).

Costa (2010) descreve a rota metabólica de fermentação do glicerol para a fabricação do H<sub>2</sub>, representada na Figura 3. As enzimas chaves e os genes têm sido identificados e caracterizados somente em *Citrobacter freundii* e *Klebsiella pneumoniae*. Segundo o autor, após a entrada do glicerol na célula por difusão, o glicerol pode ser metabolizado por dois modos paralelos compreendendo quatro enzimas codificadas pelo *operon dha*. O primeiro modo é a oxidação do glicerol pela glicerol desidrogenase (GDH), a dihidroxiacetona (DHA) com a geração de equivalentes redutores (NADH<sub>2</sub>), a qual é então fosforilada pela dihidroxiacetona kinase (DHAK) e direcionada para o metabolismo central. Depois o piruvato é então convertido a acetilcoenzima A (acetil-CoA), dióxido de carbono e H<sub>2</sub> pela oxidorreductase ferredoxina pirúvico e hidrogenase. O piruvato também pode ser convertido a acetil-CoA e formato, que pode ser prontamente convertido a hidrogênio e a dióxido de carbono pelas bactérias tais como *Escherichia coli*. Acetil-CoA é finalmente convertido em acetato, butirato e etanol dependendo do microrganismo e das condições do ambiente. NADH<sub>2</sub> é utilizado na formação de butirato e etanol e o NADH<sub>2</sub> residual podem ser oxidados produzindo hidrogênio e NAD. O ATP é gerado na formação do butirato e acetato do acetil-CoA. O segundo modo é a desidratação do glicerol a 3-hidroxi propionaldeído (3-HPA) pela glicerol desidratase (GDHt), o qual é convertido a 1,3 propanodiol pela enzima 1,3 propanodiol oxidorreductase (PDOR com a oxidação de NADH<sub>2</sub>).



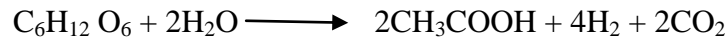
**Figura 3.** Rota bioquímica da fermentação do glicerol, indicando outros produtos de interesse, além do H<sub>2</sub>. Em (A) rota metabólica da ferredoxina, utilizada por microrganismos anaeróbios estritos. Rota metabólica do formiato, em (B), utilizada por microrganismos anaeróbios facultativos. Fonte: Amaral *et al.*, 2009.

Bactérias anaeróbias obrigatórias e anaeróbias facultativas são comumente utilizadas na produção de H<sub>2</sub>. Os rendimentos para a produção do biogás são variáveis, dependendo do substrato e da rota metabólica desenvolvida pelo microrganismo (Braga & Zaiat, 2014). Relatos de literaturas trazem que as bactérias anaeróbias facultativas produzem dois mols de H<sub>2</sub>/mol de glicose, segundo a equação abaixo, utilizando a rota bioquímica do piruvato formato liase (PFL) (Das, 2009; Sabaratnam & Ali Hassan, 2012; Braga & Zaiat, 2014).



(Equação 2)

Já bactérias estritamente anaeróbias produzem quatro mols H<sub>2</sub>/mol de glicose, como demonstrado na Equação 3, utilizando a rota do piruvato ferredoxina oxidoredutase (Das, 2009; Sabaratnam & Ali Hassan, 2012; Braga & Zaiat, 2014).



(Equação 3)

Quando usado o glicerol como fonte de carbono, este pode ser convertido em três mols de hidrogênio e um mol de ácido acético (Lovato, 2014).

Há vantagens em se utilizar microrganismos anaeróbios facultativos já que são menos sensíveis à presença de oxigênio e têm a capacidade de retomar a produção de H<sub>2</sub> em caso de esgotamento deste no meio. Como consequência, as bactérias anaeróbias facultativas são, em geral, mais indicadas na condução de um processo de bioprodução de H<sub>2</sub> por fermentação (Das e Veziroglu, 2008).

A produção de H<sub>2</sub> por fermentação anaeróbia pode ser realizada utilizando culturas mistas de microrganismos, co-culturas ou culturas puras bacterianas (Amaral *et al.*, 2009, Lay *et al.*, 2010). O processo fermentativo utilizando cultura pura é mais simples de manusear se comparado a culturas mistas, podendo inclusive ser capaz de metabolizar um maior espectro de substratos. Ito *et al.* (2005) relata que o glicerol é o substrato usado como fonte de carbono e que conduziu a um maior rendimento em H<sub>2</sub> e etanol, tendo uma mínima produção de subprodutos (acetato, butanodiol, acetona e lactato).

Vários microrganismos anaeróbios produzem H<sub>2</sub> a partir de compostos orgânicos contidos em diferentes tipos de resíduos. No caso, destacam-se bactérias mesófilas anaeróbias pertencentes ao gênero *Clostridium*, como *C. butyricum*, *C. pasteurianum*, *C. paraputrificum* e

*C. bifermentans*. Estes microrganismos representam cerca de 65% do total das populações produtoras de H<sub>2</sub> estudadas, em cultivos utilizando culturas puras (Chong *et al.*, 2009).

Outros microrganismos mesófilos, porém anaeróbios facultativos, pertencentes à família Enterobacteriaceae têm a capacidade de produzir H<sub>2</sub> (Amaral *et al.*, 2009). No caso, CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub> são liberados para a fase gasosa, e na fase líquida acumulam-se produtos como ácido fórmico, etanol e 2,3-butanodiol. A capacidade de produção de H<sub>2</sub> por culturas de *Enterobacter aerogenes* tem sido foco de vários estudos (Kapdan & Kargi, 2006, Markov *et al.*, 2010). Ito *et al.* (2005) em cultivo de *E. aerogenes* HU-101, identificou a formação de H<sub>2</sub> e etanol além da mínima produção de outros compostos quando o glicerol foi utilizado como substrato. Sob condições anaeróbias, microrganismos anaeróbios facultativos como *Klebsiella* são capazes de converter glicerol em metabólitos solúveis e gasosos, incluindo 1,3 propanodiol, 2,3- butanodiol, etanol, ácido acético, ácido succínio, H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>. Para a produção simultânea de H<sub>2</sub>, etanol, 1,3 propanodiol e 2,3- butanodio, Wu *et al.* (2011) destacam a necessidade de avaliação das condições operacionais - temperatura, pH e da concentração de glicerol.

### **3.4.3 Fatores que influenciam na produção biológica de H<sub>2</sub>**

A bioprodução de H<sub>2</sub> depende de uma série de condições e parâmetros operacionais e físico-químicos que influenciam o processo: nomeadamente, o tipo de inóculo e de substrato, o tipo de reator, a temperatura, a presença e a concentração de nutrientes além do pH (Xiao *et al.*, 2010; Wang & Wan, 2009).

Segundo Yasin *et al.* (2013) as bactérias produtoras de H<sub>2</sub> são estáveis em ambientes extremos como calor, pH ou elementos químicos, uma vez que geram esporos. Maintinguer *et al.*, (2008), destaca a necessidade de um pré-tratamento a quente do inóculo, a fim de se eliminar bactérias metanogênicas, pois algumas destas utilizam o H<sub>2</sub> em seu metabolismo. A autora também esclarece que o pré-tratamento a quente juntamente com o controle de pH têm

sido aplicados para a seleção de bactérias produtoras de esporos, o que favorece a produção de  $H_2$ , uma vez que estas bactérias são tolerantes a condições ambientais adversas e a temperaturas elevadas.

O pH é um fator limitante na produção de  $H_2$ , pois afeta diretamente a via metabólica dos microrganismos (Choi & Ahn, 2014). A influência do pH na fermentação é bem controversa na literatura (Lovato, 2014). Alguns estudos mostram que o pH ideal para a produção do gás é entre 5 e 7, já que em pH variando entre 6,5 e 7 a atividade dos microrganismos metanogênicos é afetada (Davila –Vazquez *et al.*, 2008; Choi & Ahn, 2014). O pH ácido, principalmente se estiver abaixo de 4,7, é altamente desfavorável, pois inibe a atividade das hidrogenases e outras enzimas responsáveis pelo processo de produção de  $H_2$ , diminuindo sua produção (Lamaison, 2009; Lovato, 2014). Wang & Wan (2009) descrevem que o pH ideal depende do inóculo a ser utilizado, podendo variar de 4,5 até 9. Em seus estudos, Choi & Ahn (2014) testaram fermentações de vários substratos, utilizando pH 6 e 9, tendo como conclusão que pH acima de 8 é desfavorável para a produção de  $H_2$ .

Para Wang & Wan (2009), as bactérias produtoras de  $H_2$  são capazes de consumir vários tipos de substratos, sendo que industrialmente, o modo de fermentação contínuo seria o mais indicado por demandar menos energia. Há um amplo espectro de substratos já testados: xilose, glicose, sacarose, amido, água residuária de arroz, leite em pó, efluente de cervejaria e restos de alimentos. Concentrações muito elevadas de substrato diminuem a produção de  $H_2$ . Ainda não existe um consenso sobre a concentração ótima de substrato. Liu *et al.* (2013) acredita que quando o glicerol é usado como substrato, este não seja um fator crítico para a fermentação, pois não encontram diferenças de produção do gás, em concentrações variando de 1 a 10g/L.

Uma das vantagens da produção de  $H_2$  por via biológica está relacionada à capacidade dos microrganismos de selecionarem o seu substrato, mesmo quando este se

encontra numa mistura de outros compostos. Assim, minimiza-se a necessidade de purificação do substrato fundamental ao processo, o que se traduz num maior espectro de matérias-primas que poderiam ser utilizados e uma menor necessidade de tratamentos químicos (Drapcho *et al.*, 2008). Substratos muito complexos precisam passar por tratamentos antes de serem utilizados, como por exemplo, os lodos ativados, que possuem grande quantidade de matérias orgânicas.

Quanto aos meios de cultivo utilizados na produção do H<sub>2</sub>, estes devem possuir composição semelhante aos utilizados na digestão anaeróbia completa da matéria orgânica. Já para culturas mistas, é importante suprimir a última etapa da digestão anaeróbia e que a composição do meio de cultura desfavoreça as bactérias metanogênicas (Maintinguer *et al.*, 2008).

Segundo Costa (2010), os critérios para a escolha do tipo de resíduo a ser usado na produção do H<sub>2</sub> são: a disponibilidade, custo, conteúdo em hidratos de carbono e biodegradabilidade. Diante destes fatores, os efluentes das indústrias alimentares (leite, azeite e queijo) podem ser usados para a fabricação do gás.

A temperatura é um importante parâmetro operacional, afetando diretamente o crescimento do microrganismo e em sua rota metabólica (Elsharnouby *et al.*, 2013). Estudos mostram que a temperatura ideal para a produção de H<sub>2</sub> varia entre 30°C e 55°C, dependendo do uso de bactérias mesófilas ou termófilas (Wang & Wan, 2009; Yasin *et al.*, 2013). Em condições mesofílicas a produção de H<sub>2</sub> se torna instável e descontínua, enquanto que em condições termofílicas a produção tende a ser estável e contínua (Fuess *et al.*, 2014).

Necessita-se fazer o tratamento térmico em temperaturas superiores a 70°C para a eliminação das bactérias consumidoras de H<sub>2</sub>, (Lamaison, 2009), uma vez que, em condições adversas, as produtoras de H<sub>2</sub> tem mais chances de sobreviver se comparado às hidrogenotróficas (Wang & Wan, 2009).



Para o crescimento de bactérias produtoras é essencial fontes de nitrogênio e fósforo, já que são importantes componentes de proteínas (Wang & Wan, 2009). Íons metálicos, como  $\text{Fe}^+$ , devem ser estudados, pois são essenciais para o funcionamento das hidrogenases, mas podem funcionar como inibidores das bactérias.

A produção de  $\text{H}_2$  é um processo anaeróbio e, portanto, não há problemas relacionados à limitação por  $\text{O}_2$  (Kotay e Das, 2009).

#### **3.4.4 Principais microrganismos envolvidos na produção biológica de $\text{H}_2$**

A produção de  $\text{H}_2$  pode dar-se por culturas puras de bactérias, ou seja, por um único microrganismo. Neves (2009) destaca que neste caso os microrganismos mais usados são os do gênero *Clostridium* e *Enterobacter*, sendo que a produção de  $\text{H}_2$  por *Enterobacter* apresenta a vantagem de não ter seu crescimento inibido em uma atmosfera de 100% desse gás, quando comparada à produção por *Clostridium*. Tal processo de produção também se faz por consórcios bacterianos em ambientes naturais como o lodo, por exemplo. No caso de uma fermentação por cultura mista deve-se ter cuidado, pois pode haver bactérias produtoras e bactérias consumidoras de  $\text{H}_2$ , o que levaria a um decréscimo na produção. Para se controlar esta situação, o ideal é aplicar pré-tratamentos no inóculo para suprimir atividades de bactérias que consumam  $\text{H}_2$ . Vários são os tratamentos que se pode aplicar: choque térmico (sendo o mais comum), ou adição de compostos químicos como clorofórmio, 2-bromoetanosulfato e isopropano (Neves, 2009).

A identificação da prevalência de um microrganismo ou a associações dos microrganismos na cultura mista dependerá das condições fermentativas e de uma metodologia de determinação das linhagens, que, efetivamente, estejam contribuindo para a produção do gás esperado.

Os gêneros *Archea* e *Bacteria* estão envolvidos neste tipo de processo. Podem desenvolver seus metabolismos em diferentes temperaturas: mesófilos (25 a 40°C), termófilos

(40 a 65°C), termófilos extremos (65°C a 80°C) e hipertermófilos (temperaturas superiores a 80°C) (Neves, 2009).

Em ensaios utilizando sacarose ou xilose como substrato para fermentação do inóculo advindo de dejetos da suinocultura, Maitinguer *et al.* (2008) identificou através de fragmentos de DNA amplificados e separados pela eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) os seguintes gêneros de microrganismos como envolvidos na produção de hidrogênio: *Burkholderia*, *Klebsiella*, *Clostridium* e *Enterobacter*. Os melhores resultados obtidos descritos pela autora foram para os reatores alimentados com sacarose, de 1,6 mols de H<sub>2</sub>/mol sacarose, com substrato inicial de 1184 mg sacarose/L; já para os ensaios com xilose em concentração inicial 3588 mg xilose/L, teve produção de 0,8 mols de H<sub>2</sub>/mol de xilose (Maitinguer *et al.*, 2008).

Estima-se que 64,6% das populações microbianas estudadas para produção de hidrogênio, trata-se do gênero *Clostridium* (*C. buytricum*, *C. pasteurianum*, *C. paraputrificum* e *C. bifermentans*). Estes microrganismos são anaeróbios e mesófilos. Produzem H<sub>2</sub> para a fase gasosa durante sua fase exponencial de crescimento. Por alterar seu metabolismo celular na fase estacionária, passam a produzir outros compostos tais como acetona, ao invés de hidrogênio. Ainda segundo o autor, microrganismos do gênero *Clostridium*, podem ser facilmente obtidos por tratamento calorífico de lodos biológicos (Neves, 2009).

Em estudos com diferentes substratos, glicose, peptona, e amido, peptona, Li *et al.* (2010), identificaram comunidades microbianas por através de técnica de DGGE, composta por *Clostridium sporogenes*, *Clostridium celerecrescens*, *Lactobacillus plantarum*, *Propionispira arboris* e *Clostridium butyricum*.

Para Lazaro *et al.* (2014), as bactérias fermentativas identificadas no reator de produção de H<sub>2</sub> incluem: *Enterobacter*, *Clostridium*, *Desulfovibrio vulgaris*, *Maegashaera elsdonii*, *Citrobacter inermidius* e *Escherichia coli*. Bactérias do gênero *Clostridium* são as

mais utilizadas, pois possuem alta capacidade de produção de H<sub>2</sub>, 1,61-2,36 mol de H<sub>2</sub>/ mol de glicose. *Enterobacter* apresentam rendimento de 1 mol de H<sub>2</sub>/mol de glicose. *E.coli* foi capaz de fermentar glicerol com uma produção de 0,69 mmol H<sub>2</sub>/L/h (Hu *et al.*, 2010)

Para fermentações com culturas puras, Wang & Wan (2009) descrevem como gêneros mais usados *Clostridium* e *Enterobacter*. Estas fermentações são geralmente conduzidas em batelada, tendo a glicose como fonte de carbono. Já para culturas mistas, os autores recomendam um pré-tratamento (choque térmico, ácido, base, aeração, congelamento e descongelamento, clorofórmio ou alguns tipos de ácidos) para que sejam eliminadas as bactérias que possam consumir H<sub>2</sub>, antes da fermentação.

Em fermentações utilizando glicerol residual da fabricação de biodiesel, *Klebsiella pneumoniae* apresentou capacidade de degradação deste e produção simultânea de H<sub>2</sub> e etanol (Costa, 2010).

Kuo *et al.* (2011) confia a produção do gás a uma comunidade bacteriana, com a maioria dos representantes pertencentes ao gênero *Clostridium*. A taxa máxima de produção do H<sub>2</sub> foi de 1.06 mmol-H<sub>2</sub>/h/g-VSS pela fermentação de resíduos de cozinha. *Acetobacterium paludosum*, *Beutenbergia cavernae*, *Cellulomas flaginea*, *Trichococcus palustris*, *Clostridium propionicum*, *Clostridium quinii* e *Thermolithobacter carboxydivorans* estão entre as bactérias produtoras de H<sub>2</sub> descritas por Chaganti *et al.* (2012) ao estudar a comunidade bacteriana de uma estação de tratamento de águas residuárias em Ontário, Canadá.

Bactérias termófilas dos gêneros *Deasulfotomaculum* e *Thermococcus* são descritas como produtoras de H<sub>2</sub> em condições mesófilas. A produção de H<sub>2</sub> em temperaturas baixas reduz custos do processo fermentativo (Neves, 2009).

A seguir a relação de alguns microrganismos capazes de produzir H<sub>2</sub> pela conversão do glicerol e do glicerol residual (Tabela 2).

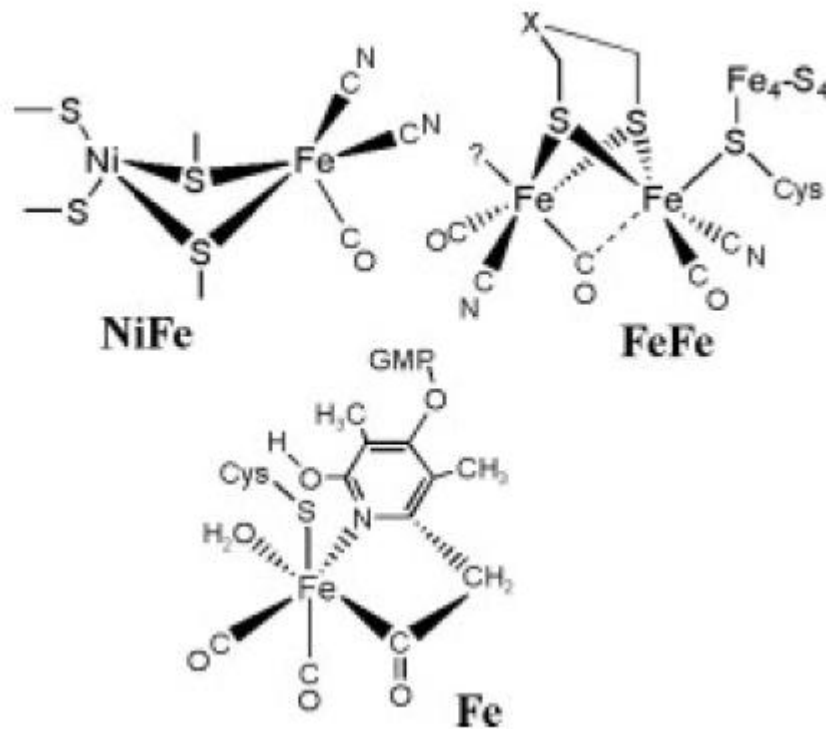
**Tabela 2.** Microrganismos capazes de produzir hidrogênio pela metabolização do glicerol puro ou residual.

<b>Microrganismo</b>	<b>Máxima produção de hidrogênio</b>	<b>Autores</b>
<i>Klebsiella pneumoniae</i> DSM 2026	0,53 mol H <sub>2</sub> / mol glicerol	Liu e Fang (2007).
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0,77 mol H <sub>2</sub> / mol glicerol	Marques <i>et al.</i> (2009).
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0,2 mol H <sub>2</sub> / mol glicerol	Markov <i>et al.</i> (2010).
<i>Klebsiela sp. HE1</i>	0,345 mol H <sub>2</sub> / mol glicerol	Ken-Jer <i>et al.</i> (2011).
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1,22 mol H <sub>2</sub> / mol glicerol	Jitrwung & Yargeau (2011).
<i>Thermotoga neapolitana</i>	0,620 mol H <sub>2</sub> / mol glicerol	Ngo & Sim (2012).
<i>Klebsiela pneumoniae BLh-1</i>	0,312 mol H <sub>2</sub> / mol glicerol	Rossi (2011).
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0,84 mol H <sub>2</sub> / mol glicerol	Jitrwung <i>et al.</i> (2013).
<i>Halanaerobium saccharolyticum</i> e <i>Clostridium butyricum</i>	3 mol H <sub>2</sub> / mol glicerol	Kivisto <i>et al.</i> (2013).
<i>Clostridium pasteurianum</i> , <i>C. butyricum</i> e <i>Klebsiella sp.</i>	0,93 mol H <sub>2</sub> / mol glicerol	Lo <i>et al.</i> (2013).

### 3.5 ENZIMAS ENVOLVIDAS NA PRODUÇÃO DE H<sub>2</sub>

As hidrogenases são o principal grupo de enzimas envolvida na produção de H<sub>2</sub> por fermentação microbiana (Vignais *et al.*, 2001; Vignais & Billoud, 2007; Heinekey, 2009; Hallenbeck, 2012; Sabaratnam & Ali Hassan, 2012). O primeiro relato de sua atividade foi em 1931, no crescimento e produção de hidrogênio por *E. coli* (Heinekey, 2009). Este conjunto de enzimas catalisam a formação e a decomposição do H<sub>2</sub>. Seu pH ótimo varia entre 6,5-7,5 (Hallenbeck, 2012; Sabaratnam & Ali Hassan, 2012). Ela foi encontrada em procariontes, eucariontes, protozoários e fungos (Vignais *et al.*, 2001; Heinekey, 2009). Seus genes estão nomeados em ordem alfabética de acordo com a sua posição no *cluster*.

A partir de 2004, as hidrogenases foram classificadas em três tipos, segundo seus sítios ativos: [Fe] hidrogenases, [FeFe] hidrogenases, presentes no Domínio Bacteria e Eucaria; e [NiFe] hidrogenases, presentes em Arqueas e Bactérias (Vignais *et al.*, 2001; Vignais & Billoud, 2007). A Figura 4 demonstra os sítios das diferentes hidrogenases.



**Figura 4.** Estrutura dos três tipos de enzima hidrogenase, enfatizando seus sítios ativos.  
Fonte: Hallenbeck, 2012.

As hidrogenases são enzimas expressas preferencialmente em anaerobiose. As [FeFe] hidrogenase são rapidamente destruídas na presença de oxigênio, enquanto as [NiFe] hidrogenase podem reagir com o oxigênio gerando intermediários que podem ser reativados por redução (Hallenbeck, 2012). Microrganismos Gram positivos do Filo Firmicutes possuem enzimas do tipo [FeFe], já Proteobactérias Gram negativas expressam [NiFe] hidrogenases (Hallenbeck, 2012).

### 3.5.1 [NiFe] hidrogenases

A maioria das hidrogenases conhecidas pertencem à classe das [NiFe] hidrogenases, sendo a classe mais estudada. O centro ativo desta enzima é bimetálico contendo um Ni e um Fe. O níquel está ligado a quatro cisteínas, duas das quais fazem parte o ferro. O ferro ainda é coordenado por uma molécula de monóxido de carbono e dois íons cianetos ligados (Baltzer, 2009).

As [NiFe] hidrogenases são divididas em 4 subgrupos. O grupo 1, Hyd-1 são as hidrogenases que possuem capacidade de se associarem a parceiros metabólicos com potencial de oxirredução, permitindo que *in vivo* o H<sub>2</sub> seja oxidado e usado como fonte de energia (Vignais *et al.*, 2001; Viganis & Colbeau, 2004; Vignais & Billoud, 2007). As hidrogenases que formam o grupo 2 (Hyd-2) estão presentes em cianobactérias, com função de fixação de nitrogênio (Viganis & Colbeau, 2004). O grupo 3, Hyd-3, são as hidrogenases citoplasmáticas reversíveis, estão associadas a subunidades que ligam cofatores solúveis, como o cofator F420, o NAD e o NADP (Vignais *et al.*, 2001; Viganis & Colbeau, 2004; Vignais & Billoud, 2007). As enzimas pertencentes ao grupo 3 catalisam as reações nos dois sentidos. Hyd-4, o quarto subgrupo das [NiFe], produzem H<sub>2</sub> como forma de eliminar o excesso de equivalentes redutores resultantes da oxidação anaeróbia de compostos orgânicos (Vignais *et al.*, 2001; Baltazar, 2009; Heinekey, 2009).

Cada microrganismo pode expressar diferentes hidrogenases, localizadas em diferentes compartimentos celulares (Vignais *et al.*, 2001). Esta característica reflete a importância do H<sub>2</sub> para o metabolismo, garantindo uma forma rápida e eficiente diante de mudanças energéticas garantindo o crescimento celular (Vignais *et al.*, 2001).

São muitos os genes de hidrogenase para cada tipo de enzima. A função de cada uma das subunidades enzimáticas ainda não foi bem entendida, uma vez que dependendo do tipo de substrato usado na fermentação elas se comportam de maneira diferente (Sanchez – Torres *et al.*, 2013).

Em *E.coli*, por exemplo, foi estudado o comportamento da Hyd-1, Hyd-2, Hyd-3 e Hyd-4. Quando usado glicose como substrato Hyd-1 e Hyd-2 parecem atuar diretamente na síntese de H<sub>2</sub>, enquanto Hyd-3 e Hyd-4 não parecem participar do processo. Em contrapartida, quando utilizado o glicerol como substrato, Hyd -2 e Hyd- 3 desempenharam um papel importante enquanto Hyd-1 e Hyd-4 não demonstraram relação no crescimento celular e

produção de H<sub>2</sub>. Quando inativadas, as hidrogenases 2 e 3 em fermentação de glicose, ocorre a diminuição do crescimento celular. Estas mesmas hidrogenases inativadas em fermentação de glicerol, o crescimento celular não é afetado. A função da hidrogenase 3 fica relacionada à síntese de H<sub>2</sub>, enquanto a da hidrogenase 2, necessária para síntese de glicerol, não houve impactos significativos inativando a hidrogenase 1 e 4 (Sanchez – Torres *et al.* 2013).

### 3.5.2 [FeFe] hidrogenases

No centro ativo das [FeFe] hidrogenases há dois átomos de ferros, sendo um deles coordenado por uma molécula de CO e o outro por um íon CN<sup>-</sup>. O outro núcleo de ferro está ligado a uma molécula CN<sup>-</sup>, uma molécula CO e uma cisteína que coordena simultaneamente um outro centro [4Fe4S]. Fazendo a ponte entre os dois ferros há uma molécula de DTN (Baltazar, 2009; Hallenbeck, 2012).

As hidrogenases deste tipo são, na sua maioria, citoplasmáticas. Quando comparadas com as [NiFe] hidrogenases, possuem atividade de produção de H<sub>2</sub> mais altas, porém são mais sensíveis ao oxigênio (Baltazar, 2009).

### 3.5.3 [Fe] hidrogenases

Estas enzimas possuem um centro ativo mononuclear. Ocorrem apenas em algumas *Archaea* metanogênicas (Vignais *et al.*, 2001; Baltazar, 2009). Precisam se associar a cofatores específicos e possuem propriedades catalíticas diferentes das [NiFe] e [FeFe] hidrogenases, por exemplo, não catalisam a reação reversível:  $2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \leftrightarrow \text{H}_2$  (Vignais & Colbeau, 2004).

## 3.6 LODOS E EFLUENTES

Com o aumento populacional e dos parques industriais, houve também o crescimento de resíduos descartados. A maioria dos efluentes é líquido e trata-se de misturas relativamente

complexas. Para o tratamento destes efluentes gerados no decorrer dos processos industriais, são implementadas as Estações de Tratamento de Efluentes (ETE) que geram subprodutos como o lodo, composto por microrganismos, coloides, polímeros orgânicos, cátions, óleos e gordura, surfactantes, ureia, etc. (Fernandes *et al.*, 2003; Lovato, 2014).

O sistema de lodo ativado é amplamente utilizado para o tratamento de dejetos domésticos e industriais em situações onde é produzida uma elevada quantidade de efluente final. Este sistema de tratamento está baseado na capacidade microbiana, principalmente bacteriana, em catabolizar diferentes compostos orgânicos (Ponezi *et al.*, 2005). A degradação dos poluentes presentes nestes efluentes pode ocorrer de forma aeróbia ou anaeróbia, principalmente por Proteobactérias. As bactérias presentes com mais frequência no efluente são: *E.coli*, *Streptococcus* ou coliformes totais (Foladori *et al.*, 2010). Estes desempenham funções específicas no processo de lodos ativados, onde se aglomeram e formam blocos microbianos ou filmes biológicos (biofilmes), fazendo a bioconversão de produtos orgânicos em produtos mais simples. Estes aglomerados são constituídos por microrganismos com predomínio de bactérias (podendo também constar a presença de fungos, algas e protozoários) envolvidas por uma massa orgânica de exopolímeros extracelulares excretados pela própria célula bacteriana (Dezotti, 2008). Vários estudos têm se referido à microbiologia dos lodos, mas não há métodos disponíveis para quantificar rapidamente a biomassa bacteriana, devido justamente ao aglomerado formado pelas mesmas, sendo que hoje, a maioria dos métodos de identificação está baseada no cultivo microbiano (Foladori *et al.*, 2010).

A disposição final destes resíduos sólidos e não inertes (lodo) provenientes de sistemas de tratamento de efluentes industriais e sanitários representa um problema de âmbito mundial. Uma solução econômica e ambientalmente correta é a sua utilização como matéria - prima em determinados processos, como por exemplo, fonte de energia renovável, tornando o



processo sustentável (Costa, 1995; Borowski *et al.*, 2002; Fernandes *et al.*, 2003; Borges *et al.*, 2008, Botta *et al.*, 2014).

Os processos de tratamento anaeróbio de efluentes vêm ajudando na diminuição da poluição ambiental. Esta tecnologia apresenta baixo custo econômico e uma resposta satisfatória aos interessados, tanto por parte das indústrias como dos órgãos de fiscalização (Poetsh & Koetz, 1998).

Além disso, os lodos e efluentes podem ser provenientes de atividades agroindustriais, como por exemplo, a criação de animais. Um dos problemas enfrentados na criação intensiva de animais é a grande quantidade de resíduos produzidos diariamente. Estes resíduos podem ser constituídos de dejetos, material usado em camas, água e restos de animais. Manejados de forma errônea são fonte de poluição ao ambiente (Moraes & Paula Júnior, 2004).

Um exemplo de criação de animais é a suinocultura e a bovinocultura, atividades de grande importância econômica para os estados do sul do Brasil. Considerada uma atividade de alto poder poluidor, frente ao elevado número de contaminantes em seus efluentes. A prática mais adotada para manejo é a armazenagem desses resíduos em lagos ou tanques para serem usados posteriormente como fertilizantes (Vivan *et al.*, 2010).

Outra atividade altamente poluente e que merece destaque no Brasil, se refere ao refino do petróleo, em que são utilizados em média 246 a 3640 litros de água por barril de óleo cru, gerando em torno de 0,4 a 1,6 vezes o volume de óleo processado em águas residuárias. Estas possuem geralmente um pH bastante alcalino, vários compostos tóxicos, além de elevadas DBO e DQO (Santaella *et al.*, 2009).

Torna-se necessário um destino adequado destes efluentes.

### 3.7 CARACTERIZAÇÃO BACTERIANA

Métodos tradicionais (obtenção de carbono, exigências nutricionais, meio de cultivo e observação ao microscópio) para o crescimento e identificação de microrganismos se mostraram ineficientes ao longo do tempo por fornecer informações limitadas, sendo maior a limitação quando o objeto de estudo é uma comunidade bacteriana (Pinhati, 2008). Sendo assim, apenas o uso de técnicas tradicionais não supre as necessidades para o conhecimento de uma nova espécie bacteriana. Tendo em vista tais limitações, as técnicas moleculares de identificação de microrganismos são as mais indicadas, por serem mais rápidas, uma vez que não precisa fazer o crescimento do microrganismo, e apresentam menor custo envolvido. Através das técnicas moleculares é possível a identificação de microrganismos ainda desconhecidos (Wagner & Cloete, 2002).

A análise baseada na sequência gênica do gene que codifica o segmento 16S do rRNA constitui um método de grande importância na microbiologia e é usado na exploração da diversidade microbiana e na identificação de bactérias. Em 2002, um comitê reavaliou a definição de espécie em bacteriologia e informou que todas as novas descrições de espécie deveriam incluir a sequência de rRNA da estirpe tipo. O 16S rRNA atende a todas as exigências dos marcadores moleculares descritos para a filogenética, servindo como sinal de medida sistemática para procariontes. Grande parte das espécies procarióticas descritas são representadas por sequências de 16S rRNA. Os genes codificadores apresentam regiões conservadas em seus elementos estruturais (Higashi, 2008).

Segundo Higashi (2008), a taxonomia bacteriana é composta por três áreas distintas e interrelacionadas: classificação, disposição dos organismos em grupos (táxons) segundo similaridades e relacionamentos; nomenclatura, designação de nomes aos grupos taxonômicos de acordo com regras internacionais; identificação, uso prático de um esquema de

classificação para determinar a identidade de um isolado como um membro de determinado táxon, ou como membro de uma espécie não identificada ainda.

### **3.7.1 O gene 16S do rRNA**

Em procariontes, os genes 16S rRNA são essenciais e ocorrem em pelo menos uma cópia do genoma (Wang & Qian, 2009).

Visando diminuir as dificuldades e técnicas de cultivo, além do melhoramento no entendimento da diversidade microbiana, a região conservada do genoma bacteriano denominada 16S rRNA é ideal para ser utilizada na avaliação da diversidade de microrganismos (Silveira, 2004).

Como descrito por Silveira (2004), o gene 16S rRNA é parte do sítio de ocorrência da síntese proteica, portanto se encontra em todas as bactérias. Por apresentar características conservativas ao longo da evolução, este gene pode servir como indicador da relação dos microrganismos ao longo da evolução, através da medida da distância filogenética entre os organismos. Variações nas sequências dos nucleotídeos do gene de 16S rRNA são indícios de mudanças evolucionárias.

Quando se pretende amplificar todo o gene 16S rRNA, deve-se utilizar iniciadores com sequências conservadas próximas às extremidades 5' e 3' do gene, que produzem amplificadores com aproximadamente 1500pb (pares de bases), sendo que a maior variedade se concentra nas primeiras 500 bases nucleotídicas, correspondentes a extremidade 5' (Pinhati, 2008).

A utilização do gene 16S rRNA revolucionou o campo da ecologia microbiana e, com seu uso é possível investigar e determinar posições filogenéticas de comunidades bacterianas de meio ambiente (Silveira, 2004).

### 3.7.2 Técnicas moleculares de identificação microbiana

O desenvolvimento das técnicas de biologia molecular possibilita um avanço bastante grande na biologia a partir do século XX, principalmente nas áreas de sequenciamento e expressão de genes (Novais & Alves, 2004). Atualmente, as principais técnicas para identificação microbiana são Reação em Cadeia Polimerase (PCR), Reação em Cadeia Polimerase em Tempo Real, Eletroforese em Gradiente de Gradiente Desnaturante (DGGE) e o sequenciamento de DNA.

O PCR permite a replicação do DNA *in vitro*, amplifica esta molécula milhões de vezes, o que facilita a análise genética e permite o desenvolvimento de técnicas de diagnóstico muito mais sensível através do uso da DNA polimerase e de *primers* que se ligam à cadeia de DNA no início da síntese (Sena Oliveira *et al.*, 2007). Segue o princípio natural de replicação do DNA em três fases: desnaturação, hibridização, extensão (Novais & Alves, 2004).

A técnica de DGGE permite a separação de DNA com o mesmo tamanho, porém, com sequências de nucleotídeos diferentes, baseada na mobilidade eletroforética de uma molécula de DNA parcialmente desnaturada em gel de poliacrilamida contendo gradiente crescente de agentes desnaturantes (ureia e formamida). Entre uma sequência de 500pb, pode-se detectar a mudança de um único nucleotídeo. A técnica permite ter uma ideia das espécies predominantes nas amostras, sendo ideal para analisar um grande número de amostras, permitindo realizar o sequenciamento de bandas isoladas dos géis, o que é ideal para monitorar bactérias a partir de amostras ambientais (Pinhati, 2008).

O sequenciamento genético foi descrito em 1977 por Sanger. Trata-se de um procedimento que pode ser feito de maneira química ou enzimática. Esta técnica também é chamada de didesoxinucleotídeo. O princípio geral é efetuar a síntese de uma fita de DNA “marcada” complementar à fita, a qual se deseja determinar a sequência. Inicialmente ocorre a desnaturação da fita de DNA para a obtenção de uma fita simples, após a ligação do *primer*

ocorre a duplicação da fita de DNA com a adição de dNTPs pela DNA polimerase. Juntamente com a reação de PCR são misturadas pequenas quantidades de ddNTPs “marcados com fluorescência”, sendo uma cor diferente para cada um dos quatro ddNTPs. Quando um ddNTPs é adicionado à fita polinucleotídica no lugar do dNTP, a amplificação da cadeia para. Após, os vários fragmentos de DNA são separados por tamanho em eletroforese. Conforme os fragmentos migram diferentemente no gel são separados, a base terminal é identificada por um feixe de luz. As informações passam diretamente para um computador que converte em um gráfico de picos, eletroferograma. Uma vez identificada a sequência genética é comparada com sequências depositadas em bancos genéticos para a identificação do microrganismo (Souza & Brusamarello, 2009).

### **3.8 PERSPECTIVAS DA PRODUÇÃO DE H<sub>2</sub>**

O preço da energia está subindo rapidamente devido ao esgotamento dos combustíveis fósseis. O H<sub>2</sub> é amplamente reconhecido como uma alternativa promissora aos combustíveis fósseis (Levin & Azbar, 2012; Lee, 2013). A pesquisa de produção desse gás cresceu vertiginosamente nos últimos seis anos (Levin & Azbar, 2012). A principal limitação para a produção de H<sub>2</sub> é o alto custo de produção. Embora este custo possa baixar significativamente usando biorresíduos como substrato de fermentação, uma vez que 30-40% dos custos de produção estão relacionados ao substrato (Wang *et al.*, 2008; Sabaratnam & Ali Hassan, 2012).

O desenvolvimento desta energia é quase impossível sem grandes investimentos (Lee, 2013). Há algumas medidas além de sua produção que ainda precisam ser muito estudadas, como é o caso do armazenamento do gás, devido à alta inflamabilidade, além de sua distribuição (Dutta, 2013; Lee, 2013).

Na Europa e na Ásia há vários estudos sobre a introdução do H<sub>2</sub> como fonte de energia. O Japão, por exemplo, vem pesquisando este gás desde 1974 com o projeto “*Project Sunshine*” (Dutta, 2013). O país, desde o desastre de Fukushima, tem exigido muitas fontes alternativas de energia para apoiar o crescimento econômico e a qualidade de vida dos cidadãos. Eles pretendem construir rodovias de H<sub>2</sub> para carros e cidades movidos a H<sub>2</sub> (Lee, 2014).

Lee & Chiu (2012) analisaram as possíveis tendências no desenvolvimento do setor de H<sub>2</sub> em quatro países: Estados Unidos, China, Japão e Índia. A China terá o maior mercado e o Japão o maior potencial em substituir os combustíveis fósseis por H<sub>2</sub>. Os autores ainda afirmam que há alguns obstáculos na transição desta economia, como por exemplo, comprar um carro e não ter onde abastecer ou investir em uma rede de reabastecimento sem nenhum carro. Portanto, a tecnologia de produção e a infraestrutura devem ser desenvolvidas simultaneamente.

Lee (2013) estima que a Ásia será o continente mais produtivo em biogás no período de 2008 à 2060. Enquanto a América Latina terá o maior crescimento anual na produção, com uma taxa de 6,41%.

Dutta (2013) acredita que a solução para lugares isolados, ou com potencial hidroelétrico, como o Brasil, seja a mistura entre a energia hidroelétrica e a energia do H<sub>2</sub>.

Estima-se que até 2050, com intenso investimento, a transição da economia do petróleo para a do H<sub>2</sub> seja alcançada (Lee *et al.*, 2009; Lee & Chiu, 2012); até 2030 a produção de H<sub>2</sub> seja praticamente toda baseada na gaseificação da biomassa (Lee, 2013).

Diante disso, o presente trabalho teve por objetivo isolar e caracterizar bactérias de reatores de tratamento de efluentes e lodos ativados, capazes de produzir H<sub>2</sub> combustível, a partir de glicerol. Sendo assim, uma forma de aproveitamento do subproduto da fabricação do biodiesel para a geração de energia renovável.

## **4. MATERIAL E MÉTODO**

### **4.1 INÓCULO**

Os microrganismos foram isolados a partir de seis amostras de lodos aeróbios de estações de tratamento: duas amostras oriundas de Tanques de membrana do Sistema MBR da Refinaria de petróleo Revap (Petrobrás-São José dos Campos/SP), uma amostra de lodos agroindustriais (Carlos Barbosa/RS), uma amostra de compostagem (Carlos Barbosa/RS) e duas de suinocultura (Caxias do Sul/RS e Carlos Barbosa/RS).

### **4.2 MEIOS DE CULTIVO**

Para substrato de fermentação, utilizou-se o glicerol residual oriundo da fabricação do biodiesel, proveniente da Petrobrás e o glicerol vendido comercialmente.

Foram utilizados diferentes meios de cultura: MG1, a fim de isolar os microrganismos capazes de crescer tendo este como fonte de carbono (Tabela 3 e 4); meio de cultivo LB (Tabela 5), meio mínimo de crescimento (Sambrook & Russell, 2001), para quantificar a produção de H<sub>2</sub> (Tabela 6 e 7) e MG2, também para quantificar a produção do gás (Tabela 8). Todas as soluções tiveram seu pH regulado para 6,8 e foram autoclavadas à 120°C por 20min a 1atm.

**Tabela 3.** Composição do meio de cultivo MG1(g/L).

Composto	Concentração em (g/L)
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,52
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,25
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0,2
Extrato de levedura	1,5
Peptona bacteriológica	1
Glicerol <sup>a</sup>	30
*Solução traço	1 mL
Água destilada	1000 mL

\*Fonte: Costa,2010.

\*Para o preparo do meio de cultivo sólido foi adicionado ágar na proporção de 15g/L.

<sup>a</sup> Houve a troca entre glicerol e glicerol residual.

**\*Tabela 4.** Composição da solução de elementos traço (g/L), utilizado no MG1.

Composto	Concentração (g/L)
MnCl <sub>2</sub> . 4H <sub>2</sub> O	0,1
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,06
CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	0,0037
CoCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	0,2
NiCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	0,025
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0,035
ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0,14
HCl (37%)	0,9 mL
H <sub>2</sub> O destilada	1000mL

\*Fonte: Costa, 2010.

**Tabela 5.** Composição do meio de cultivo Luria Bertani (LB) (g/L).

Composto	Concentração (g/L)
Triptona	10
NaCl	10
Extrato de levedura	5
H <sub>2</sub> O destilada	1000mL

\* Para o preparo do meio de cultivo sólido foi adicionado ágar na proporção de 20g/L.



**Tabela 6.** Composição do meio mínimo de cultivo (mL/L)

Composto	Soluções (mL)
H <sub>2</sub> O destilada	750
*5× M <sub>9</sub> sais	200
1 mol/L MgSO <sub>4</sub>	2
*20% da fonte de carbono	20
1 mol/L CaCl <sub>2</sub>	0,1

\*Fonte de carbono composta por 18mL de solução de glicerol residual ou glicerol à 20% com 2mL de solução de glicose à 20%.

\*Fonte : Sambrook &Russell, 2001.

**Tabela 7.** Composição da solução 5× M9 sais, utilizado no meio mínimo de cultivo (g/L).

Composto	Concentração (g/L)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	64
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	15
NaCl	2,5
NH <sub>4</sub> Cl	5
H <sub>2</sub> O destilada	980mL

\*Fonte : Sambrook &Russell, 2001.

**Tabela 8.** Composição do meio de cultivo MG2 (g/L).

Composto	Concentração (g/L)
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5,5
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0,25
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0,021
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0,12
Ácido nicotínico	0,002
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	0,000172
NiCl <sub>2</sub>	0,00002
Triptona	5
Extrato de levedura	5
Glicerol <sup>a</sup>	15
MnCl <sub>2</sub> . H <sub>2</sub> O	0,5
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,1
Na <sub>2</sub> EDTA	0,5
CuCl <sub>2</sub> . H <sub>2</sub> O	0,001
Alk(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> . H <sub>2</sub> O	0,01
H <sub>2</sub> O destilada	1000mL

\*Fonte: Neves, 2009.

<sup>a</sup>Glicerol residual ou glicerol

### 4.3 ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA DO SUBSTRATO

A análise físico-química do substrato foi feita seguindo *Standard Methods For Examination of Water and Wastewater* (2012), analisando DQO (demanda química de oxigênio), cálcio, ferro, magnésio, potássio e sódio totais. A amostra de glicerol residual foi de origem da indústria petrolífera e o glicerol comercial da marca *Simoquímica*®. As análises foram realizadas no Laboratório de Análises e Pesquisas Ambientais (LAPAM) da Universidade de Caxias do Sul.

### 4.4 PRÉ –TRATAMENTO DO INÓCULO

Com a finalidade de eliminar os microrganismos hidrogenotróficos, foi realizado o tratamento térmico das amostras, segundo Rossi *et al.*(2011), com algumas modificações.

Microtubos de reação (2 mL) com 1 mL de amostra de lodo foram mantidos em estufa a 100°C durante cinco tempos diferentes: T<sub>1</sub>- 15minutos; T<sub>2</sub>- 30minutos; T<sub>3</sub>-45minutos; T<sub>4</sub>- 60 minutos e T<sub>5</sub>. 75 minutos. O controle foi realizado com as mesmas amostras de lodos sem serem submetidas ao tratamento térmico.

### 4.5 ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS

Ao término do tratamento térmico, as amostras foram centrifugadas por 2 min a 10.000 g. Os sobrenadantes foram transferidos (1 mL), através de seringas estéreis, para frascos de vidro (20 mL) contendo 10 mL de meio líquido MG1, fechados com tampas de borracha e lacre de alumínio. Para garantir a anaerobiose, foi borbulhado gás nitrogênio durante 5 minutos diretamente no meio de cultivo. Os frascos foram mantidos em agitador orbital a 140 rpm por 17 h a 37 °C e transferidos para estufa de incubação por 24 h a 37°C.

Após o crescimento, foi feito o estriamento direto com alça de platina em placas de Petri contendo meio sólido MG1. As placas foram mantidas em jarra de anaerobiose em estufa de incubação por 48 h a 37°C. O procedimento foi realizado até que se obtivesse colônias visivelmente isoladas.

Para análise microscópica, os microrganismos foram submetidos à coloração de Gram e observação ao microscópio óptico *Bioval*<sup>®</sup>.

As cepas foram guardadas em tubos de centrífuga (2 mL) estéreis com meio de cultivo LB (1 mL), sendo 3% do volume de glicerol e armazenadas no freezer a – 80°C.

#### **4.6 EXTRAÇÃO DOS ÁCIDOS NUCLEICOS**

A extração foi realizada com o “kit” *Illustra<sup>TM</sup> bactéria genomicPrepMini-Spin* (GE Healthcare), seguindo o protocolo do fabricante.

Foram transferidos 1 mL da amostra para um microtubo e centrifugado por 30 segundos. Os sobrenadantes foram descartados e adicionou-se 40 µL de tampão de lise tipo 2. Após agitada, a mistura recebeu 10 µL de proteinase K diluída em tampão. Foi adicionada à amostra tampão de lise tipo 3 e agitado em vortex. A mistura foi separada por centrifugação a 3000g por 5 segundos em centrífuga refrigerada. Em banho-maria, as amostras foram mantidas a 55 ° C por 7 minutos, quando então, foram novamente centrifugadas. Aos produtos da extração foram adicionados 500 µL do tampão tipo 4 e, decorridos 5 minutos, a temperatura ambiente, as amostras foram agitadas em vórtex então centrifugadas por 3500 g por 5 segundos, seguidos de nova incubação à temperatura ambiente. 400 µL do sobrenadante foram transferidos para a coluna dos *miniprep* presente no kit que foram centrifugados por 1 minuto a 10.000 g.

À coluna foram adicionados 400  $\mu\text{L}$  do tampão 4 e centrifugado durante 1 minuto a 10.000  $g$ . Depois de descartado o filtrado, uma nova adição de 500  $\mu\text{L}$  foi de tampão de lavagem tipo 6 e centrifugada por 3 minutos a 13000  $g$ .

As colunas foram transferidas para tubos novos para a eluição do DNA e para isso foi adicionados 200  $\mu\text{L}$  de tampão de eluição, tipo 5, previamente aquecido. Incubaram-se as amostras por 1 minuto à temperatura ambiente e seguida por centrifugação por 1 minuto a 13000  $g$ .

As amostras obtidas da extração de DNA bacteriano foram avaliadas quanto à pureza e à concentração de DNA por meio da análise de densidade óptica (DO) em espectrofotômetro, como descrito por Sena Oliveira *et al.* (2007).

Foram preparadas diluições das amostras, 5 $\mu\text{L}$  da amostra de DNA diluídos em 495 $\mu\text{L}$  de água ultrapura (diluição 1: 100) e analisadas em espectrofotômetro em dois comprimentos de onda: o DNA absorve luz no comprimento de 260nm e as proteínas em 280 nm.

A avaliação da quantidade de DNA extraído deu-se pela relação entre a quantidade de DNA e a quantidade de proteínas ( $\text{DO}_{260}/\text{DO}_{280}$ ). Valores ideais desta relação são próximos a 1,8. Números muito inferiores demonstram contaminação por proteínas.

Quanto à qualidade, o DNA foi avaliado por meio de eletroforese gel de agarose a 1% (m/v), voltagem constante de 100 V, durante 1 hora, corado com brometo de etídio (1,5  $\mu\text{L}$ ).

#### 4.7 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE – PCR

As amplificações do DNA das bactérias isoladas foram realizadas por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com o kit *Phusion High-Fidelity<sup>TM</sup> PCR* (Finnzymes), seguindo o protocolo do fabricante. Foram utilizados *primers* padrão para a amplificação do gene 16S rRNA, sendo: “16S-F 5’-CCTGGCTCAGGACGAACGCTGG-3’”, posicionado em 600pb e “16S-R 5’- CTGCGCTCGCTTTACGCCAAT-3’”, posicionado em 1320 pb, portanto, amplifica um produto de 720 pb. O volume final da reação foi de 20 µL: 9,8 µL de água Milli-Q (esterilizada), 4 µL de tampão 5×, 0,4 µL de uma mistura de dNTPs (10 mM), 0,5 µL de cada *primer* (2 mM), 0,6 µL de DMSO; 0,2 µL DNA polimerase 2 U/µL e 4 µL de amostra de DNA. Todas as amplificações foram acompanhadas por controle negativo, isto é, sem DNA .

A reação final de PCR foi realizada em termociclador (TONEDERM<sup>®</sup>), sendo o ciclo de desnaturação inicial realizado durante 30 segundos a 98°C (1 ciclo). Os ciclos de desnaturação e anelamento 10 segundos a 98°C, 1 min. e 30 segundos a 61 °C e 30 segundos a 72 °C (repetidos por 35 ciclos) a extensão final foi realizada durante 10 min a 72 °C, por um ciclo.

Após o término da reação, foi realizada eletroforese (80 volts) durante duas horas e trinta minutos em gel de agarose (1,5% p/v) com *GelRed<sup>TM</sup> Nucleic Acid Gel Stain* (Biotium, solução 5× concentrada) e visualização do amplificado em 720 pb no transiluminador com luz UV.

#### 4.8 PURIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS E SEQUENCIAMENTO DE DNA

Para a purificação das amostras foram utilizados 0,25µL da enzima *Exonuclease I* (Amershan Bioscience 2500U), 0,25µL da enzima *Shrimp Alkaline Phosphatase* (Amershan

Bioscience 5000U), 0,50µL de água ultra pura autoclavada, 6µL do produto de PCR. Incubados a 37°C durante 30 min. e após a 80°C durante 15 min. para inativação das enzimas.

Em um tubo de centrífuga com capacidade de 500µL, foram adicionados 1,5µL de água ultra pura; 1,5µL do *primer* (3,2 picomols) e 3µL do produto purificado.

As amostras foram sequenciadas em sequenciador automático ABI-PRISM 3130xl (*Applied Biosystems*, USA), utilizando a técnica de dideoxinucleotídeos marcados com fluorescência. Os resultados do sequenciamento foram representados pelo eletroferograma gerado.

A identificação dos microrganismos isolados deu-se pela comparação das sequências de DNA com as sequências depositadas no *GenBank*. As análises foram feitas utilizando a ferramenta *BLAST*.

#### **4.9 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE H<sub>2</sub>**

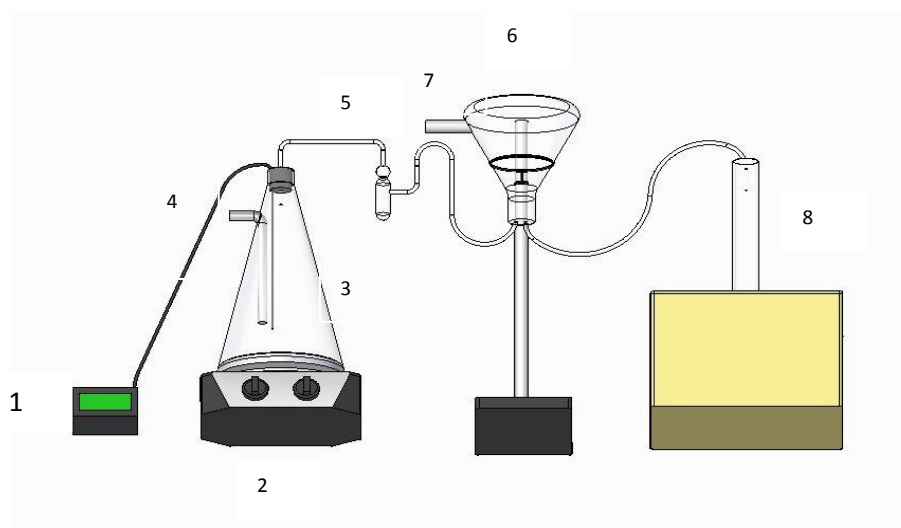
Culturas puras das bactérias isoladas e identificadas foram crescidas em tubos com capacidade de 2 mL foram crescidas, durante 10 h, em meio de cultivo LB. Com seringas, 0,1 mL do meio líquido foi transferido para frascos de vidro de (20 mL) contendo 10 mL de meio de cultivo líquido com glicerol (tendo a variação entre os meios MG1 e MG2 e o uso de glicerol ou glicerol residual), previamente esterilizado. Os frascos foram fechados com tampas de borracha e lacres de alumínio. A fim de garantir a anaerobiose, foi bombeado gás nitrogênio no *headspace*. Os frascos foram mantidos em agitador orbital a 140 rpm por 10 h a 37°C, sendo após transferidos para estufa de incubação por 24 h na mesma temperatura.

A avaliação da produção de H<sub>2</sub> foi realizado pela determinação da concentração de gás hidrogênio em cromatógrafo a gás (*DaniMaster – Automatic Sample AS*), com coluna Carboxen<sup>TM</sup> 1006 PLOT Capillary Column (*Supelco*), com detector de condutividade

térmica. O gás Nitrogênio ultrapuro foi utilizado como gás de arraste. A temperatura da coluna, do injetor e do detector foram 40°C, 100°C e 230°C, respectivamente. Foram retirados 100 µL das amostras do *headspace* e injetadas no cromatógrafo com a ajuda de seringa específica para cromatógrafo. O tempo de corrida foi de 10 min, a confirmação da produção de hidrogênio se deu com tempo de retenção de 1,6 minutos e gás carbônico 7,6 min, aproximadamente. Os testes cromatográficos foram realizados em triplicatas de frascos de cultivo.

#### 4.10 QUANTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE H<sub>2</sub>

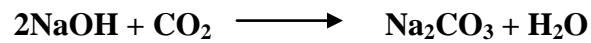
Para a quantificação do volume total de H<sub>2</sub> produzido foi adaptado, o teste de frasco invertido para pequenos volumes (Cappelletti, 2009; Lamaison, 2009; Lorencini, 2013); representado na Figura 5.



**Figura 5.** Figura do gasômetro invertido. 1- termostato com sonda de temperatura, 2- agitador magnético com barra magnética, 3- Frasco Kitassato com cultivo, 4- entrada para gás nitrogênio; 5 - frasco de segurança; 6- Frasco invertido com NaOH 5%; 7- saída coletora de amostra, 8- proveta graduada para coletar a soda.

O gás H<sub>2</sub> produzido no reator passa pelo frasco de segurança, que tem por objetivo proteger o reator de possíveis vazamentos. Após o gás é borbulhado no frasco invertido que

contém uma solução de NaOH 5%, fazendo com que o CO<sub>2</sub> que está presente no biogás reaja com o hidróxido de sódio, de acordo com a Equação 4.



(Equação 4)

À medida que o hidrogênio se acumula na parte superior do tubo invertido, o hidróxido de sódio vai se deslocando na proveta graduada. A medida do volume de hidrogênio está relacionada com a diferença do volume de soda no frasco coletor.

Para este experimento foi utilizado um frasco Kitassato de 1L, com volume de trabalho de 1L, de meio de cultivo. Os microrganismos foram crescidos *overnight* em agitador orbital a 37°C e 140 rpm, no mesmo meio de cultivo utilizados na posterior fermentação. O inóculo foi lavado em solução salina (0,9%), ressuspendido no mesmo meio de cultivo. O inóculo foi padronizado em 10 D.O para todos os ensaios, através da leitura da absorbância em 640 nm, em espectrofotômetro. A anaerobiose foi gerada pelo crescimento dos microrganismos no frasco fechado. A fermentação foi padronizada em 48 h sob temperatura de 37°C e agitação. Foram testados os microrganismos que obtiveram resultado positivo na cromatografia gasosa, além do controle positivo, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, e como controle negativo *Lysinibacillus sphaericus* e *Staphylococcus epidermidis*.

Para medir a eficiência do processo, foi retirada amostras do frasco invertido (estrutura 7, indicada na figura 5) e analisadas em cromatografia gasosa.

#### 4.10.1 Correção do volume de gás

O cálculo para a correção do volume de gás produzido foi realizado segundo Lamaison (2009) e está apresentado na Equação 5.



$$V = \frac{(P_{atm} - \rho \cdot H \cdot g) \cdot V_{exp} \cdot T}{P_{atm} \cdot T_{exp}}$$

(Equação 5)

Sendo:

V= volume de biogás seco na CNTP;

P<sub>atm</sub> = pressão atmosférica; $\rho$  = densidade de soda cáustica 5%;

H= é a diferença entre os níveis do frasco de Duran e o frasco coletor;

g = aceleração da gravidade (m/s<sup>2</sup>);V<sub>exp</sub>= volume de NaOH 5% deslocado (após 48h.)

T = Temperatura padrão CNTP (273K);

T<sub>exp</sub> = temperatura experimental (K).

#### 4.10.2 Cálculo da concentração de gás no biorreator

A equação dos gases ideais (Equação 6) foi utilizada para calcular a concentração de gás H<sub>2</sub>, formada no interior do biorreator.

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

(Equação 6)

Sendo:

P = pressão atmosférica;

V= volume (corrigido);

n = mols de gás;

R = constante universal dos gases perfeitos;

T = temperatura em Kelvin.

#### 4.10.3 Avaliação do glicerol consumido

A determinação de concentração de glicerol seguiu a metodologia descrita por Carra (2012), utilizada para quantificar sorbitol e neste trabalho foi adaptada para glicerol. O procedimento para execução do método consistiu em diluir convenientemente as amostras em água destilada, levando-se em consideração o tempo de cultivo. Em tubo de ensaio, contendo 0,1mL de amostra e 0,5mL de formato de potássio 0,7 mol/L foram adicionados 1mL de periodato de potássio 3,5 mM e, após 1 minuto, 0,75 mL do Reagente I descrito neste item. Um branco era preparado substituindo-se o volume da amostra diluída por água destilada. Os tubos foram, então, levados a um banho a 100 °C por 2 minutos, em seguida, resfriados em banho de gelo e 2,5 mL de água destilada eram adicionados às preparações. A absorbância das preparações foi medida em espectrofotômetro (PG Instruments, EUA), a 450nm. As

concentrações de glicerol presentes nas amostras foram determinadas através de curva de calibração construída com soluções de glicerol entre 100 e 1000mg/L, submetidas ao mesmo processo.

O reagente I foi preparado pela dissolução de 7g de acetato de amônio em 20mL de água destilada, adicionando-se à solução 0,160g de tiosulfato de sódio dissolvido em 10mL de água e 0,5mL de acetilacetona, sendo o volume da solução completado com água destilada a 50mL.

#### **4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

A análise estatística dos dados obtidos foi feita através do programa *GraphPad Prism 6*, empregando-se os testes de variância (ANOVA) e posterior aplicação do teste *Student's T-test* com  $p < 0,05$ . A linhagem comercial de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 foi utilizada como controle positivo e as linhagens de *Lisinibacillus sphaericus* e *Staphylococcus epidermidis* isoladas neste trabalho como controle negativo.

#### **4.12 ANÁLISE DOS GENES RELACIONADOS COM A PRODUÇÃO DE H<sub>2</sub> NAS BACTÉRIAS ISOLADAS**

As hidrogenases são um grupo de enzimas que controlam a produção de H<sub>2</sub>. Em análises de bioinformática, *BLAST* ferramenta disponível no site do NCBI ([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)), foram analisados as proteínas integrantes dos genes descritos na literatura como sendo participantes da produção de hidrogênio utilizando o glicerol.

Os genes analisados (HycC, HycE, HycF,) são integrantes da subunidade Hyd-3 que, segundo a literatura, participa do processo fermentativo. Além destes genes, foram analisados HyfC, HyfF, HyfH, pertencentes à subunidade Hyd-4, que parecem não ter relação com a

produção de hidrogênio utilizando glicerol (Vignais *et al.*, 2001). Procurou-se confirmar a presença destes genes nos microrganismos isolados neste trabalho (*BLAST intra*), a fim de que se pudesse estabelecer uma relação entre microrganismos promissores na produção de hidrogênio e a presença destes genes específicos.

Além disso, com a finalidade de verificar as regiões de similaridade dos genes pesquisados, entre as 617 bactérias com o genoma completamente sequenciado até a data (04 out. 2014), foi realizado *BLAST (All)*. Através desta ferramenta foi possível avaliar viáveis relações evolutivas e funcionais entre genes. Portanto, estabeleceu-se uma relação de microrganismos com homologia entre os genes, podendo indicar novos microrganismos produtores de hidrogênio.

O *BLAST* foi rodado localmente em ambiente Linux.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO SUBSTRATO

O glicerol residual da indústria de biodiesel, utilizado neste trabalho, foi analisado quanto às características químicas para avaliar sua potencial aplicação na fermentação. Os resultados obtidos foram comparados com o glicerol vendido industrialmente (Tabela 9).

**Tabela 9.** Análise físico-química do glicerol e do glicerol residual, metodologia segundo *Standard Methods For Examination of Water and Wastewater* (2012).

Ensaio	Resultado (mg/L)	
	Glicerol	Glicerol residual
Cálcio total	0,645	112,55
Demanda química de oxigênio	1.679.063	1.059.398
Ferro total	0,16	0,868
Magnésio Total	0,460	2,946
Nitrogênio amoniacal	Não detectado	66,41 ± 1,29
Potássio	5,56	7,12
Sódio	Não detectado	24854,2
Grau de pureza (%)	95	70
pH	6,6	5,4

O glicerol residual apresenta 112,55 mg de cálcio por litro enquanto que o glicerol comercial apresenta 0,645 mg/L. Essa diferença mostra que o glicerol residual apresenta 174,50 vezes mais cálcio que no produto purificado. Esses resultados também foram observados para os outros parâmetros analisados, como ferro total (5,42 vezes maior que o glicerol comercial), magnésio total (6,40 vezes), potássio total (1,28 vezes) e sódio (24.854,2 vezes). O nitrogênio amoniacal foi quantificado em 66,41 mg por litro no glicerol residual e o mesmo não foi detectado no glicerol comercial. Contudo, a demanda química de oxigênio foi superior no glicerol comercial (1.679.063 mg/L) em relação ao residual (1.059.398 mg /L),

comprovando uma menor quantidade de matéria orgânica disponível na amostra residual, uma vez que, parte dos sólidos suspensos não são assimilados (Tabela 9).

Essas diferenças de composição e de concentração influenciam diretamente nos processos fermentativos, já que os elementos destacados na Tabela 9 referem-se a macro e micronutrientes necessários ao crescimento e metabolismo celular microbiano. O nitrogênio é o segundo macronutriente mais importante no crescimento microbiano, perdendo apenas para o carbono (Lin & Lay, 2005; Alshiyab *et al.*, 2008). Trata-se de um elemento essencial para a síntese de proteínas, aminoácidos e outros compostos celulares (Lin & Lay, 2005; Alshiyab *et al.*, 2008). Para a estabilidade do ribossomo e síntese de muitas enzimas, o magnésio se torna indispensável (Lin & Lay, 2005; Alshiyab *et al.*, 2008). O cálcio auxilia na estabilização das paredes celulares e na termoestabilidade de endosporos (Lin & Lay, 2005; Alshiyab *et al.*, 2008). O sódio é requerido pelos microrganismos em quantidades diferentes, já que atua na regulação osmótica celular. Em concentrações elevadas, o elemento pode tornar-se inibitório do crescimento celular (Lin & Lay, 2005; Alshiyab *et al.*, 2008). Finalmente, o elemento ferro possui influência no crescimento celular, participando da síntese de várias proteínas, transporte de elétrons e constituição de citocromos, além do funcionamento das hidrogenases (Lin & Lay, 2005; Alshiyab *et al.*, 2008).

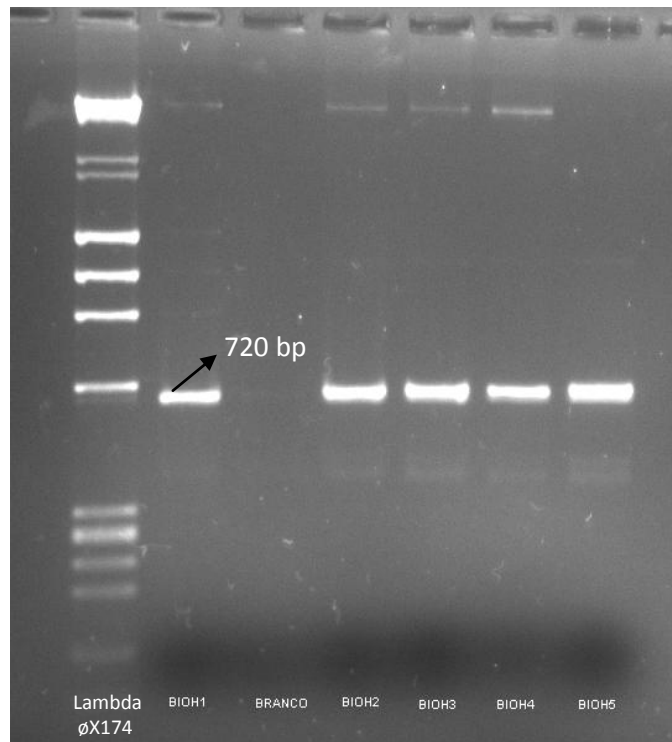
Por se tratar de uma mistura, o glicerol pode servir de fonte de carbono, mas isto não implica necessariamente em ser bom substrato para o crescimento microbiano, uma vez que dentre as impurezas, podem haver, inclusive, substâncias inibitórias ao crescimento, tais como: sabões, metanol, cristais de hidróxido de sódio usado como catalisador (Sarma *et al.*, 2012; Alvarado - Cuevas *et al.*, 2013). Estas impurezas dependem da natureza do óleo vegetal ou da gordura animal utilizada na transesterificação, além do tipo de catálise empregada na fabricação do biodiesel (Beatriz *et al.*, 2010; Lopes *et al.*, 2011). Tais características podem influenciar no nível do impacto ambiental produzido pelo resíduo.

Em contrapartida, o glicerol comercial passou por reações de purificação o que provavelmente diminuiu seus elementos nutricionais e também os elementos inibitórios, mas eleva consideradamente seu custo comercial. Enquanto uma tonelada do glicerol residual está estimada em R\$ 105,00, o glicerol purificado encontra-se a partir de R\$ 2.100,00 (Beatriz *et al.*, 2010; Lopes *et al.*, 2011; Quispe *et al.*, 2013). Daí a importância de selecionar microrganismos capazes de converter o substrato residual em produtos, agregando valor ao processo. Por outro lado, a mistura pode servir de subsídio natural para o crescimento e a manutenção celular em um processo de interesse biotecnológico.

## **5.2 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS MICRORGANISMOS CRESCIDOS EM GLICEROL**

Em lodos e efluentes é comum encontrar microrganismos melhor adaptados a condições de sobrevivência extremas, como por exemplo, faixas extremas de pH, altas taxas de despejo de matéria orgânica e temperatura. Esses microrganismos possuem a capacidade de conversão da matéria orgânica em produtos de interesse industrial. A partir desta característica, optou-se pela procura de microrganismos naturalmente adaptados e com capacidade de produção de H<sub>2</sub>. A partir de diferentes amostras de lodos de ETE, foram isoladas 28 colônias bacterianas morfológicamente distintas (Tabela 10), capazes de crescer em meio de cultivo contendo glicerol como única fonte de carbono. Esses isolados foram denominadas BioH<sub>1</sub> à BioH<sub>28</sub>. As linhagens BioH<sub>1</sub>, BioH<sub>2</sub>, BioH<sub>11</sub> e BioH<sub>12</sub> foram isoladas do lodo da estação de tratamento de refinaria de petróleo; BioH<sub>3</sub> à BioH<sub>6</sub> de lodo agroindustrial; BioH<sub>7</sub> à BioH<sub>10</sub> de amostra de compostagem e BioH<sub>13</sub> à BioH<sub>28</sub> de lodo de suinocultura.

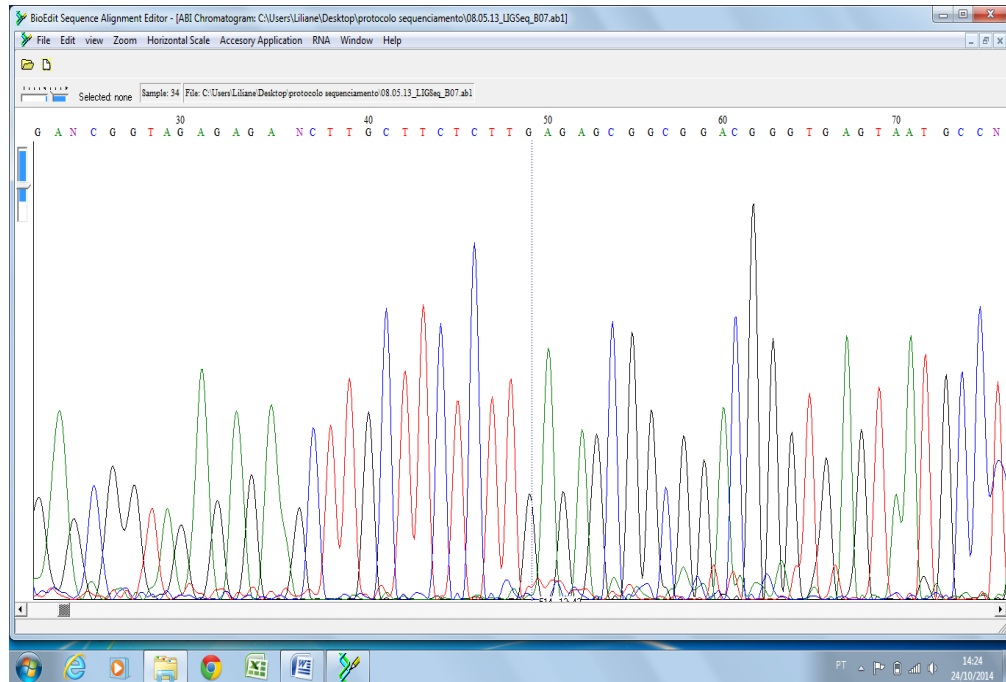
Os microrganismos foram identificados pela metodologia de sequenciamento da do gene 16S rRNA. Com a confirmação da amplificação em 720 pb (Figura 6).



**Figura 6.** Gel de agarose, representativo da amplificação (720 pb) do gene 16SrRNA.

Os produtos de PCR passaram por purificação e sequenciamento de DNA, com a geração de um eletroferograma (Figura 7). Foi realizado o sequenciamento de 500 pb de DNA.

Para identificação dos microrganismos, consideraram-se apenas resultados de sequenciamento que apresentaram boa qualidade, como demonstrado no Figura 7. Após, a sequência de DNA representada no eletroferograma foi comparada com sequências depositadas no NCBI para identificação das amostras isoladas.



**Figura 7.** Modelo de eletroferograma gerado após sequenciamento de DNA.

O alinhamento genético, baseado no sequenciamento do gene 16S rRNA, demonstrou uma ampla diversidade de microrganismos presentes nas amostras de lodo de ETE capazes de crescer em meio com glicerol como única fonte de carbono (Tabela 10). Dentre os 28 isolados, dois microrganismos foram identificados como *Enterobacter ludwigii*, sete *Bacillus amyloliquefaciens*, dois *Shigella sonnei*, um *Bacillus licheniformis*, um *Shigella flexneri*, um *Staphylococcus warneri*, um *Acinetobacter gyllenbergi*, quatro *Lysinibacillus sphaericus*, dois *Staphylococcus epidermidis*, um *Alcaligenes faecalis*, dois *Bacillus subtilis*, um *Paenibacillus azoreducens*, um *Paenibacillus cookii*, um *Bacillus atropheus* e um *Citrobacter freundii*. Devido ao tratamento térmico em que as amostras foram submetidas, 60% dos microrganismos isolados são esporulados.



**Tabela 10.** Microrganismos identificados de amostras de lodos de estações de tratamento de efluentes de setores petrolífera e agroindustrial, por meio de comparação de sequências genéticas depositadas no *Gen Bank* (NCBI).

Isolado	*Pré -Tratamento	Amostra	Resultado	Similaridade	Acesso
B IOH <sub>1</sub>	S/T	Refinaria de petróleo	<i>Enterobacter ludwigii</i>	98%	NR 042349.1
BIOH <sub>2</sub>	T <sub>1</sub>	Refinaria de petróleo	<i>Enterobacter ludwigii</i>	99%	NR 042349.1
BIOH <sub>3</sub>	S/T	Agroindustrial	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	98%	NR 075005.1
BIOH <sub>4</sub>	T <sub>1</sub>	Agroindustrial	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	98%	NR 075005.1
BIOH <sub>5</sub>	T <sub>1</sub>	Agroindustrial	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	98%	NR 075005.1
BIOH <sub>6</sub>	T <sub>2</sub>	Agroindustrial	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	98%	NR 075005.1
BIOH <sub>7</sub>	S/T	Compostagem	<i>Shigella sonnei</i>	99%	NR 074894.1
BIOH <sub>8</sub>	T <sub>2</sub>	Compostagem	<i>Bacillus licheniformis</i>	99%	NR 07923.1
BIOH <sub>9</sub>	T <sub>4</sub>	Compostagem	<i>Shigella flexneri</i>	98%	NR 026331.1
BIOH <sub>10</sub>	T <sub>5</sub>	Compostagem	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99%	NR 075005.1
BIOH <sub>11</sub>	T <sub>3</sub>	Refinaria de petróleo	<i>Shigella sonnei</i>	98%	NR 074894.1
BIOH <sub>12</sub>	T <sub>2</sub>	Refinaria de petróleo	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99%	NR 075005.1
BIOH <sub>13</sub>	T <sub>5</sub>	Suinocultura	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99%	NR 075005.1
BIOH <sub>14</sub>	T <sub>1</sub>	Suinocultura	<i>Staphylococcus warneri</i>	99%	NR 102499.1
BIOH <sub>15</sub>	T <sub>3</sub>	Suinocultura	<i>Acinetobacter gyllenbergii</i>	97%	NR 042026.1
BIOH <sub>16</sub>	T <sub>4</sub>	Suinocultura	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	98%	NR 042073.1
BIOH <sub>17</sub>	T <sub>4</sub>	Suinocultura	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	97%	NR 074995.1
BIOH <sub>18</sub>	T <sub>1</sub>	Suinocultura	<i>Alcaligenes faecalis</i>	97%	NR 04344.1
BIOH <sub>19</sub>	T <sub>5</sub>	Suinocultura	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	98%	NR 074995.1
BIOH <sub>20</sub>	T <sub>5</sub>	Suinocultura	<i>Bacillus subtilis</i>	99%	NR 027552.1
BIOH <sub>21</sub>	T <sub>1</sub>	Suinocultura	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	97%	NR 042073.1
BIOH <sub>22</sub>	T <sub>4</sub>	Suinocultura	<i>Paenibacillus azoreducens</i>	99%	NR 025391.1
BIOH <sub>23</sub>	T <sub>3</sub>	Suinocultura	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	97%	NR 042073.1
BIOH <sub>24</sub>	T <sub>1</sub>	Suinocultura	<i>Paenibacillus cookii</i>	97%	NR 025372.1
BIOH <sub>25</sub>	T <sub>5</sub>	Suinocultura	<i>Bacillus atropheus</i>	99%	NR 075016.1
BIOH <sub>26</sub>	T <sub>3</sub>	Suinocultura	<i>Bacillus subtilis</i>	100%	NR 027552.1
BIOH <sub>27</sub>	T <sub>4</sub>	Suinocultura	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	97%	NR 042073.1
BIOH <sub>28</sub>	S/T	Suinocultura	<i>Citrobacter freundii</i>	99%	NR 028894.1

\*Pré-tratamento térmico à 100°C . T<sub>1</sub>- 15minutos; T<sub>2</sub>- 30minutos; T<sub>3</sub>-45minutos; T<sub>4</sub>- 60 minutos ; T<sub>5</sub>- 75 minutos e S/T sem tratamento térmico.

Segundo Yasin *et al.* (2013), o choque térmico é necessário para a germinação de bactérias produtoras de H<sub>2</sub> e eliminação das bactérias consumidoras de H<sub>2</sub>. Embora neste tratamento tenham sido eliminadas as linhagens bacterianas com capacidade de produção de H<sub>2</sub> e não formadoras de esporos. Entretanto, as espécies descritas na literatura como alto potencial hidrogeniônico estão entre as formadoras de esporos, como por exemplo, *Bacillus* e *Clostridium* (Lazaro *et al.*, 2014).

Nos isolamentos feitos sem e com tratamentos de exposição ao calor por 15 minutos, foram isolados microrganismos não formadores de esporos como as bactérias da família Enterobacteriaceae. *Bacillus* conhecidos como formadores de esporos foram isolados em todos diferentes tempos de tratamento. Não há um consenso entre autores sobre temperatura e tempo adequados para o pré-tratamento, sendo que estes podem variar de 80°C a 140°C e de 15 min a três horas (Maitinguer *et al.*, 2008). Pendyala *et al.* (2012) também observaram a presença de bactérias (*Lactobacillus*, *Enterobacter* e *Bacteroides*) não formadoras de esporos, após o tratamento térmico. A presença de *Lactobacillus* e *Bacteroides* torna-se um problema, pois se tratam de bactérias consumidoras de H<sub>2</sub> e competidoras por substrato, por isso, não desejada no experimento. Goud *et al.* (2014), após o tratamento térmico (100°C por 1h), evidenciaram a presença de *Enterobacter cloacae*, não formadora de esporo, e do gênero *Clostridium*. Zhang *et al.* (2011) demonstram que os pré tratamentos, como por exemplo, o pré tratamento à quente aumenta consideravelmente a produção de H<sub>2</sub>, e que após este tipo de tratamento há a permanência de Enterobactérias e de *Clostridium*. Por outro lado, tratando o inóculo em autoclave a 105°C durante 20 min, Hasyim *et al.* (2011) detectaram a presença de microrganismos termófilos como *Clostridium thermohydrosulfuricum* e hipertermófilos como *Thermoanaerobacter*. Portanto, o tratamento a quente do inóculo é uma etapa importante e eficaz para o aumento da produção de biogás, através da eliminação de bactérias consumidoras de H<sub>2</sub>.

Entre os microrganismos identificados não houve o isolamento de anaeróbios estritos, como os do gênero *Clostridium*, descritos na literatura como melhores produtores de H<sub>2</sub>. Contudo, a utilização de microrganismos anaeróbios facultativos na produção de H<sub>2</sub> se torna vantajosa por estes serem menos sensíveis a presença de oxigênio. Além disso, os microrganismos hidrogenotróficos (consumidores de H<sub>2</sub>) são anaeróbios estritos e a presença

de oxigênio impede a sua proliferação e o conseqüentemente consumo do produto gerado (Wang & Wan, 2009).

Das amostras analisadas, a que mostrou maior quantidade de microrganismos foi a de suinocultura, seguida da amostra de compostagem (Tabela 10). O resultado está relacionado à alta carga orgânica (urina, fezes, matéria usada em camas, águas de limpeza e restos de células e pelos), tornando o lodo uma importante fonte de nutrientes e, principalmente, ao fato de apresentarem microrganismos que compõem o trato digestivo destes animais e que são liberados juntamente com as fezes. Portanto, o ambiente com o maior aporte de carga orgânica deve selecionar a comunidade microbiana com grande número de espécies. Se levamos em consideração lodos e efluentes industriais, a quantidade de matéria orgânica se torna menor e a alta quantidade de efluentes químicos pode causar a inibição de uma série de microrganismos.

Das 28 amostras que inicialmente pareciam apresentar diferenças morfológicas, foram identificadas 15 espécies diferentes de microrganismos. A maioria destes microrganismos possui poucos relatos de literatura, capazes de descrever suficientemente suas características bioquímicas e morfológicas.

O gênero *Bacillus* foi o que mostrou prevalência, sendo referente a 40% no total das amostras analisadas. Estes pertencem à família Bacillaceae, um grupo bastante heterogêneo. Apresentam diversidade fisiológica podendo viver em ambientes ácidos ou básicos, com temperatura ideal de crescimento a 30°C, seus esporos possuem capacidade de sobreviver em altas temperaturas (Bala-Amutha & Murugesan, 2013) e condições adversas (Kumar *et al.*, 2013). Eles podem ser aeróbios, anaeróbios facultativos ou estritamente anaeróbios (Schleifer, 2009; Barros *et al.*, 2011; Gomes, 2013). Quanto ao habitat, são geralmente saprófitos, vivendo especialmente em solos e não patogênicos. Ao microscópio aparecem como forma de bastonete, Gram-positivos, geralmente móveis e esporulados. Várias espécies

de *Bacillus* utilizam glicose ou outro carboidrato como fonte de carbono, em fermentação, para a obtenção de energia. A capacidade de produzir ácidos a partir de substratos orgânicos e padrões de assimilação destes substratos são de grande valor na caracterização e identificação das diferentes espécies de *Bacillus* (Barros *et al.*, 2011). Algumas espécies como *B.licheniformis* e *B. subtilis* são encapsulados (Gomes, 2013). Ainda, segundo o autor, *B. licheniformis* ao crescer em meio sólido, formam colônias com aspecto de líquen (secas e aderentes a superfície do ágar). *B. subtilis* formam colônias irregulares de aspecto mucóide. Já a espécie *Bacillus amyloliquefaciens* é produtor da enzima de restrição Bam H1, de alguns antibióticos, de alfa-amilase e hidrogênio. Há relatos de literatura que utilizam o extrato desta bactéria como conservante de alimentos, uma vez que o extrato produz uma substância capaz de inibir *Listeria monocytogenes*. *B. atropheus* é Gram – positivo, aeróbio, formador de endoesporo, sua descrição é praticamente igual à de *B. subtilis*, exceto pelo fato de produzirem pigmento em meio contendo azoto orgânico (Burke *et al.*, 2004). Este gênero de microrganismos é considerado seguro para se trabalhar com processos biotecnológicos (Kumar *et al.*, 2013).

O gênero *Enterobacter* pertence à família das Enterobactérias. São Gram- negativas, anaeróbias facultativas e quimiorganotróficas, tendo metabolismo respiratório e fermentativo, podem catabolizar um amplo espectro de carboidratos com formação de ácidos e em algumas espécies há formação de gases. Possuem distribuição cosmopolita, habitando solos, água, vegetais e principalmente o trato digestivo dos animais. A espécie *Enterobacter ludwugii* pertencem ao *cluster* da *Enterobacter cloacae*, embora em análises filogenéticas estas bactérias formem um grupo genético distinto (Hoffman *et al.*, 2005). Este gênero é descrito na literatura como produtor de hidrogênio e pode viver em associação com plantas promovendo a degradação de hidrocarbonetos. No âmbito clínico, raramente são descritas como patogênicas, embora possam ser patógenos ocasionais do trato urinário (Grimont & Grimont, 2006; Barros

*et al.*, 2011). Ainda, pertencente à mesma família *C. freundii*, um microrganismo Gram-negativo, móvel, mesófilo, anaeróbio facultativo (Beckers *et al.*, 2010; Hamilton *et al.*, 2010).

Bactérias do gênero *Shigella* sp., apresentam-se como bacilos Gram-negativos, anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, imóveis e que pertencem à família Enterobacteriaceae. São classificadas segundo testes de aglutinação. Shigelas são capazes de sobreviver por grandes períodos em condições adversas, com o pH e temperaturas elevadas (Tetteh & Beuchat, 2003). Este gênero é conhecido por causar a shigelose ou diarreia sanguinolenta, e portanto, o isolado deve ser avaliado quanto a patogenicidade, uma vez que dentro do mesmo gênero podemos ter microrganismos que não causem doenças e toda via de interesse biotecnológico.

*Paenibacillus cookii* são anaeróbios facultativos, formadores de endoesporos, Gram-positivos, com temperatura de crescimento mínima em 15°C e máxima em 50°C (Logan *et al.*, 2004). Pertencem à ordem Bacillales e família Paenibacillaceae, estão geralmente presentes em solos, não sendo considerados patógenos humanos. Enquanto a espécie *P. azoreducens* são microrganismos capazes de decompor elementos químicos do grupo “azo”, como por exemplo, azobenzeno. São anaeróbios facultativos, formadores de endoesporos, Gram variáveis (Meehan *et al.*, 2001).

*L. sphaericus* são naturalmente encontrado em solos, são bacilos Gram-positivos, mesófilos, anaeróbios facultativos e seus esporos são resistentes ao calor, substâncias químicas e radiação ultravioleta (Berry, 2012).

*S. epidermidis* são cocos Gram-positivos, catalase positiva, anaeróbios facultativos, pertencente a família Staphylococcaceae, fazem parte dos microrganismos presentes na pele humana. Geralmente, este microrganismo não é patogênico, com exceção de pessoas imunodeprimidas ou que estão fazendo uso de cateteres, por serem formadores de biofilmes. Ainda, estudos mostram que estes microrganismos possuem capacidade de reduzir nitratos

(O’Gara & Humphreys, 2001). *S. warneri* são cocos, Gram-positivos, anaeróbios facultativos e não formadores de endósporos (Wesley *et al.*, 1975).

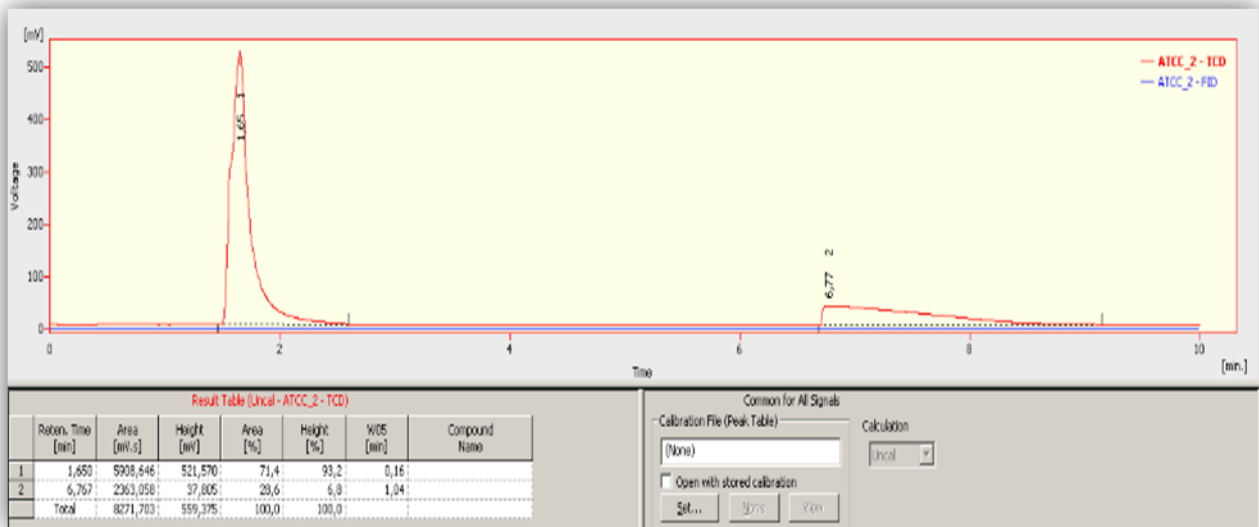
*A. gyllenbergii* são bacilos Gram-negativos, aeróbios obrigatórios, oxidase negativa, catalase positiva, não móveis e pertencentes à família Moraxellaceae. São importantes microrganismos de solo e fonte de infecção em pacientes debilitados ou hospitalizados (Nemec *et al.*, 2009).

*A. faecalis* é Gram-negativa e aeróbia, considerada uma bactéria não patogênica, podendo causar infecções oportunistas, como por exemplo, a de urina. É encontrada naturalmente em solo, água e em associações com seres humanos. Pertence à família Alcaligenaceae.

### 5.3 PRODUÇÃO DE H<sub>2</sub>

A avaliação da produção de H<sub>2</sub> foi realizada por microrganismo, sendo que amostras com a mesma identificação não foram repetidas. Foram analisados quanto à produção de hidrogênio os isolados: *E. ludwigii*, *Shigella sonnei*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *S. warneri*, *A. faecalis*, *B. subtilis*, *B. atrhopheus*, *C. freundii*, *S. flexneri*, *Acinetobacter gyllenbergii*, *L. sphaericus*, *S. epidermidis*, *P. azoreducens* e *P. cookii*.

A linhagem *E. aerogenes* ATCC 13048 descrito na literatura como produtora de H<sub>2</sub> (Neves, 2009; Reungsang *et al.*, 2013), foi utilizada como controle positivo (Figura 8) e seu cromatograma para a produção de H<sub>2</sub> foi utilizado como comparativo. As análises cromatográficas de todos os microrganismos isolados estão no Anexo A.



**Figura 8.** Análise cromatográfica da produção de hidrogênio por *E. aerogenes*. Fermentação de 48h, 37°C, pH 6,8 e meio de cultivo MG1.

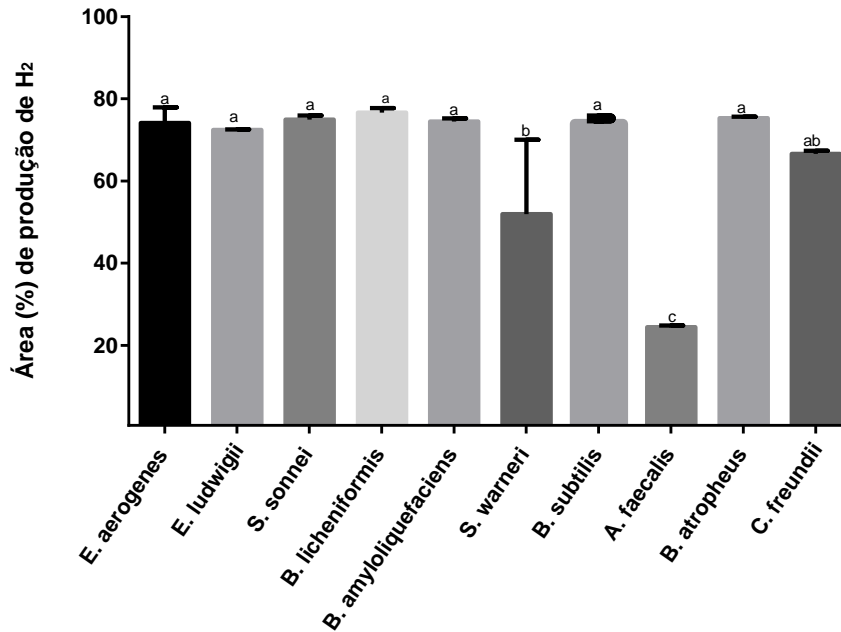
Após as análises cromatográficas, foi possível selecionar os microrganismos produtores de H<sub>2</sub> e os não produtores (Tabela 11).

**Tabela 11.** Lista dos microrganismos isolados que possuem capacidade de produção de H<sub>2</sub> e microrganismos que não possuem esta capacidade, análise por cromatografia gasosa.

Produtores de hidrogênio	Não produtores de hidrogênio
<i>E. ludwigii</i>	<i>S. flexneri</i>
<i>S. sonnei</i>	<i>A. gyllenbergii</i>
<i>B. licheniformis</i>	<i>L. sphaericus</i>
<i>B. amyloliquefaciens</i>	<i>S. epidermidis</i>
<i>S. warneri</i>	<i>P. azoreducense</i>
<i>A. faecalis</i>	<i>P. cookii</i>
<i>B. subtilis</i>	
<i>B. atrropheus</i>	
<i>C. freundii</i>	

É importante destacar que alguns microrganismos, mesmo aeróbios, foram capazes de produzir H<sub>2</sub>, como o caso dos gêneros *Bacillus* e *Alcaligenes*, confirmando os resultados obtidos por Rossi (2011).

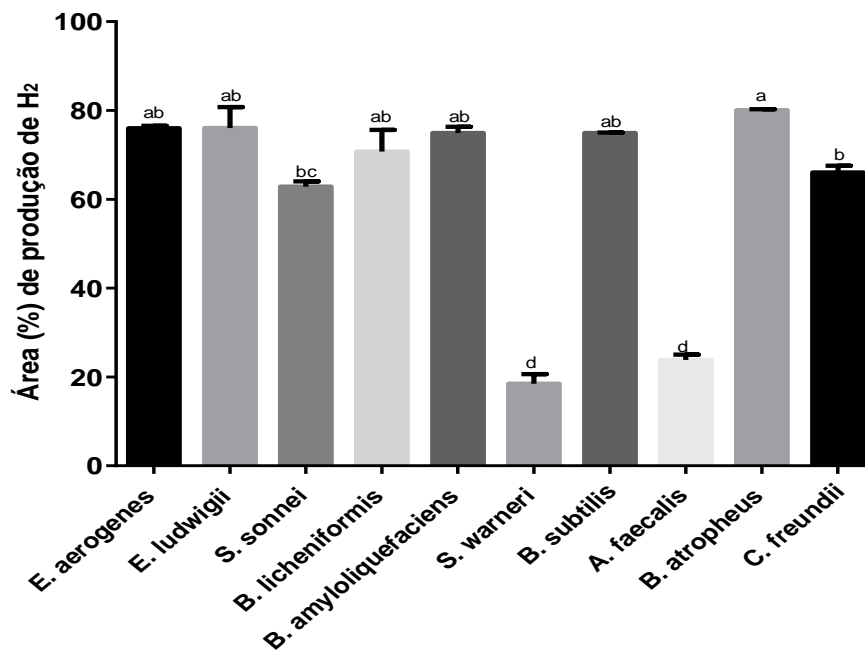
A relação de hidrogênio produzido (% área), em relação aos outros gases está representada na Figura 9.



**Figura 9.** Área (%) de hidrogênio em relação a outros gases produzidos pelos microrganismos isolados em meio de cultivo, MG1 com glicerol. Área obtida por cromatografia gasosa. Medidas de triplicata e estimativa de desvio padrão. Valores expressos em área (%). Valores assinalados com a mesma letra não diferem significativamente ( $p < 0,05$ ), análise estatística com teste ANOVA e posterior *Student's T-test*.

Os gêneros *Shigella* e *Bacillus* obtiveram uma produção com maior pureza de gás H<sub>2</sub> quando crescidas em meio MG1 tendo glicerol comercial como única fonte de carbono. Porém, com a utilização de glicerol residual como fonte de carbono, estes resultados são diferentes. Os melhores resultados encontrados referente à pureza dos gases produzidos em relação ao H<sub>2</sub> foram os dos gêneros *Enterobacter* e *Bacillus*, Figura 10.





**Figura 10.** Área (%) de hidrogênio em relação a outros gases produzido pelos microrganismos isolados em meio de, contendo MG1 com glicerol residual. Área obtida por cromatografia gasosa. Área obtida por cromatografia gasosa. Medidas de triplicata e estimativa de desvio padrão. Valores assinalados com a mesma letra não diferem significativamente ( $p < 0,05$ ), análise estatística com teste ANOVA e posterior *Student's T-test*.

Microrganismos do gênero *Shigella* não são comumente usados como cultura puras, em fermentações devido ao seu grau de patogenicidade descritas para algumas linhagens deste gênero. Estudos citam a presença deste microrganismo, somente quando identificados como componentes de uma cultura mista. Varrone *et al.* (2013) descrevem uma cultura mista composta por *Escherichia*, *Klebsiella*, *Shigella* e *Cupriavidus* sendo capaz de produzir 2960mL H<sub>2</sub>/L/dia, quando utilizado o glicerol como substrato fermentativo.

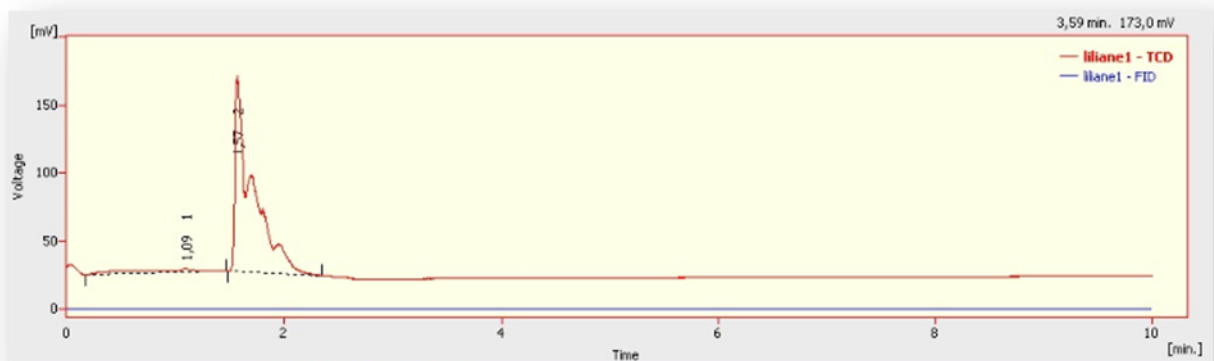
## 5.4 QUANTIFICAÇÕES DA PRODUÇÃO DE H<sub>2</sub>

### 5.4.1 Produção de H<sub>2</sub> em meio de cultivo MG1

A quantificação da produção de H<sub>2</sub> foi realizada em fermentador de bancada adaptada a gasômetro invertido. Para certificar-se da eficiência do processo, utilizaram-se os microrganismos que obtiveram resultado positivo para a produção de H<sub>2</sub>, sendo utilizado *E.*

*aerogenes* ATCC 13048, como controle positivo, *S. epidermidis* e *L. sphaericus*, como controle negativo.

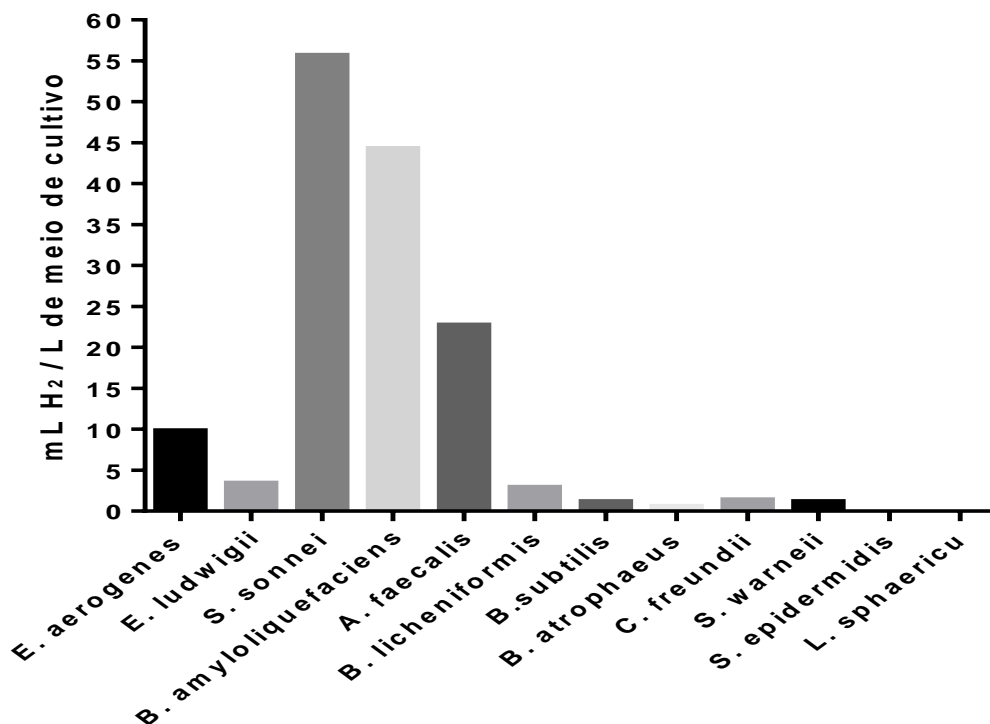
Durante a análise por cromatografia gasosa, pode-se observar apenas pico de gás  $H_2$  no cromatograma gerado. O dióxido de carbono produzido durante a fermentação ficou retido na base (NaOH 5%), portanto o volume deslocado da base equilibra a produção de  $H_2$  em mL/L de meio de cultivo, durante 48 h de fermentação (Figura 11).



**Figura 11.** Análise de cromatografia gasosa da fermentação em frasco invertido utilizando *E. aerogenes*. Amostra de gás retirada da saída coletora do frasco invertido, em 48 horas de fermentação, pH 6,8, temperatura 37°C e meio de cultivo MG2.

O pico referente ao  $H_2$  não se mostra uniforme, devido à grande concentração do gás ou até mesmo podemos levar em consideração a contaminação por outros gases no momento da coleta, como por exemplo, o oxigênio (tempo de retenção 1,9 min. aproximadamente). O gás oxigênio pode não ter sido retirado adequadamente da mangueira da saída coletora ou do frasco de amostra durante a coleta, já que a amostra era retirada da saída coletora e transferida para outro frasco até chegar ao cromatógrafo. Esta contaminação não aparece na Figura 11, pois neste caso todo o biorreator, lacrado, foi levado para a análise cromatográfica, evitando possíveis contaminações.

A quantificação da produção de  $H_2$  utilizando o glicerol e meio de cultivo MG1, está representada na Figura 12.



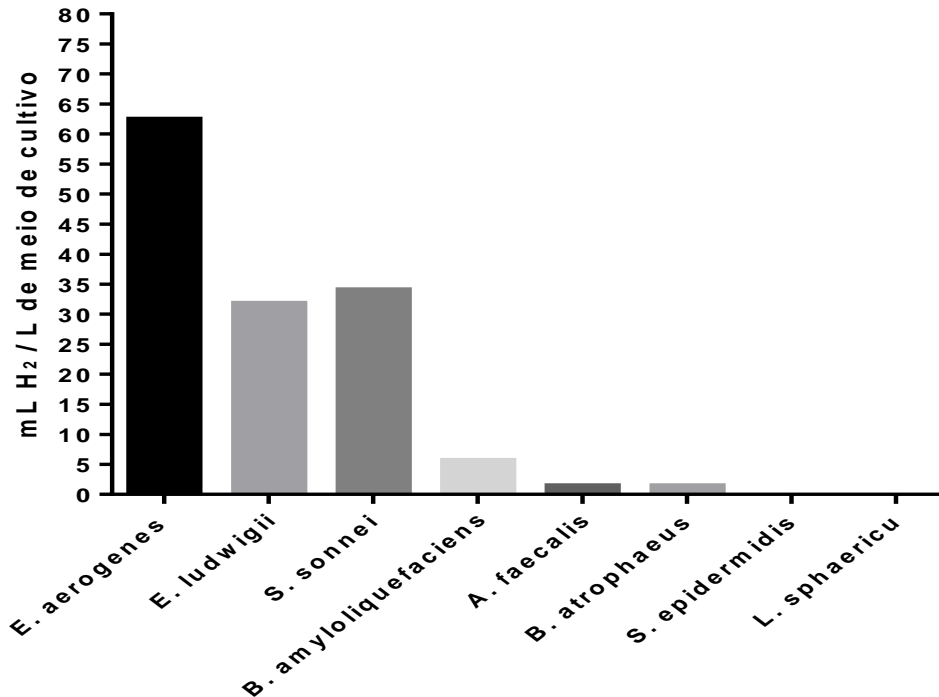
**Figura 12.** Produção de H<sub>2</sub> em frasco invertido com 1L de meio de cultivo MG1 contendo glicerol como única fonte de carbono, em 48h de cultivo, pH 6,8 e temperatura 37<sup>0</sup>C. Testes com apenas uma repetição.

Os resultados indicam o gênero *Shigella* e o *Bacillus* os mais promissores produtores de H<sub>2</sub>.

Para os ensaios utilizando o glicerol residual, para delineamento experimental, optou-se por utilizar o controle positivo *E. aerogenes*, *E. ludwigii*, com resultado intermediário; *S. sonnei*, *B. amyloliquefaciens*, *A. faecalis*, com os resultados mais promissores, *B. atropheus*, com resultado muito inferior e os dois controles negativos (Figura 13).

A quantificação do H<sub>2</sub> gerado difere entre o substrato comercial e o residual, uma vez que as maiores quantidades de H<sub>2</sub> produzidos referem-se aos gêneros *Shigella* e *Enterobacter*, utilizando o substrato residual e aos gêneros *Shigella* e *Bacillus* utilizando o substrato comercial, como mostrado nas Figuras 12 e 13. Esta diferença deve-se aos nutrientes que se encontram em quantidade e disponibilidades distintas em ambos os produtos, como

descrito no item 5.1, exigindo diferentes adaptações e utilização de diferentes rotas metabólicas pelos microrganismos, aumentando ou diminuindo a produção final de H<sub>2</sub>.



**Figura 13.** Produção de H<sub>2</sub> em frasco invertido com 1L de meio de cultivo MG1 contendo glicerol residual como única fonte de carbono, em 48h de cultivo, pH 6,8 e temperatura 37<sup>0</sup>C. Testes com apenas uma repetição.

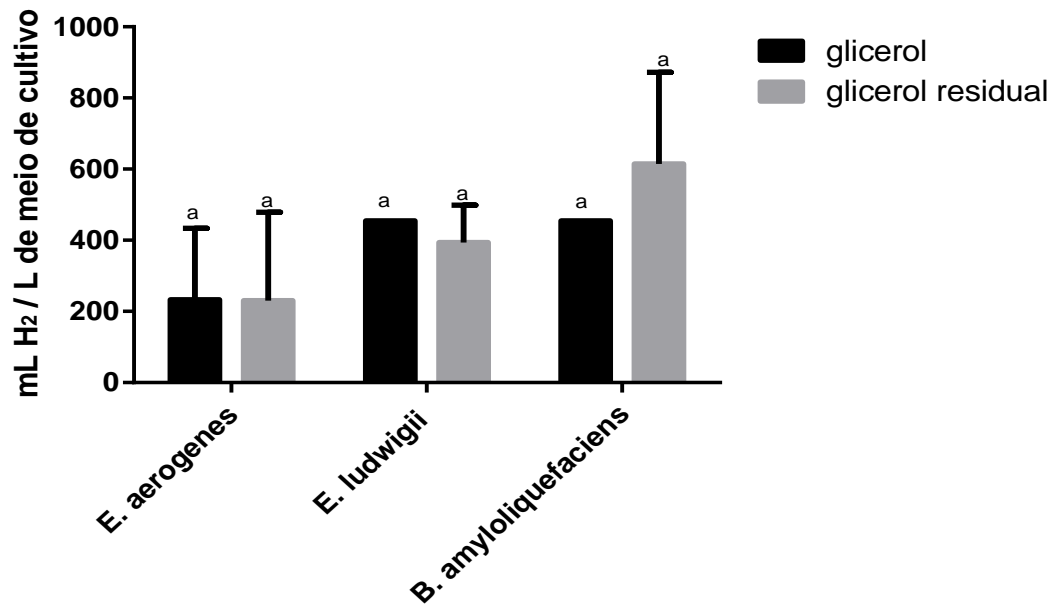
Sarma *et al.* (2014) relatam o efeito inibitório que os sabões, presentes no glicerol bruto, podem causar sobre o metabolismo microbiano. A retirada total destes sabões também pode surtir um efeito inibitório devido à diminuição das taxas de carbono e nitrogênio disponíveis, portanto necessita-se uma forma de neutralizá-los e aproveitar o glicerol residual. Em outro trabalho, Lovato (2014) verificou que o uso do glicerol residual, se comparado ao comercial, diminui consideravelmente a quantidade e a qualidade do biogás obtido, pela formação de ácido propiônico. A autora destaca ainda a importância da utilização do glicerol comercial como forma de eliminar a interferência que pode ser gerada por possíveis resíduos presentes no coproduto bruto, inclusive contaminação. Contrariando estes resultados, Ito *et al.*

(2005) demonstraram que as maiores taxas de produção de H<sub>2</sub> foram obtidas em meio contendo pequena quantidade de glicerol residual.

#### 5.4.2 Produção de H<sub>2</sub> em meio de cultivo MG2

Devido à baixa produção de H<sub>2</sub> dos microrganismos *E. ludwigii*, *S. sonnei*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *S. warneri*, *A. faecalis*, *B. subtilis*, *B. atrhopheus* e *C. freundii*, obtida utilizando o meio de cultivo MG1, repetiram-se os experimentos utilizando o meio de cultivo MG2. Trata-se de um meio rico em nutrientes com o nitrogênio necessário para que o microrganismo cresça e mantenha uma produção estável de H<sub>2</sub>. Ácido nicotínico, vitamina envolvida no crescimento e precursora do NAD<sup>+</sup> (transferência de elétrons nas reações de oxi-redução). Níquel, micronutriente necessário ao funcionamento das hidrogenases. Para estes testes utilizaram-se os dois microrganismos com melhores resultados nos experimentos anteriores *E. ludwigii* e *B. amyloliquefaciens*, como controle positivo utilizou-se *E. aerogenes*.

Os experimentos foram realizados em triplicata, os resultados da fermentação utilizando glicerol e o glicerol residual estão apresentados na Figura 14.



**Figura 14.** Produção de H<sub>2</sub> (mL), utilizando meio de cultivo MG2, em 48h de cultivo, pH 6,8 e temperatura 37<sup>o</sup>C. Medidas de triplicata e estimativa de desvio padrão. Valores assinalados com a mesma letra não diferem significativamente ( $p < 0,05$ ), análise estatística com teste ANOVA e posterior *Student's T-test*.

O meio de cultivo MG2 aumentou em mais de dez vezes a produção de H<sub>2</sub>. Isso é explicável por se entender que o microrganismo tenha à sua disposição uma quantidade maior de fontes de nitrogênio, ácido nicotínico e níquel. Tais elementos são essenciais para a síntese de proteínas e aminoácidos, além de, aumentar consideravelmente a produção de H<sub>2</sub> (Lin & Lay, 2005; Alshiyab *et al.*, 2008).

Ito *et al.* (2005) destaca a importância do acréscimo de 5 g/L tripton e extrato de levedura ao meio de cultura, o que acelera a fermentação e conseqüentemente a produção de gás, confirmando nossos resultados. Alvarado-Cuevas *et al.* (2013) explicam que, acrescentando 5% de peptona e o extrato de levedura ao meio de cultivo, pode aumentar em até 3,5% a produção de H<sub>2</sub>. Fontes inorgânicas de nitrogênio, inclusive o nitrogênio amoniacal, podem inibir o metabolismo microbiano e conseqüentemente diminuir a produção de gás. Wang *et al.* (2008), alcançaram maiores produções de H<sub>2</sub> (950 mL/L) utilizando extrato de levedura como fonte de nitrogênio. Fontes inorgânicas como sulfato de amônia

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, também obtiveram resultados promissores (460mL/L), se levarmos em consideração seu baixo custo.

Os isolados testados, *E. ludwigii* e *B. amyloliquefaciens*, mantiveram uma produção constante de H<sub>2</sub>, não apresentando diferenças estatísticas entre eles. Quando analisado o isolado comercial, *E. aerogenes*, sua produção variou entre 63,5- 454 mL H<sub>2</sub>/ L de meio de cultivo, valor muito inferior aos 2,5 L H<sub>2</sub>/L de meio de cultura obtidos por Neves (2009) utilizando este mesmo isolado e glicerol residual como fonte de carbono.

Com a finalidade de comprovar a importância da peptona e do extrato de levedura no meio de cultivo, repetiram-se os experimentos utilizando o meio mínimo para a fermentação. A Tabela 12 mostra uma comparação da produção de H<sub>2</sub> (mmol/L), utilizando o meio mínimo, MG1 e MG2. Esta comparação entre os meio de cultivo foi realizada por técnica de gasômetro de frasco invertido, o resultado (mL) foi corrigido, com a aplicação da equação representada no item 4.10.2 deste trabalho e após aplicado a equação dos gases ideais (item 4.10.3) para obter-se como resultado a produção de H<sub>2</sub> em mmol/L.

**Tabela 12.** Quantificação de H<sub>2</sub> (mmol/L) produzido utilizando diferentes meios de cultivo em 48h de cultivo, pH 6,8 e temperatura de 37<sup>o</sup>C. Testes com apenas uma repetição.

Isolado	Produção de H <sub>2</sub> (mmol/L)					
	Meio mínimo		MG1		MG2	
	Glicerol / G. residual	Glicerol / G. residual	Glicerol/ G.residual	Glicerol/ G.residual	Glicerol/ G. residual	Glicerol/ G. residual
<i>E. aerogenes</i>	0,11	0,11	0,40	2,56	18,56	20,49
<i>E. ludwigii</i>	9,00	0,50	0,13	1,30	18,62	31,66
<i>B. amyloliquefaciens</i>	9,30	0,41	1,8	0,23	18,62	18,62

Utilizando o meio mínimo *E. aerogenes* manteve a sua produção de H<sub>2</sub> em 0,11 mmol H<sub>2</sub> /L. Enquanto que, *E. ludwigii*, teve um decréscimo acentuado na sua produção, havendo uma variação de 9 mmol H<sub>2</sub>/L para 0,50 mmol H<sub>2</sub> /L, utilizando o glicerol residual em meio mínimo. Uma variação significativa (0,41- 9,3 mmol H<sub>2</sub>/L) também foi observada nos teste utilizando *B. amyloliquefaciens*, este isolado apresentou os melhores resultados com uma produção de 9,3 mmol H<sub>2</sub>/L utilizando o meio de cultivo mínimo e com o glicerol comercial

como fonte de carbono. Nos testes com o meio 3% de glicerol, *E. aerogenes* mostrou melhores resultados (2,56 mmol H<sub>2</sub>/L) e a menor produção ficou com *E. ludwigii* (0,1 mmol H<sub>2</sub>/L). O meio de cultivo MG2 apresentou resultados superiores aos outros meios analisados, chegando ao dobro na produção de H<sub>2</sub> se comparado ao meio mínimo. Neste meio, MG2, quando utilizado o glicerol, observou-se uma produção de H<sub>2</sub> constante (18,5 mmol H<sub>2</sub>/L) para os três isolados; já quando analisado o glicerol residual, os resultados de mais interesse foram *E. ludwigii* (31,66 mmol H<sub>2</sub>/L) e o menor resultado ficou com *B. amyloliquefaciens* (18,62 mmol H<sub>2</sub>/L).

As variações na produção de H<sub>2</sub> demonstram que cada microrganismo apresenta necessidades nutricionais diferentes. O cultivo celular com o meio MG1 foi o que obteve as menores produções, embora apresente pequena quantidade de extrato de levedura e peptona, nutrientes que aumentam a produção do gás. Estes resultados podem ser indicativos de inibição da formação do produto pelo substrato, uma vez que este meio de cultivo continha uma porcentagem maior de glicerol em sua composição. Como solução neste caso, poderia-se utilizar processo de batelada alimentada, o que evitaria a inibição por substrato.

Em meio mínimo, mesmo sem a adição do extrato de levedura e peptona, os microrganismos foram capazes de produzir H<sub>2</sub>, demonstrando o aproveitamento da fonte de carbono (glicerol) e eliminando a importância do extrato de levedura e da peptona no processo. A melhor produção de H<sub>2</sub> para os três microrganismos testados, *E. aerogenes* (20,49 mmol H<sub>2</sub>/L), *E. ludwigii* (31,66 mmol H<sub>2</sub>/L) e *B. amyloliquefaciens* (18,62 mmol H<sub>2</sub>/L) foi no meio MG2 tendo o glicerol residual como fonte de carbono. Este meio contém menor concentração de glicerol (15 g/L) e maiores concentrações de triptona (5 g/L) e extrato de levedura (5 g/L) Portanto, utilizaram-se os resultados do do meio de cultivo MG2 para os cálculos de rendimento da produção de H<sub>2</sub> (Tabela 13).



**Tabela 13.** Rendimento da produção de hidrogênio, utilizando glicerol ou glicerol residual como fonte de carbono e meio de cultivo MG2.

Isolado	Produção de H <sub>2</sub> (mol H <sub>2</sub> /mol glicerol)	
	Glicerol	Glicerol residual
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0,35±0,268 <sup>a</sup>	0,13±0,10 <sup>a</sup>
<i>Enterobacter ludwigii</i>	0,35±0,053 <sup>a</sup>	0,35±0,10 <sup>a</sup>
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	0,30±0,006 <sup>a</sup>	0,50±0,20 <sup>a</sup>

\* Condições de cultivo: meio de MG2, 48h de cultivo, pH 6,8 e temperatura 37<sup>0</sup>C. Medidas de triplicata e estimativa de desvio padrão. Valores assinalados com a mesma letra não diferem significativamente (p<0,05), análise estatística com teste ANOVA e posterior *Student's T-test*.

Não houve variação nos rendimentos utilizando o glicerol. Estes se mantiveram constante em 0,3 mol H<sub>2</sub>/ mol de glicerol, correspondendo a 10% do rendimento teórico. Quando analisado o glicerol residual percebeu-se uma pequena variação de rendimentos, tendo *E. aerogenes* 0,13 mol H<sub>2</sub>/ mol de glicerol residual, *E. ludwigii* 0,35 mol H<sub>2</sub>/ mol de glicerol e *B. amyloliquefaciens* 0,50 mol H<sub>2</sub>/ mol de glicerol. Portanto, merece destaque entre os isolados o *B. amyloliquefaciens*, pois além dos maiores rendimentos na produção de H<sub>2</sub>, atingindo 17% do rendimento teórico, a produção foi constante, indicando uma aptitude metabólica deste microorganismo. Descrições sobre produção de H<sub>2</sub> por *Bacillus* são raras, poucos estudos recentes têm demonstrado o potencial desta classe em produzir biocombustíveis, como o H<sub>2</sub>, por exemplo (Kumar *et al.*, 2013).

*B. amyloliquefaciens* foi recentemente relatado como espécie produtora de H<sub>2</sub>, sendo capaz de produzir 2,26 mol H<sub>2</sub>/mol de glicose (Song *et al.*, 2013). Esta espécie *B. subtilis* foi capaz de produzir entre 1,5 a 3,3 mol de H<sub>2</sub>/ mol de sacarose em 16 dias de fermentação (Mohanapriya & Krishnaveni, 2013). Bala-Amutha & Murugesan (2013), obtiveram sucesso na produção de H<sub>2</sub> por fermentação, utilizando hastes de milho como substrato com a cepa de *B. licheniformis* MSU AGM 2 isolada de resíduos da indústria de papel. Sinha & Pandey (2014) propõe o uso de sistemas híbridos (fotossintético e fermentação) a fim de aumentar os rendimentos, visto que a fermentação produz uma quantidade generosa de ácidos voláteis

utilizados na fotossíntese. Os mesmos autores obtiveram um máximo rendimento de  $0,22 \pm 0,05$  mol H<sub>2</sub>/ mol sacarose.

Segundo Kumar *et al.*(2013) o gênero *Bacillus* é um bom candidato para a produção de hidrogênio. É capaz de crescer em aerobiose e produzir H<sub>2</sub>. Em condições fermentativas crescem em altas densidades e pelo fato de esporularem podem sobreviver em condições adversas. Também competem pela sobrevivência com outras bactérias através da secreção de enzimas. São eficientes na hidrólise de resíduos através de enzimas como as proteases e amilases, além de poder produzir biopolímeros (poli-hidroxicarboxilatos) a partir de hidrolisados biológicos.

Outro microrganismo de destaque neste trabalho é a *E. ludwigii*, que não possui relatos na literatura como produtora de H<sub>2</sub>, embora a família Enterobacteriaceae seja amplamente descrita como produtora de H<sub>2</sub>. *Enterobacter asburiae* foi descrita em 2007, por Shin *et al.*, como um nova espécie de enterobactéria capaz de produzir hidrogênio. Já a espécie de *Enterobacter aerogenes*, é a mais citada como produtora do gás (Jayasinghearachchi *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009; Reungsang *et al.*, 2013; Song *et al.*, 2013). *Enterobacter ludwigii* não é descrita na literatura como produtora de H<sub>2</sub>, o que pode estar relacionado com a similariedade desta bactéria com *E. cloacae*, o que leva a erros de identificação dos isolados podendo ser resolvidos pelo sequenciamento de DNA. *Enterobacter aerogenes* e *E. cloacae* ITT-By 08 têm sido largamente estudadas, tendo obtido rendimentos de 1,97mmol de H<sub>2</sub>/g e 2,2mmol de H<sub>2</sub>/g respectivamente, utilizando glicose como substrato (Neves, 2009).

Quanto aos rendimentos obtidos, nossos resultados encontram-se de acordo com relatos da literatura. Selembo *et al.* (2009) com inóculo tratado por calor obtiveram um rendimento entre 0,28 e 0,31 mol H<sub>2</sub>/ mol glicerol. Resultados inferiores foram relatados por Temudo *et al.* (2008), 0,05 mol de H<sub>2</sub>/ mol glicerol com cultura mista.

Utilizando *E. aerogenes* em suas fermentações durante seis dias, Markov *et al.* (2010) produziram 0,2 mol H<sub>2</sub>/mol de glicerol. Vasconcelos de Sá *et al.* (2013) utilizando *Clostridium*, microrganismo anaeróbio estrito cujos rendimentos de produção de gás H<sub>2</sub> são maiores, obtiveram rendimentos de 0,80 mol de H<sub>2</sub>/ mol de glicerol. Jirtrwung *et al.*(2013) obtiveram resultados promissores tanto com glicerol comercial quanto com glicerol residual, tendo este último, um rendimento de 0,84 mol/mol, utilizando um isolado de *Enterobacter aerogenes*.

Em ensaios com duração de quatro horas, a 40°C e pH 8, utilizando inóculo de *Klebsiela* sp., obtiveram um rendimento de 44,27 mmol H<sub>2</sub>/ g de glicerol (Chookaew *et al.* 2014). Em ensaios para avaliar a influência da concentração de ureia e de glicerol no meio de cultivo, Sittijunda & Reungsang (2012) obtiveram rendimento de 0,30 mol H<sub>2</sub>/ mol de glicerol, utilizando a bactéria termofílica *Thermoanaerobacterium*.

Maru *et al.* (2012) se aproximou dos rendimentos teóricos de 3 mol H<sub>2</sub>/ mol de glicerol. Utilizando isolados de *Thermotoga marítima* e *Thermotoga neopolitana*, microrganismo hipertermófilos, com concentração de glicerol 2,5g/L e 4 g/L de extrato de levedura, obtiveram rendimentos de 2,75 e 2,65 mol H<sub>2</sub>/ mol de glicerol, respectivamente.

É difícil fazer uma comparação entre os rendimentos da fermentação, pois não há uma unificação entre as unidades de medida apresentadas nos resultados. Torna-se necessário a padronização de unidades para expressar a produção de H<sub>2</sub>.

## **5.5 ANÁLISE DE GENES PRODUTORES DE H<sub>2</sub>**

As hidrogenases são o principal grupo de enzimas envolvidas na produção de hidrogênio por fermentação microbiana (Heinekey, 2009; Hallenbeck, 2012; Sabaratnam & Ali Hassan, 2012). Estas enzimas possuem vários operons, com múltiplos genes para controle.

Foram analisados três genes HycC, HycF e HycE, da subunidade Hyd-3 pertencente ao operon Hyc. A presença destes genes nos microrganismos isolados foi analisada através de bioinformática, utilizando a ferramenta *BLAST* intra. Também se explorou a similaridade destes genes com proteínas de outras bactérias, que possuem genoma depositado no *GenBank*, com a finalidade de estabelecer uma relação entre estes genes e a produção de H<sub>2</sub>.

O operon Hyc ao qual pertence a Hyd-3 é o mais estudado. Este tipo de hidrogenase é expressa somente em anaerobiose, sendo responsável pela oxidação do formato, pelo formiato desidrogenase (Fdh-H) que forma um conjunto associado à membrana com formiato hidrogenliase (FHL) (Vignais *et al.*, 2001; Bagramyan *et al.*, 2002; Vignais & Billoud, 2007).

Dos microrganismos isolados neste trabalho apenas *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* e *B. atropheus* possuem genoma completamente sequenciado e, portanto, foram utilizados em todas as análises. Neste estudo foram considerados *e-value* próximos a zero, o que demonstra que a similaridade não ocorre ao acaso.

O gene HycC que codifica proteínas de membranas (Bagramyan *et al.*, 2002), não foi encontrado em nenhuma das espécies de *Bacillus*. Quando o mesmo gene fora analisado em outras espécies de microrganismos, *Citrobacter rodentium*, *Citrobacter turicensis*, *Dehalococcoides* e *Enterobacter cloacae* (Anexo B, Tab.B.1), apresentou similaridade com os *antiporter* mrpA e mrpD, das três espécies de *Bacillus*.

O *antiporter* é um transportador de uma proteína integral de membrana envolvida no transporte secundário de duas ou mais moléculas diferentes através da membrana fosfolipídica, em sentidos opostos. Envolvido no transporte de íons Na<sup>+</sup>, mrpA; enquanto mrpD parece estar envolvido no transporte de íons H<sup>+</sup>. Este resultado pode explicar a correlação da concentração de Na<sup>+</sup> para a produção de hidrogênio, por bactérias halogênicas,

resultado já reportado, em trabalhos deste laboratório, por microorganismos do gênero *Brevebacterium* (Stallivieri *et al.*, 2014).

Os genes *mrpA* e *mrpD* também são homólogos as subunidades do Complexo I (NADH- ubiquinona oxidoreductase), importante maquinário celular para bombear prótons (Moparthi *et al.*, 2011). Todas as subunidades do Complexo I, *NuoL*, *NuoM* e *NuoN* apresentam semelhança, principalmente com as [NiFe] hidrogenases (Vignais *et al.*, 2001).

As análises comparativas do gene *HycE*, responsável por codificar as hidrogenases [NiFe] (Bagramyan *et al.*, 2002) não apresentaram resultados significativos com proteínas de outros genes.

O último gene do complexo Hyd-3 analisado, foi *HycF*. Este gene codifica pequenas unidades de transferência de elétrons dentro do complexo FHL (Bagramyan *et al.*, 2002). Nas análises do *BLAST* intra-espécie não foi encontrado resultados para o gênero *Bacillus*. Em análise inter-espécie pode-se notar a similaridade deste gene em *Citrobacter rodentium*, *Cronobacter turicensis*, com *yjgC* e *yrhE* de *Bacillus* (Tabela 14).

**Tabela 14.** Análise das sequências do operon *hyc*, resultados da análise de proteínas do gene *HycF*, através de *BLAST (All)*.

<b>Microrganismo isolado</b>	<b>Microrganismo</b>	<b>Similar. (%)</b>	<b>Proteína similar</b>	<b>Função</b>	<b>E-value</b>
<i>Bacillus atrophaeus</i> 1942	<i>Citrobacter rodentium</i> ICC168	32,8	yjgC	Ferro- enxofre domínio proteína	1,00E-06
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	<i>Cronobacter turicensis</i> z3032	28,7	yjgC	Ferro- enxofre domínio proteína	6,00E-08
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	<i>Cronobacter turicensis</i> z3032	30,5	yrhE	Formato desidrogenase subunidade alpha YrhE	9,00E-07
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	<i>Cronobacter turicensis</i> z3032	28,7	yjgC	Ferro- enxofre domínio proteína	6,00E-08
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	<i>Cronobacter turicensis</i> z3032	30,5	yrhE	Formato desidrogenase subunidade alpha YrhE	9,00E-07
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42	<i>Cronobacter turicensis</i> z3032	28,7	yjgC	Proteína hipotética	6,00E-09
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42	<i>Cronobacter turicensis</i> z3032	28,5	yrhE	Proteína hipotética	1,00E-07

Segundo a Enciclopédia de Genes e Genoma de Kioto (KEGG), o gene *yjgC* e *yrhE* são similares a formiato desidrogenase. Trata-se de uma proteína de múltiplas funções, envolvida no metabolismo do carbono além de resposta ao estresse salino e etanólico.

Embora não se tenha encontrado estes genes específicos nos microrganismos isolados, a subunidade Hyd-3 possui envolvimento na produção de hidrogênio. O gás é produzido no interior da célula bacteriana pela oxidação do NADH e precisa ser bombeado para o meio externo. As proteínas que apresentam similaridade participam das duas atividades, oxidação do NADH e o bombeamento do excesso dos prótons para o meio extracelular.

Com o intuito de obter uma comparação entre a presença ou não de genes nos microrganismos analisados, estudou-se a subunidade Hyd-4. Esta pertence ao operon *hyf*, sendo descrita como não tendo envolvimento na produção de hidrogênio (Vignais *et al.*, 2001; Bagramyan *et al.*, 2002). Neste caso também foram analisados três genes, *HyfC*, *HyfFe* e *HyfH*.

As análises de *BLAST* intra não encontraram nenhum dos três genes nos *Bacillus* analisados. O gene *HyfC* não apresentou similaridade com nenhum outro gene ou proteínas de outras bactérias.

O gene *HyfF* também está envolvido com o transporte de prótons para dentro e fora da célula. Os microrganismos *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Aromtolum aromaticum*, *Azispirillum lipoferum*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Burkholderia pseudomallei*, *Candidatus Nitrospira defluvi* e *Cupriavidus necator*, *Dickeya dadantii*, *Escherichia coli* apresentaram proteínas similares a do gene *HyfF* com *mrpA* e *mrpD* de *Bacillus* (Anexo B. Tab. B. 2).

E o último gene analisado *HyfH* de *Aeromonas salmonicida* e *Edwardsiella tarda* possui homologia com os genes *yjgC* e *yrhE* de *Bacillus* (Tabela 15).

**Tabela 15.** Análise das sequências do operon *hyf*, resultados da análise de proteínas do gene *HyfH*, através de *BLAST (All)*.

<b>Microrganismo isolado</b>	<b>Microrganismo</b>	<b>Similar. (%)</b>	<b>Proteína similar</b>	<b>Função</b>	<b>E-value</b>
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42	<i>Aeromonas salmonicida</i> A449	30,6	yrhE	Proteína hipotética	7,00E-07
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42	<i>Aeromonas salmonicida</i> A449	31,6	yjgC	Proteína hipotética	3,00E-11
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC14580	<i>Aeromonas salmonicida</i> A449	29,1	yrhE	Format desidrogenase subunidade alpha YrhE	7,00E-08
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC14580	<i>Aeromonas salmonicida</i> A449	30,7	yjgC	Ferro- enxofre domínio proteína	1,00E-06
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC14580	<i>Edwardsiella tarda</i> EIB202	26,9	yjgC	Ferro- enxofre domínio proteína	2,00E-06
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42	<i>Edwardsiella tarda</i> EIB202	26,9	yjgC	oxidoreductase	2,00E-06

Os resultados descritos confirmam a afirmação de Bagramyan *et al.* (2002) que o operon *hyF* é homólogo a todas as subunidades do *hyd-3*. Embora apresentem similaridade, os dois subtipos de hidrogenases (3 e 4) são expressos em condições diferentes, já que a *hyd-3* participa da produção de hidrogênio pela fermentação do glicerol e a *hyd-4* parece não ter participação (Sanchez – Torres *et al.* 2013).

As análises mostram que os isolados de *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* e *B. atrophaeus* não possuem os genes específicos analisados. Embora possuam similaridade com outras proteínas que poderiam desempenhar funções no transporte de  $H_2$  para exterior da célula. Portanto, não foi possível relacionar a produção de  $H_2$  com a presença dos genes analisados. Segundo Hallenbeck (2012), mesmo que estes genes das subunidades 3 e 4 não sejam estruturais para a maturação das hidrogenases, tratam-se de genes adicionais para a



inserção e adequação do complexo metálico. Portanto, podem-se aumentar os rendimentos dos processos fermentativos pela manipulação genética dos genes adicionais.

Além disso, outro questionamento importante após a análise comparativa e que merece ser estudado com detalhamento é a similaridade entre os genes dos microorganismos não descritos na literatura como produtores de H<sub>2</sub>. A presença de genes e proteínas com funções similares nos microrganismos deveriam também indicar produtores de hidrogênio.

## 6. CONCLUSÃO

A análise dos dados obtidos neste trabalho, nas condições estudadas, permite entender que:

- uma linhagem de *Bacillus amyloliquefaciens* obteve os melhores rendimentos de produção de H<sub>2</sub> em meio de cultivo MG2, utilizando o glicerol residual;
- encontram-se microrganismos capazes de produzir hidrogênio a partir da degradação do glicerol de amostras de lodos de ETE;
- o lodo de ETE suínicola apresentou uma maior variedade de linhagens produtoras de hidrogênio;
- a concentração de glicerol utilizada no meio de cultivo influencia no crescimento microbiano;
- o glicerol residual de biodiesel pode ser empregado na produção de hidrogênio, este que apresentou os melhores resultado em todas as linhagens estudadas;
- os resultados obtidos de produção de hidrogênio não estão relacionados aos genes HycC, HycE, HycF, HyfC, HyfF e HyfH.

A microbiota natural presente em efluentes tem potencial biotecnológico para produção de gás hidrogênio como combustível e/ou fonte de energia limpa e renovável.

## 7. PERSPECTIVAS

- Estudar as rotas metabólicas dos microrganismos para conhecer outros produtos formados durante a fermentação.
- Conhecer a necessidade nutricional de cada microrganismo através do uso de meios de cultivo definidos.
- Testar diferentes concentrações de glicerol para a produção de H<sub>2</sub>.
- Otimizar a composição dos meios de cultivo, a fim de baixar os custos de produção, para uma possível aplicação industrial do processo.
- Testar meios de cultivo que não necessitem de esterilização.
- Procurar variabilidade entre os *B. amyloliquefaciens* isolados.
- Suplementar o glicerol residual de biodiesel com resíduos lignocelulósicos exauridos do cultivo de macrofungos, a fim de constituir um meio de cultivo para a produção de H<sub>2</sub>, baseado somente em resíduos.
- Estudos de co-culturas para intensificar a produção de H<sub>2</sub>.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvarado- Cuevas, Z.D.; Acevedo, L.G.O.; Salas, J.T.O., León-Rodríguez, A.D. (2013). Nitrogen sources impact hydrogen production by *Escherichia coli* using cheese whey as substrate. **New Biotechnology**, 6: 585-590.
- Alshiyab, H., Kalil, M S., Hamid, A.A., Yusoff, W.M.W.(2008) Trace metal effect on hydrogen production using *C. acetobutylicum*. **Journal of Biological Sciences**, 8: 1-9.
- Amaral,P. F. F.; Ferreira, T. F.; Fontes, G. C.; Coelho M. A. Z (2009) Glycerol valorization: New biotechnological routes. **Food and Bioproducts Processing**, 78:179-186.
- Anitescu, G. ; Bruno, T.J.(2012) Fluid properties needed insupercritical transesterification of triglyceride feedstocks to biodiesel fuels for efficient and clean combustion- A review. **The Journal of Supercritical Fluids**, 63: 133-149.
- Arruda, P.V.; Rodrigues, R.C.; Felipe, M.G. (2007) Glicerol: um subproduto com grande capacidade industrial e metabólica. **Revista analítica**, n<sup>o</sup>26, 56-62.
- Bagramyan, K; Mnatsakanyan, N.; Poladian, A.; Vassilian, A.; Trchounian, A. (2002) The roles of hydrogenases 3 and 4 and the F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATPase, in H<sub>2</sub> production by *Escherichia coli* at alkaline and acid pH. **FEBS Letters**, 516: 172-178.
- Bala-Amutha, K.; Murugesan, A.G. (2013) Biohydrogen production using corn stalk employing *Bacillus licheniformis* MSU AGM 2 strain. **Renewable Energy**, 50 : 621-627.

- Baltazar, C.S.A (2009) Estudo da difusão de hidrogênio molecular numa hidrogenase [NiFeSE] por método de dinâmica molecular. **Dissertação do curso de pós – graduação (Mestrado em bioquímica)**. Departamento de Bioquímica. Faculdade de Ciências. Lisboa-Portugal.
- Barros, A.R; Adorno, M.A.T.; Sakamoto, I.K.; Maitinguer, S.I.; Varesche, M.B.A.; Silva, E.L. (2011) Performance evaluation and phylogenetic characterization of anaerobic fluidized bed reactors using ground tire and pet as support materials for biohydrogen production. **Bioresource Technology**, 102: 3840-3847.
- Beatriz, A.; Araújo, Y.J.K.; Lima, D.P. (2010) Glicerol: um breve histórico e aplicação em sínteses estereosseletivas. **Química Nova**, vol. 34, n<sup>o</sup>2, 306-319.
- Beckers, L.; Hiligsmann, S.; Hamilton, C.; Masset, J.; Thonart, P. (2010) Fermentative hydrogen production by *Clostridium butyricum* CWBI1009 and *Citrobacter freundii* CEBI952 in pure and mixed cultures. **Biotechnology, Agronomy, Society and Environment**, 14: 541-548.
- Berry, C. (2012) The bacterium, *Lysinibacillus sphaericus*, as an insect pathogen. **Journal of Invertebrate Pathology**, 109: 1-10.
- Borges, F.; Sellin, N.; Medeiros, S.H.W. (2008) Characterization and evaluation of sewage and industrial sludge as biomass in the energy generation process. **Science & Engineering Journal**, 17: 27-32.

- Borowski, H.C.; Silveira, J.L., Ebinuma, C.D.; Ferreira, E.D. (2002) Análise de um modelo de co-geração a partir de resíduos sólidos urbanos. **Revista de Tecnologia Fortaleza**, v. 23, n.1, p.26-27, dez.2002.
- Botta, L.S.; Silva, E.L.; Varesche, M.B. (2014) Produção de Hidrogênio a partir de papel em lisímetro via fermentação celulolítica. **Anais do IV Seminário de Projeto Temático [on-line]**. Escola de Engenharia de São Carlos – USP. São Carlos/SP.
- Braga, A.F.M. & Zaiat, M. (2014) Produção anaeróbia termofílica de H<sub>2</sub>: Adequação das concentrações de Fe<sup>2+</sup> e Ni<sup>2+</sup> e modelagem do processo em reator tubular de leito empacotado. **Anais do IV Seminário de Projeto Temático [on-line]**. Escola de Engenharia de São Carlos – USP. São Carlos/SP.
- Burke, S.A.; Wright, J.D.; Robinson, M.K.; Bronk, B.V.; Warren, R.L. (2004) Detection of Molecular Diversity in *Bacillus atrophaeus* by Amplified Length Polymorphism Analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, 70: 2786-2790.
- Cappelletti, B.M. (2009) Estudo da concentração inicial da água residual do processamento de mandioca na produção de biohidrogênio por *Clostridium acetobutylicum* ATCC824. **Dissertação do curso de pós – graduação (Mestrado em Engenharia de Alimentos)**. Departamento de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis – SC, Brasil.
- Carminato, V.M. & Zaiat, M. (2014) Produção de Hidrogênio e Metano em reatores anaeróbios de Leito ordenado a partir de soro de queijo. **Anais do IV Seminário de Projeto Temático [on-line]**. Escola de Engenharia de São Carlos – USP. São Carlos/SP.

- Carra, S. (2012) Estudo cinético da produção de ácido lactobiônico e sorbitol por enzimas periplasmáticas de *Zymomonas mobilis*. **Dissertação de Mestrado (Mestrado em Biotecnologia)**. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul/RS.
- Chaganti, S.R.; Lalman, J.A.; Heath, D.D. (2012) 16S rRNA gene based analysis of the microbial diversity and hydrogen production in three mixed anaerobic cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**, 37: 9002-9017.
- Choi, J.; Ahn, Y. (2014) Characteristics of biohydrogen fermentation from various substrates. **International Journal of Hydrogen Energy**, 39: 3152-3159.
- Chong, M. L.; Rahman. N. A. A.; Yee, F. L.; Aziz, S. A.; Rahim, R. A.; Shirai, Y.; Hassan, M. A.(2009) Effects of pH, glucose and iron sulfate concentration on the yield of biohydrogen by *Clostridium butyricum* EB6. **International Journal of Hydrogen Energy**, 8859-8865.
- Chookae, T; O-Thong, S.; Prasertsan, P. (2014) Biohydrogen production from crude glycerol by immobilized *Klebsiella* sp. TR17 in a USB reactor an bacterial quantification under non- sterile conditions. **International Journal of Hydrogen Energy**, 39: 9580-9587.
- Costa, V.R. (1995) Plásticos a caminho da reciclagem. **Ciência hoje**. Rio de Janeiro, v.18, n.17, p.8-15, mar.1995.

Costa, J. (2010) Produção biotecnológica de hidrogênio, etanol e outros produtos a partir do glicerol da reação de formação do biodiesel. **Dissertação do curso de pós-graduação (Mestrado-Química)** Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre –RS, Brasil.

Das, D. (2009) Advances in biohydrogen production processes: An approach towards commercialization. **International Journal of Hydrogen Energy**, 34: 7349-7357.

Das, D. e Veziroglu, T.N.(2008) Advances in biological hydrogen production processes. **International Journal of Hydrogen Energy**, 6046-6057.

Davila – Vazqueza, G.; Alatraste – Mondragóna, F.; León – Rodríguezb, A.; Razo-Flores E. (2008) Fermentative hydrogen production in batch experiments using lactose, cheese whey and glucose: influence of initial substrate concentration and pH. **International Journal of Hydrogen Energy**, 33: 4989-4897.

Dezotti, M. (2008) **Processos e Técnicas para o Controle Ambiental de Efluentes Líquidos**. Rio de Janeiro. E-papers. 360p.il. (Série Escola Piloto de Engenharia Química COPPE/UFRJ v.5)

Drapcho, C.; Nhuan, N.; Walker, T.(2008) **Biofuels Engineering Process Technology**. The McGraw-Hill Companies, Inc.

Dunn, S. (2002) Hydrogen Futures: Toward a Sustainable Energy System. **International Journal of Hydrogen Energy** , 27: 235-264.



Dutto, S. (2013) A review on production, storage of hydrogen and its utilization as an energy resource. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry [on-line]**. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jiec.2013.07.037>

Elsharnouby, O.; Hafez, H.; Nakhla, G.; El Naggar, M.H. (2013) A critical literature review on biohydrogen production by pure cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**, 38: 4945-4966.

Ewan, B.C.R ; Allen, R.W.K. (2005) A figure of merit assessment of the routes to hydrogen. **International Journal of Hydrogen Energy**, 30: 809-819.

Fan Y.; Li C.; Lay J-J.; Hou H.; Zhang G. (2004) Optimization of initial substrate and PH levels for germination of spring hydrogen-producing anaerobes in cow dung compost. **Bioresource Technology**, 91:189-193.

Feix, R.D. (2012). A industria do Biodiesel no Rio Grande do Sul: desafios e oportunidades. **Índice econômico FEE**, 4: 145-158.

Fernandes, P.F; Oliveira, A.P.N.; Hotza, D. (2003) Reciclagem do Lodo da Estação de tratamento de efluentes de uma indústria e revestimento cerâmico. Parte 1: Ensaios laboratoriais. **Cerâmica Industrial**, 8(2) Março/Abril, 2003.

- Foladori, P.; Bruni, L.; Tamburini, S.; Ziglio, G. (2010) Direct quantification of bacterial biomass in influent, effluent and activated sludge of waste water treatment plants by using flow cytometry. **Water Research**, 44: 3807-3818.
- Fuess, L.T.; Kiyuna, L.S.M.; Garcia, M.L., Zaiat, M. (2014) Avaliação da produção de H<sub>2</sub> em reator de Leito Fixo empacotado sob condições termofílicas. **Anais do IV Seminário de Projeto Temático [on-line]**. Escola de Engenharia de São Carlos – USP. São Carlos/SP.
- Gomes, M.J.P. (2013) Gênero *Bacillus* spp. Tópicos em Bacteriologia Veterinária [**recurso eletrônico**]. Faculdade de Veterinária (UFRGS), Porto Alegre -RS.
- Gonçalves, B. R. L.; Perez, L.; Angelo, A. C. D. (2009) Glicerol: uma inovadora fonte de energia proveniente da produção de biodiesel. **International Workshop Advances in Cleaner Production**. São Paulo, SP, Brasil.
- Goud, R.K.; Sarkar, O.; Mohan, S.V. (2014) Regulation of biohydrogen production by heat-shock pretreatment facilitates selective enrichment of *Clostridium* sp. **International Journal of Hydrogen Energy**, 39: 7572-7586.
- Grimont, F. ; Grimont, P.A.D. (2006) The Genus *Enterobacter*. **Prokaryotes**, 6:197-214.
- Guo, A.; Guo, L.; Cao, C.; Yin, J.; Lu, Y.; Zhang, X. (2012) Hydrogen production from glycerol by supercritical water gasification in a continuous flow tubular reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, 37: 5559-5568.

Haakensen, M.; Dobson, C.M.; Denner, M.; Ziola, B. (2008) Real-time PCR detection of bacteria belonging to the *Firmicutes* Phylum. **International Journal of Food Microbiology**, 125: 236-241.

Hahn, D.; Kück, U. (1994) Biochemical and Molecular Genetics Basis of Hydrogenases. **Process Biochemistry**, 29: 633-644.

Hallenbeck, P.C & Ghosh, D. (2009) Advances in fermentative biohydrogen production: the way forward? **Trends in Biotechnology**, 27: 287-297.

Hallenbeck, P.C (2012) Fundamentals of Dark Hydrogen Fermentations. Multiple Pathways and Enzymes. **State of the art and Progress in Production of Biohydrogen**. Betham e Books , 94-111.

Hallenbeck, P.C. ; Benemann, J.R. (2013) Biohydrogen – The microbiological production of hydrogen fuel. **Biotechnology**. Vol. VII.

Hamilton, C.; Hiligsmann, S.; Beckers, L., Masset, J.; Wilmotte, A.; Thonart, P. (2010). Optimization of culture conditions for biological hydrogen production by *Citrobacter freundii* CWBI952 in batch, sequenced-batch and semicontinuous operating mode. **International Journal of Hydrogen Energy**, 35: 1089-1098.

Hasyim, R.; Imai, T.; Reungsang, A.; O –Thong, S. (2011) Extreme –thermophilic biohydrogen production by anaerobic heat treated digested sewage sludge culture. **International Journal of Hydrogen Energy**, 36: 8727-8734.

Heinekey, D.M. (2009) Review: Hydrogenase enzymes: Recent structural studies and active site models. **Journal of Organometallic Chemistry**, 694: 2671-2680.

Higashi, S. (2008) Classificação de Bactérias com Base no Gene Ribossomal 16S Utilizando Redes Neurais Artificiais. **Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Ciência da Computação)**. Universidade Estadual de Londrina. Londrina- Paraná, Brasil.

Hoffman, H; Stindl, S.; Stumpf, A.; Mehlen, A.; Monget, A.; Heesemann, J.; Schleifer, K.; Roggenkamp, A. (2005). Description of *Enterobacter ludwigii* sp. Nov., a novel *Enterobacter* species of clinical relevance. **Systematic and Applied Microbiology**, 28: 206-212.

Ito, T, Nakashimada, Y.; Senba, K.; Matsui, T., Nishio, N. (2005) Hydrogen and Ethanol Production from Glycerol-Containing Wastes Discharged after Biodiesel Manufacturing Process. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 3: 260-265.

Jayasinghearachchi, H.S.; Sarma, P.M.; Singh, S; Aginihotri, A.; Mandal, A.K.; Lal, B. (2009) Fermentative hydrogen production by two novel strains of *Enterobacter aerogenes* HGN-2 and HT 34 isolated from sea buried crude oil pipelines. **International Journal of Hydrogen Energy**, 34: 7197-7207.

Jitrwung, R.; Verrett, J.; Yargeau, V. (2011) Optimization of media composition for the production of biohydrogen from waste glycerol. **International Journal of Hydrogen Energy**, 36: 11-9602.

Jitrwung, R.; Verrett, J.; Yargeau, V. (2013) Optimization of selected salts concentration for improved biohydrogen production from biodiesel-based glycerol using *Enterobacter aerogenes*. **Renewable Energy**, 50: 222-226.

Kalia, V.C.; Sadhana L.; Ghai R.; Mandal M.; Chauhan A. (2003) Mining Genomic databases to identify novel hydrogen producers. **Trends in Biotechnology**, 21(4): 152-156.

Kapdan, I; Kargi, F.(2006) Bio-hydrogen production from waste materials. **Enzyme and Microbial Technology**, 569-582.

Karinen, R.S. & Krause, A.O.I. (2006) New biocomponents from glycerol. **Applied Catalysis**, 306: 128-133.

KEGG. Enciclopédia de genes e genoma de Kioto. (**on-line**). Disponível em:  
[http://www.genome.jp/dbget-bin/www\\_bget?bsu+yjgC](http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?bsu+yjgC). Acesso em: 08 out. 2014

Ken-Jer, W.; Yeuh-Hui, L.; Yung-Chung, L.; Chun-Yen, C.; Wen-Ming, C.; Jo-Shu, C. (2011) Converting glycerol into hydrogen, ethanol, and diols with a *Klebsiella* sp. HE1 strain via anaerobic fermentation. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, 42(1): 20-25.

Kim, D.H.; Han, S.K.; Kim, S.H.; Shin, H.S. (2006) Effect of gas sparging on continuous fermentative hydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, 31: 2158-2169.

Kivisto, A.; Santala, V.; Karp, M. (2013) Non- sterile process for biohydrogen and 1,3 propanediol production from raw glycerol. **International Journal of Hydrogen Energy**, (IN PRESS), 1-7. Acesso: <http://dx.doi.org/10.016/j.ijhydene.2013.06.119>

Kotay, S; Das, D. (2007) Biohydrogen as a renewable energy resource-Prospects and potentials. **International Journal of Hydrogen Energy**.258-263.

Kumar, P.; Patel, S.K.S.; Lee, J.K.; Kalia, V.C. (2013) Extending the limits of *Bacillus* for novel biotechnological applications. **Biotechnology Advances**, 311: 1543-1561.

Kuo, S.C.; Chao, Y.C.; Tien, Y.M.; Chen, I.C.; Cheng, S.S. (2011) Bio-hydrogen behavior of suspended and attached microorganisms in anaerobic fluidized bed. **International Journal of Hydrogen Energy**, 36: 8800-8808.

Lamaison, F.C. (2009) Aplicação da água residuária do processamento da mandioca como substrato para a produção de hidrogênio por processo fermentativo. **Dissertação do curso de pós – graduação (Mestrado em Engenharia de Alimentos)**. Departamento de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis – SC, Brasil.

Lay, C.H.; Wu, J. H.; Hsiao, C. L.; Chang, J. J.; Chen, C. C.; Lin, C. H. (2010) Biohydrogen production from soluble condensed molasses fermentation using anaerobic fermentation, **Internation Journal of Hydrogen Energy** 35:13445-13451.

Lazaro, C.Z., Perna, V., Etchebehere, C., Varesch, M.B.A. (2014) Sugarcane vinasse as substrate for fermentative hydrogen production: The effects of temperature and substrate concentration. **International Journal of Hydrogen Energy**, 39, 6407-6418.

Lee, D.; Hsu, S.; Tso, C.; Su, A.; Lee, J. (2009) An economy – wide analysis of hydrogen economy in Taiwan. **Renewable Energy**, 34: 1947-1954.

Lee, D.; Chiu, L. (2012) Development of a biohydrogen economy in the United States, China, Japan, and India: With discussion of a chicken-and-egg debate. **International Journal of Hydrogen Energy**, 37: 15736-15745.

Lee, D. (2013) Identifying global competition and devising a biohydrogen roadmap on a continental level. **International Journal of Hydrogen Energy**, 38: 15620-15629.

Lee, D. (2014) Development and environmental impact of hydrogen supply chain in Japan: Assessment by the GGE-LCA method in Japan with a discussion of the importance of biohydrogen. **International Journal of Hydrogen Energy**, [in press] 1-17.

Leoneti, A.B.; Aragão-Leoneti, V.; Borges de Oliveira, S.V.W. (2012) Glycerol as a by-product of biodiesel production in Brazil. Alternatives for the use of unrefined glycerol. **Renewable Energy**, 45: 138-145.

Levin, D. B.; Azbar, N. (2012) Introduction: Biohydrogen in Perspective. **State of the art and Progress in Production of Biohydrogen**. Betham e Books , 3-4.

- Li, S.L.; Whang, L.M.; Chao, Y.C.; Wang, Y.H.; Wang, Y.F.; Hsiao, C.J.; Tseng, I.C.; Bai, M.D.; Cheng, S.S. (2010) Effects of hydraulic retention time on anaerobic hydrogenation performance and microbial ecology of bioreactors fed with glucose- peptone and starch-peptone. **International Journal of Hydrogen Energy**, 35 : 61-70.
- Lin, C.Y. and Lay, C.H. (2005) A nutrient formulation for fermentative hydrogen production using anaerobic sewage sludge microflora. **International Journal of Hydrogen Energy**, 30: 285-292.
- Lin, Y.C. (2013) Catalytic valorization of glycerol to hydrogen and syngas. **International Journal of Hydrogen Energy**, 38: 2678-2700.
- Liu, F; Fang, B. (2007) Optimization of bio-hydrogen production from biodiesel wastes by *Klebsiella pneumoniae*. **Biotechnology Journal**, 2: 80-374.
- Liu, B.; Christiansen, K.; Parnas, R.; Xu, Z.; Li, B. (2013) Optimizing the production of hydrogen and 1,3- propanediol in anaerobic fermentation of biodiesel glycerol. **International Journal of Hydrogen Energy**, 38: 3196-3205.
- Lo, Y.C.; Chen, X.J.; Huang, C.Y.; Yuan, Y.J.; Chang, J.S. (2012) Dark fermentative hydrogen production with crude glycerol from biodiesel industry using indigenous hydrogen producing bacteria. **International Journal of Hydrogen Energy**, 38: 15815-15822.



Logan, N.A.; Clerck, E.D.; Lebbe, L.; Verhelst, A.; Goris, J.; Forsyth, G.; Díaz, M.R.; Heyndrickx, M.; Vos, P.D. (2007) *Paenibacillus cineris* sp. Nov. and *Paenibacillus cookii* sp. Nov.; from Antarctic volcanic soils and a gelatin-processing plant. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 54: 1071-1076.

Lopes, A.N.; Cechinel, C.A.; Wentz, A.P. (2011) Co-produto do biodiesel – novas aplicações para a glicerina. **Diálogos e Ciência** – Revista da Faculdade de Tecnologia e Ciências – Rede de Ensino FTC, n.27.

Lorencini, P. (2013) Otimização do pré-tratamento ácido do bagaço de cana para sua utilização como substrato na produção biológica de hidrogênio. **Dissertação do curso de Pós- graduação (Mestrado em Ciências)**. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. São Paulo – SP, Brasil.

Lovato, G. (2014) Produção de Biohidrogênio em AnSBBR Tratando Efluente do Processo de Produção de Biodiesel – Efeito da Carga Orgânica e do Tempo de Enchimento. **Dissertação do curso de Pós-Graduação (Mestrado em Ciências: Engenharia Hidráulica e Saneamento)**. Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo. São Carlos – SP, Brasil.

Lucena, R.M. (2008) Identificação Molecular da Diversidade microbiana em reator UASB de Estação de Tratamento de Esgotos. **Dissertação do curso de Pós-graduação (Mestrado em Genética)**. Departamento de Genética da Universidade Federal de Pernambuco. Recife- Pernambuco, Brasil.

- Maintinguer, S.I., Fernandes, B.S., Duarte, I.C.S., Saavedra, N.K., Adorno, M.A.T., Varesche, M.B. (2008) Fermentative hydrogen production by microbial consortium. **International Journal of Hydrogen Energy**, 33: 4309-4317.
- Marques, P.A.S.S.; Bartolomeu, M.L.; Thomas, M.M.; Neves, L.M. (2009) Biohydrogen production from glycerol by a strain of *Enterobacter aerogenes*. **Proceeding of hypothesis VIII**; 2009, April 1-3; Lisbon, Portugal.
- Markov, S. A.; Averitt, J; Waldron, B. (2010) Bioreactor for glycerol conversion into H<sub>2</sub> by bacterium *Enterobacter aerogenes*. **Internation Journal of Hydrogen Energy**, 36: 262-266.
- Maru, B.T.; Bielen, A.A.M; Kengen, S.W.M; Constanti, M.; Medina, F. (2012) Biohydrogen production from glycerol using *Thermotoga* spp. **Energy Procedia**, 29: 300-307.
- Meehan, C.; Bjourson, A.J.; McMullan, G. (2001) *Paenibacillus azoreducens* sp. nov., a synthetic azo dye decolorizing bacterium from industrial wastewater. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 51: 1681-1685.
- Mohan, S.V. (2009) Harnessing of biohydrogen from wasterwater treatment using mixed fermentative consortia: process evaluation towards optimization. **Internation Journal of Hydrogen Energy**, 34: 7460-7474.

- Mohanapriya, C. ; Krishnaveni (2013) Gas chromatography analysis for hydrogen production from *Bacillus subtilis* MKMP 2013. **International Journal of Chemical and Analytical Science** (on-line).
- Moparthi, V.K.; Kumar, B.; Mathiesen, C.; Hägerhäll, C. (2011) Homologous protein subunit from *Escherichia coli* NADH quinone oxidoreductase can functionally replace MrpA and MrpD in *Bacillus subtilis*. **Bioenergetics**, 1807: 427-436.
- Moraes, L.M; Paula Júnior, D.R. (2004) Avaliação da Biodegradabilidade anaeróbia de resíduos da Bovinocultura e da suinocultura. **Engenharia Agrícola**, 2: 445-454.
- Mota, C.J.A; Silva, C.X.A; Gonçalves, V.L.C. (2009) Gliceroquímica: Novos produtos e processos a partir da glicerina de produção do biodiesel. **Química Nova**, vol. 32, nº3, 639-648.
- Nemec, A.; Musílek, M.; Maixnerova, M.; Baere, T.; Reijden, T.J.K.; Vanechoutte, M.; Dijkshoorn, L. (2009) *Acinetobacter beijerinckii* sp. nov. and *Acinetobacter gyllenbergii* sp. nov. haemolytic organisms isolated from humans. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 59: 118–124.
- Neves, L.M.V. (2009) Produção de biohidrogénio por bactérias a partir de resíduos fermentescíveis. **Dissertação do curso de pós-graduação (Mestrado em Engenharia Química e Bioquímica)** – Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa. Lisboa, Portugal.

- Ngo, T.A. ; Sim, S. J. (2012) Dark Fermentation of Hydrogen from Waste Glycerol Using Hyperthermophilic Eubacterium *Thermotoga neapolitana*. **Environmental Progress & Sustainable Energy**, vol. 31, n°3: 466-473.
- Nielsen, A.T.; Liu, W.T.; Filipe, C.; Grady L.; Molins, S.; Stahl, D.A. (1999) Identificacion of a novel group of bacteria in sludge from a deteriorated biological phosphorus removal reactor. **Applied an Environmental Microbiology**, 65:1251-1258.
- O’Gara, J.; Humphreys, H. (2001) *Staphylococcus epidermidis* biofilms: importance and implications. **Journal of Medical Microbiology**, 50: 582- 587.
- Pendyala, B.; Chaganti, S.R.; Lalman, J.A.; Shanmungam, S.R.; Heath, D.D.; Lau, P.C.K. (2012) Pretreating mixed anaerobic communities from different sources: Correlating the hydrogen yield with hydrogenase activity and microbial diversity. **International Journal of Hydrogen Energy**, 37: 12175-12186.
- Pinhati, F.R (2008) Caracterização molecular da poluição microbiana do lodo de refinaria de petróleo por PCR-DGGE e RAPD. **Dissertação do curso de pós- graduação ( Mestrado em Bioquímica)** – Instituto de Bioquímica, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, Brasil.
- Pirt, S.J. ; Callow, D.S. (1958). Production of 2,3-butanediol by *Aerobacter aerogenes* in a single stage process. **Journal of Applied Bacteriology**, 21: 188-205.
- Plá, J.A. (2002) Perspectivas do biodiesel no Brasil. **Indicadores econômicos**, v.30, n.2: 179-190.

- Poestsh, P.B.; Koetz, P.R (1998) Sistema de determinação da atividade metanogênica específica de lodos anaeróbios. **Revista Brasileira de Agrociências**, 3: 161-165.
- Ponezi, S.N.; Duarte, M.C.; Coraucci Filho, B.; Figueiredo, R.F. (2005) Análise de biodegradação dos componentes do óleo cítrico CG/EM e análise da população microbiana de um reator de lodo ativado no tratamento de água residuária de uma indústria cítrica. **Engenharia Sanitária Ambiental**, 4: 278-284.
- Quispe, C.A.G.; Coronado, C.J.R.; Carvalho Jr., J.A. (2013) Glycerol: Production, consumption, prices, characterization and new trends in combustion. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 27: 475-493.
- Reungsang, A.; Sittijunda, S., O-thong, S. (2013) Bio-hydrogen production from glycerol by immobilized *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 on heat-treated UASB granules as affected by organic loading rate. **International Journal of Hydrogen Energy**, 38: 6970-6979.
- Rivaldi, J.D; Sarroub, B.F.; Fiorilo, R.; Silva, S.S.(2007) Glicerol e biodiesel: Estratégias biotecnológicas para o aproveitamento do glicerol gerado da produção de biodisel. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**- n° 37.
- Rossi, D.M.; Costa, J.B.; Souza, E.A.; Peralba, M.C.; Samios, D.; Ayub, M.A. (2011) Comparison of different pretreatment methods for hydrogen production using environmental microbial consortia on residual glycerol from biodiesel. **International Journal of Hydrogen Energy**, 36: 4814-4819.

- Sabaratman, V.; Ali Hassan, M. (2012) Biohydrogen Production via Fermentation of Biowastes by Microorganism. **State of the art and Progress in Production of Biohydrogen**. Betham e Books , 112-126.
- Sambrook, J.; Russel, D.W. (2001). **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Harbor, New York, 3 ed.
- Sanchez- Torres, V.; Yusoff, M.Z.N.; Nakano, C.; Maeda, T.; Ogawa, H.I.; Wood, T. K. (2013) Influence of *Escherichia coli* hydrogenases on hydrogen fermentation from glycerol. **International Journal of Hydrogen Energy**, 38: 3905-3912.
- Sandalci, T.; Karagöz (2014). Experimental investigation of the combustion characteristics, emissions and performance of hydrogen port fuel injection in a diesel engine. **International Journal of Hydrogen Energy**, 39: 18480-18489.
- Santaella, S.T.; Silva Júnior, F.C.G.; Gadelha, D.A.C.; Costa, K.O.; Aguiar, R.; Arthaud, I.D.B.; Leitão, R.C. (2009) Tratamento de efluentes de refinaria d e petróleo em reatores com *Aspergillus Níger*. **Engenharia Sanitária Ambiental**, 1: 139-148.
- Santos, F.A.C.M.; Santos, F.M.S.M. (2004) Células Combustíveis. **Spectrum Millenium**, pág. 146. Dez-2004 [on-line].

Sarma, S.J.; Brar, S.K.; Sydney, E.B.; Le Bihan, Y.; Buelna, G.; Soccol, C.R. (2012) Microbial hydrogen production by bioconversion of crude glycerol: a review. **International Journal of Hydrogen Energy**, 37: 6473-6490.

Sarma, S.J.; Brar, S.K.; Bihan, Y.L.; Buelna, G.; Soccol, C. R. (2014) Mitigation of the inhibitory effect of soap by magnesium salt treatment of crude glycerol – A novel approach for enhanced biohydrogen production from the biodiesel industry waste. **Bioresour Technol**, 151: 49-53.

Schleifer, K.H. (2009) Pylum XIII *Firmicutes* Gibbons and Murray 1978, 5 (*Firmicutes* [sic] Gibbons and Murray 1978,5). In: De Vos, P.; Garrity, G.M.; Jones, D.; Krieg, N.R., Ludwig, W.; Rainey, F.A., Schleifer, K.H.; Whitman, W.B. (Eds), **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology** – Volume Three- The *Firmicutes*, second ed., Springer, New York, p.19.

Selembo, P.A.; Perez, J.M.; Lloyd, W.A.; Logan, B.E. (2009) High hydrogen production from glycerol or glucose by electrohydrogenesis using microbial electrolysis cells. **International Journal of Hydrogen Energy** 34: 5373-5381.

Sena Oliveira, M.C.; Reginato, L.C.; Roese, A.D.; Anthonisen, D.G.; Patrocínio, E.; Parma, M.M.; Scagliusi, S.M.M.; Timóteo, W.H.; Jardim, S.N. (2007) Fundamentos teórico-prático e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio de reação em cadeia polimerase [recurso eletrônico]. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2007.

- Shin, J.H.; Yoon, J.H.; Ahn, E.K.; Kim, M.S.; Sim, S.J.; Park, T.H. (2007) Fermentative hydrogen production by the newly isolated *Enterobacter asburiae* SNU-1. **International Journal of Hydrogen Energy**, 32: 192-199.
- Silveira, E.L. (2004) Identificação de comunidades bacterianas de solo por sequenciamento do gene 16S rRNA. **Dissertação do curso de pós – graduação (Mestrado em Microbiologia)** – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista. São Paulo, Brasil
- Sinha, P. ; Pandey, A. (2014) Biohydrogen production from various feedstocks by *Bacillus firmus* NMBL -03. **International Journal of Hydrogen Energy**, 39: 7518-7525.
- Sittijunda, S. ; Reungsang, A. (2012) Media optimization for biohydrogen production from waste glycerol by anaerobic thermophilic mixed cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**, 20: 15473-15482.
- Song, Z.X.; Li, W.W.; Li, X.H.; Dai, Y.; Peng, X.X; Fan, Y.T.; Hou, H.W. (2013) Isolation and characterization of a new hydrogen-producing strains *Bacillus* sp. FS2011. **International Journal of Hydrogen Energy**, 38: 3206-3212.
- Souza, A.L.F.; Brusamarello, L.C.C.(2009) Sequenciamento de DNA: decifrando o manual de instruções dos seres vivo. **Genética na escola**, 03: 45-52.
- Stallivieri, V.; Pelizzaro, K.; Poleto, L.; Magrini, F.E.; Paesi, S.O. (2014) Produção de gás hidrogênio por *Brevebacterium halotolerans* em condições de salinidade. 1º Congresso Latino Americano de Bio-Hidrogênio. **Resumo [on-line]**. São Carlos- SP-Brasil.



Standard Methods For Examination of Water and Wastewater, 22 nd Edition, APHA, 2012.

Tanksale, A.; Beltramini, J. N.; Lu, G. M. (2010) A Review of Catalytic Hydrogen Production Processes from Biomass. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** , 14, pp. 166-182.

Temudo, M.F.; Poldermans, R.; Kleerebezem, R.; Van Loosdrecht, M.C.M. (2008) Glycerol Fermentation by (Open) Mixed Cultures: A Chemostat Study. **Biotechnology and Bioengineering**, 6: 1088-1098.

Tetteh, G.L.; Beuchat, L.R. (2003) Exposure of *Shigella flexneri* to acid stress and heat shock enhances acid tolerance. **Food Microbiology**, 20: 179-185.

Tosetto, M.G.; Andrietta, S.R. (2003) Cinética de produção de glicerol em processo de fermentação alcoólica utilizando diferentes matérias primas industriais. In: Simpósio Nacional de Fermentações. Florianópolis. **Anais do 14<sup>o</sup>SINAFERM**. Florianópolis.CD-ROM.

Trchounian, R. & Trchounian, A. (2014) Hydrogen producing activity by *Escherichia coli* hydrogenase 4 (hyf) depend on glucose concentration. **International Journal of Hydrogen Energy**, 39: 16914-16918.

Tsygankov, A.A. ; Tekucheva, D.N. (2012) Integration of Biological H<sub>2</sub> Producing Process. **State of the art and Progress in Production of Biohydrogen**. Betham e Books , 78-93.

Umpierre, A.P.; Machado, F. (2013) Gliceroquímica a valorização do glicerol. **Revista Virtual de Química**, 5: 106-116.

Varrone, C.; Rosa, S.; Fiocchetti, F.; Giussani, B.; Izzo, G.; Massini, G.; Marone, A.; Signorini, A.; Wang, A. (2013) Enrichment of activated sludge for enhanced hydrogen production from crude glycerol. **International Journal of Hydrogen Energy**, 38: 1319-1331.

Vasconcelos de Sá, L.R.; Cammarota, M.C.; Oliveira, T.C.; Oliveira, E.M.M.; Matos, A.; Ferreira-Leitão, V.S. (2013) Pentoses, hexoses and glycerol as substrates for biohydrogen production: An approach for Brazilian biofuel integration. **International Journal of Hydrogen Energy**, 38: 2986-2997.

Vignais, P.M.; Billoud, B.; Meyer, J. (2001) Classification and phylogeny of hydrogenases. **Microbiology Reviews**, 25: 455-501.

Vignais, P.M.; Colbeau, A. (2004) Molecular Biology of Microbial Hydrogenases. **Current Issues in Molecular Biology**, 6: 159-188.

Vignais, P.M. ; Billoud, B. (2007) Occurrence, Classification, and Biological Function of Hydrogenases: An Overview. **Chemical Reviews**, 107: 4206-4272.

Vivan, M.V.; Kunz, A.; Stolberg, J.; Perdomo, C.; Techio, V.H. (2010) Eficiência da interação biodigestor e lagos de estabilização na remoção de poluentes em dejetos de

suínos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. Vol.14, n°3. [recurso on-line].

Xiao, B., Han; Y., Liu, J. (2010) Evaluation of biohydrogen production from glucose and protein at neutral initial pH. **International Journal of Hydrogen Energy**, 35: 6152-6160.

Wagner, A.M. ; Cloete, E. (2002) 16S rRNA sequence analysis of bacteria present in forming activated sludge. **Systematic and Applied Microbiology**, 25: 434-439.

Wang, X.; Jin, B.; Mulcahy, B. (2008) Impact of carbon and nitrogen sources on hydrogen production by newly isolated *Clostridium butyricum* W5. **International Journal of Hydrogen Energy**, 33: 4998-5005.

Wang, Y. ; Qian, P.Y. (2009) Conservative Fragments in Bacterial 16S rRNA Genes and Primer Design for 16S Ribosomal DNA Amplicons in Metagenomic Studies. **Plos one**, vol.4: 1-9.

Wang, J.; Wan, W.(2009) Factors influencing fermentative hydrogen production: a review. **International Journal of Hydrogen Energy**, 34, 799-811.

Wang. H.; Wang, J.; Fang, Z; Wang, X.; Bu, H.(2010) Enhanced bio-hydrogen production by anaerobic fermentation of apple pomace with enzyme hydrolysis. **International Journal of Hydrogen Energy** 35: 8303-8309.

- Wesley, E.; Scheleifer, K.; Scheleifer, K (1975) Isolation and characterization of *Staphylococci* from Human Skin. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 25: 62-75.
- Wong, C.L.; Huang, C.C.; Chen, W.M.; Chong, J.S. (2012) Producing 2,3-butanediol from agricultural waste using and indigenous *Klebsiella* sp. Zmd 30 strain. **Biochemical Engineering Journal**, 69:32-40.
- Wu, K. J., Lin, Y. H., Lo, Y. C., Chen, C. Y., Chen, W. M., Chang, J. S. (2011) Converting glycerol into hydrogen, ethanol, and diols with a *Klebsiella* sp. HE1 strain via anaerobic fermentation. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, 42: 20-25.
- Yasin, N.H.M.; Mumtaz, T.; Hassan, M.A.; Rahman, N.A. (2013) Food waste and food processing waste for biohydrogen production: A review. **Journal of Environmental Management**, 130: 375-385.
- Zhang, C.; Ma, K.; Xing, X.H (2009) Regulation of hydrogen production by *Enterobacter aerogenes* by external NADH and NAD. **International Journal of Hydrogen Energy**, 34: 1226-1232
- Zhang, K.; Ren, N.; Guo, C.; Wang, A.; Cao, G. (2011) Effects of various pretreatment methods on mixed microflora to enhance biohydrogen production from corn stover hydrolysate. **Journal of Environmental Sciences**, 23(12): 1929-1936.

**ANEXOS**

## Anexo A - Cromatogramas para verificação da produção de gás hidrogênio pelos microrganismos isolados.

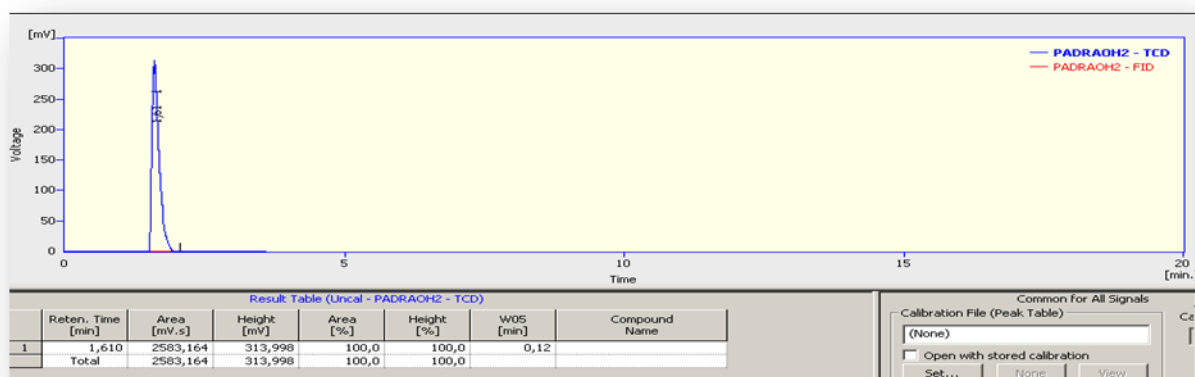


Figura A.1: Cromatografia gasosa padrão para gás hidrogênio.

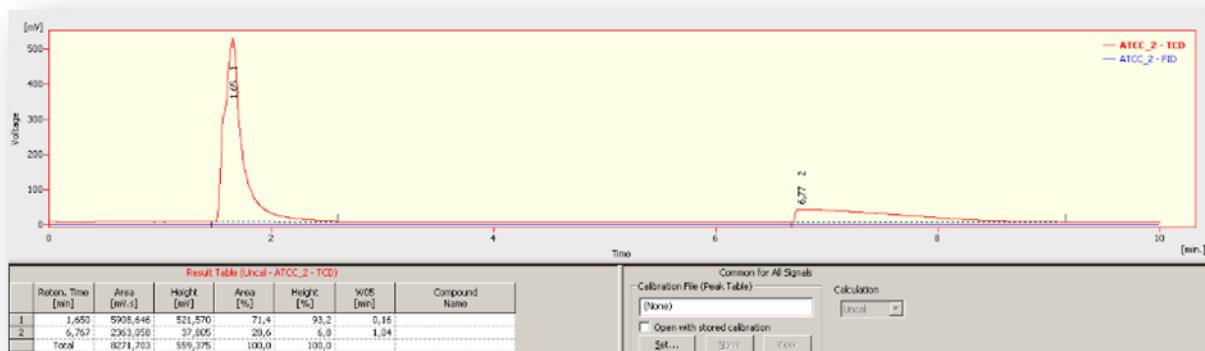


Figura A.2: Análise cromatográfica da produção de hidrogênio com inóculo de *Enterobacter aerogenes*.

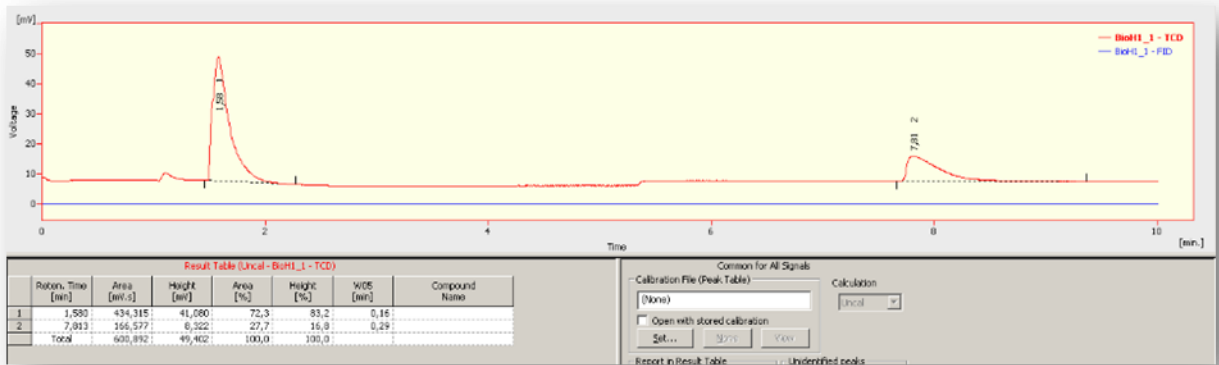


Figura A. 3: Análise cromatográfica da produção de hidrogênio com inóculo *Enterobacter ludwigii*.

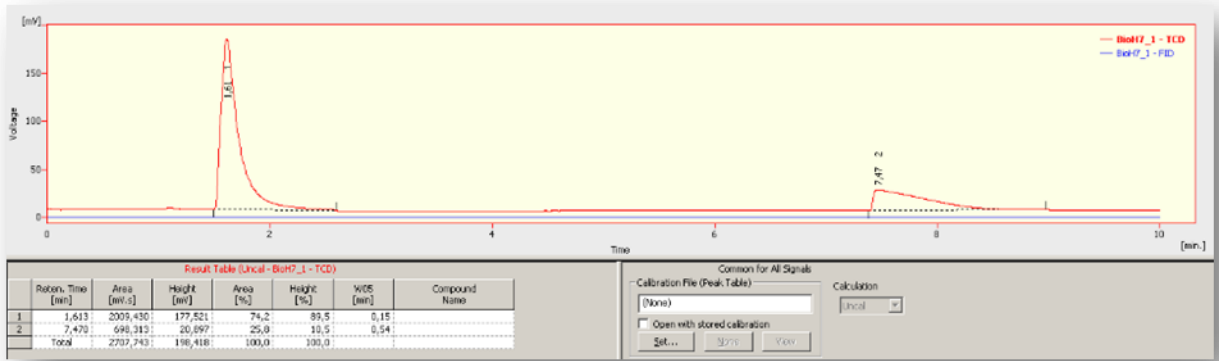


Figura A.4: Análise cromatográfica da produção de hidrogênio com inóculo *Shigella sonnei*.

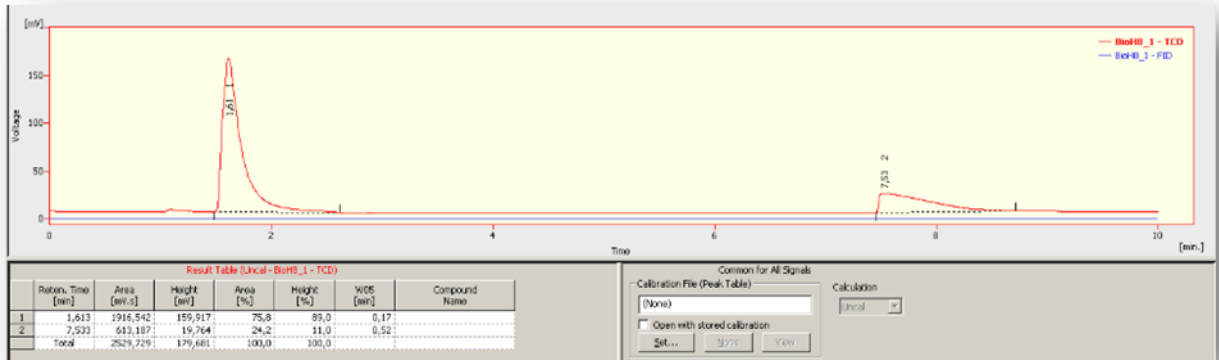


Figura A.5: Análise cromatográfica da produção de hidrogênio com inóculo *Bacillus licheniformis*.

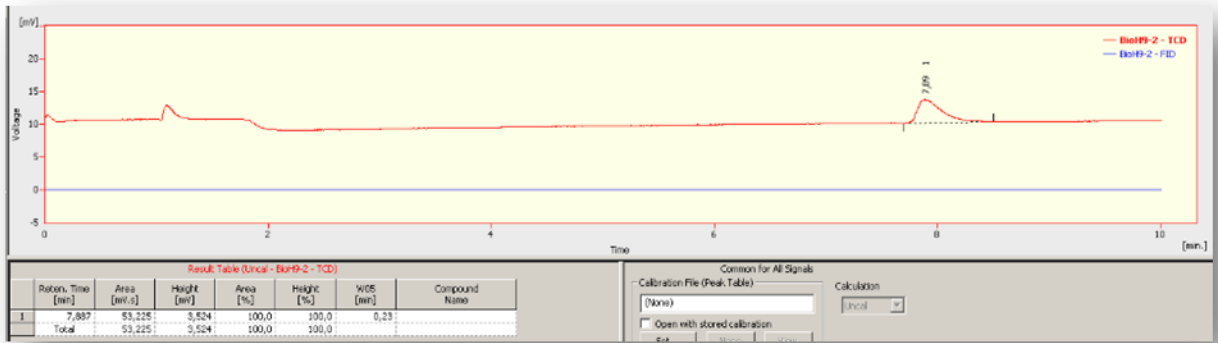


Figura A.6: Análise cromatográfica da produção de hidrogênio com inóculo *Shigella flexneri*.

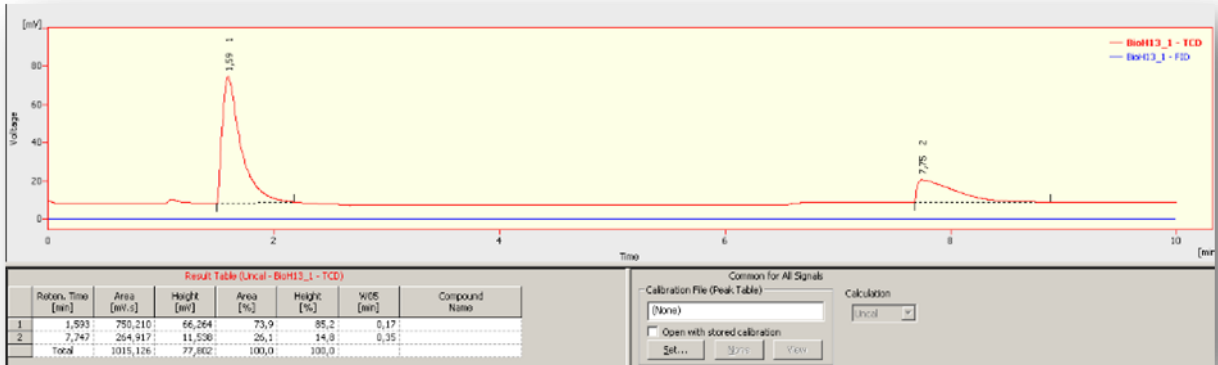


Figura A.7: Análise cromatográfica da produção de hidrogênio com inóculo *Bacillus amyloliquefaciens*.

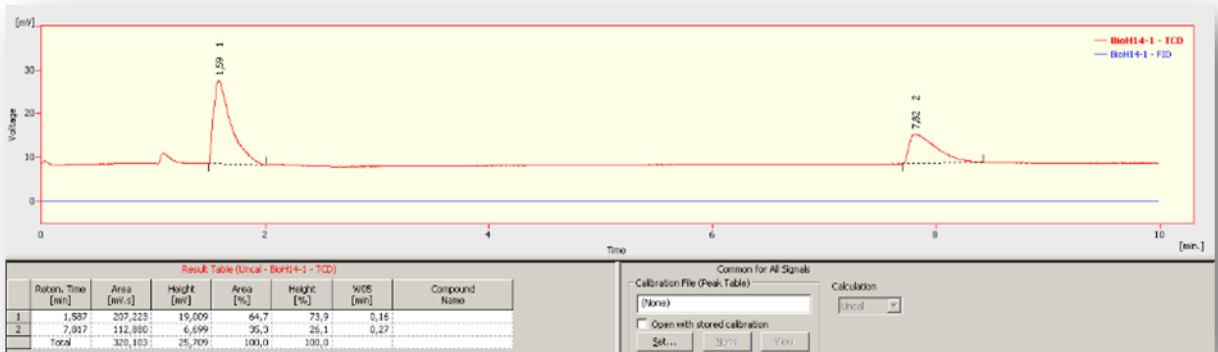


Figura A.8: Análise cromatográfica da produção de hidrogênio com inóculo *Staphylococcus warneri*.



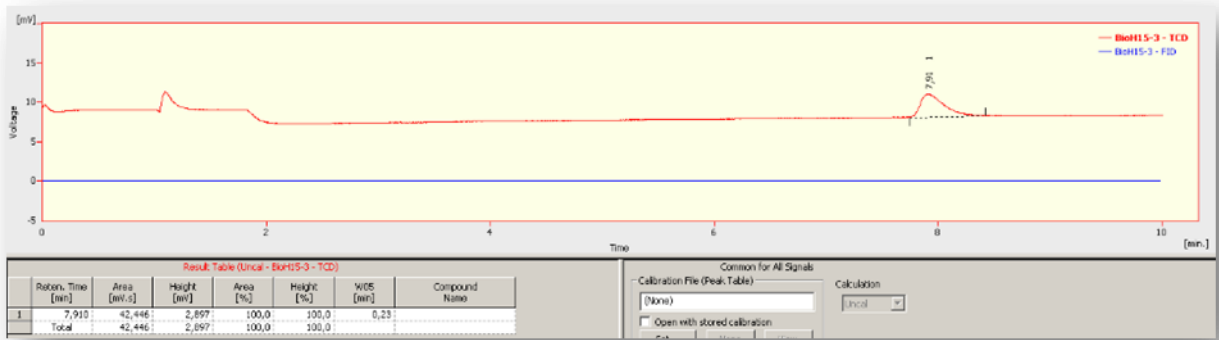


Figura A.9: Análise cromatográfica da produção de hidrogênio com inóculo *Acinetobacter gyllenbergii*.

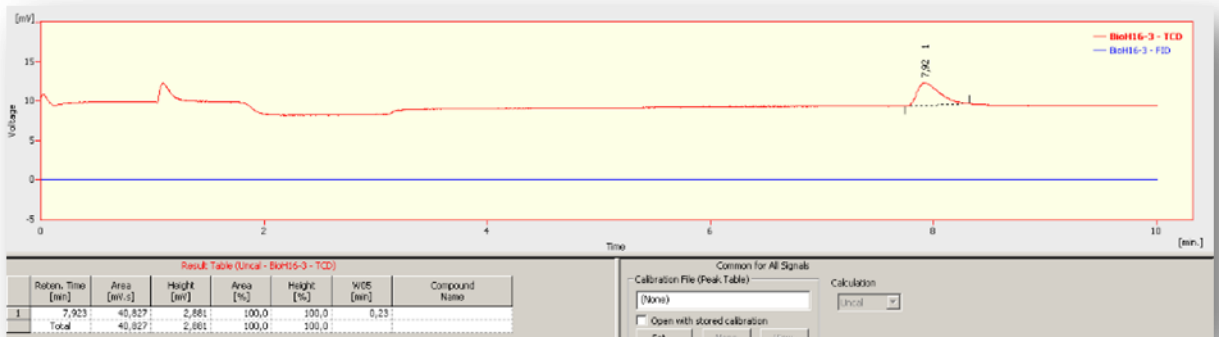


Figura A.10: Análise cromatográfica da produção de hidrogênio com inóculo *Lysinibacillus sphaericus*.

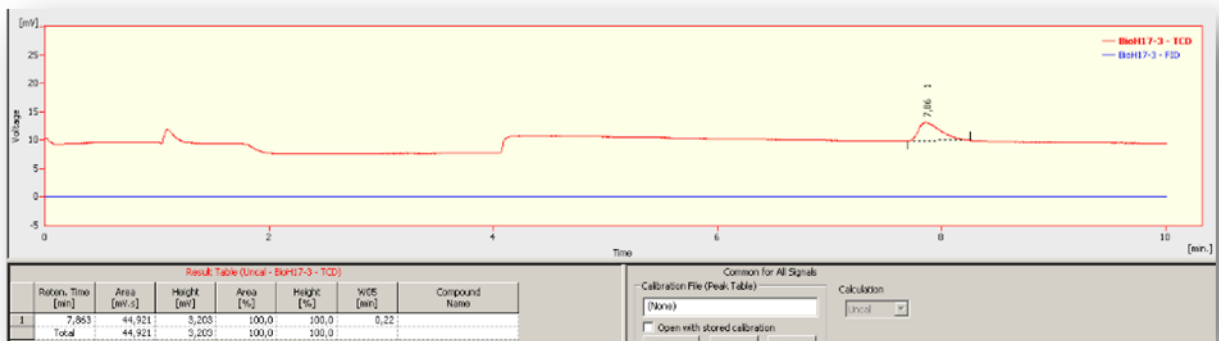


Figura A.11: Análise cromatográfica da produção de hidrogênio com inóculo células *Staphylococcus epidermidis*.

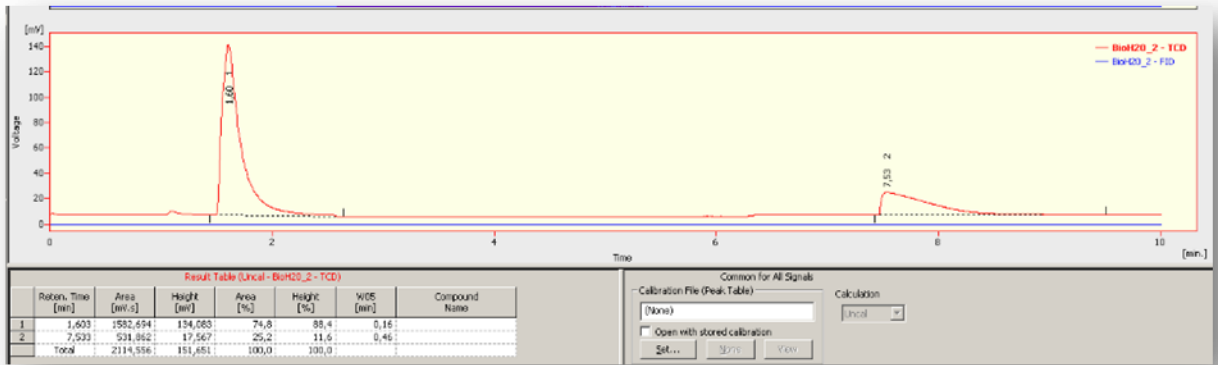


Figura A.12: Análise cromatográfica da produção de hidrogênio com inóculo *Bacillus subtilis*.

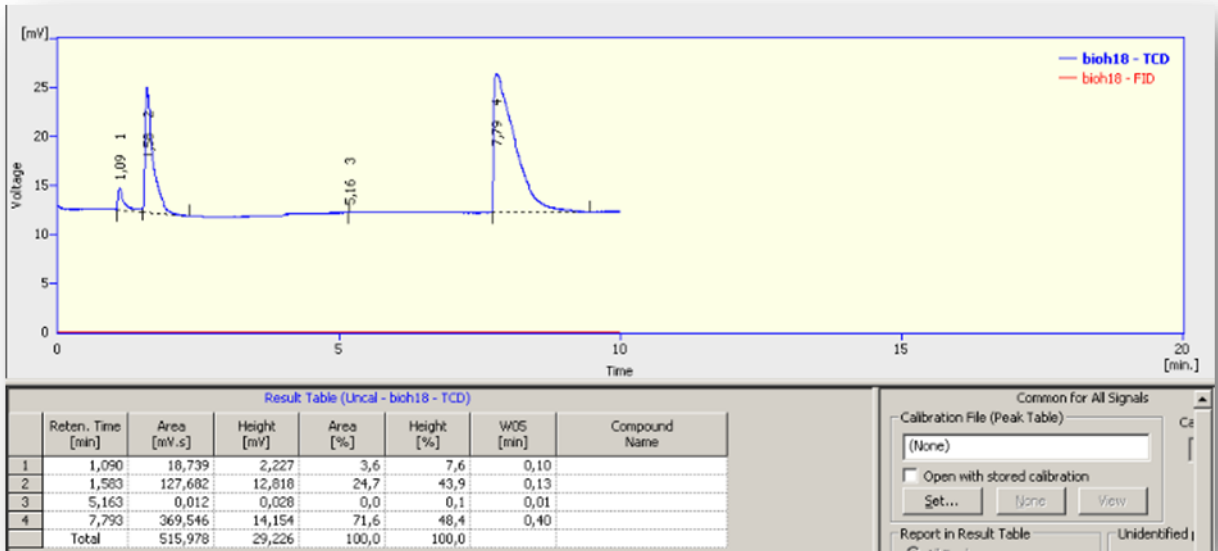


Figura A.13: Análise cromatográfica da produção de hidrogênio com inóculo *Alcaligenes faecalis*.

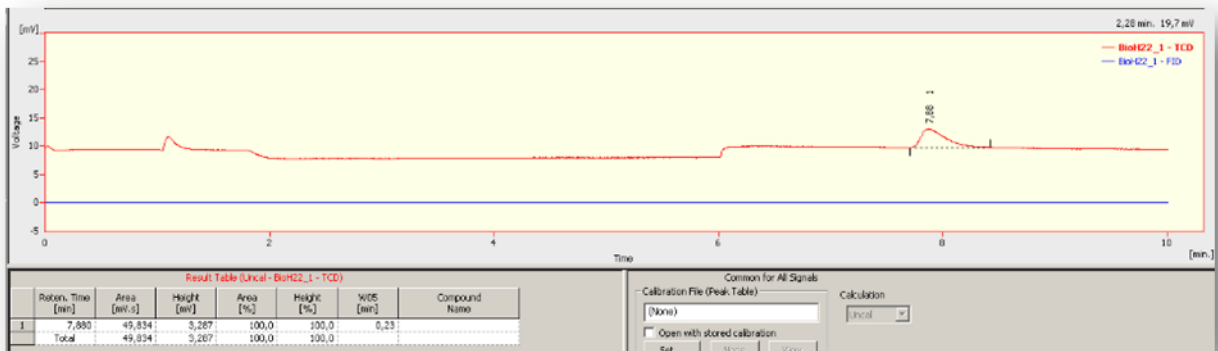


Figura A.14: Análise cromatográfica da produção de hidrogênio com inóculo *Paenibacillus azoreducens*.

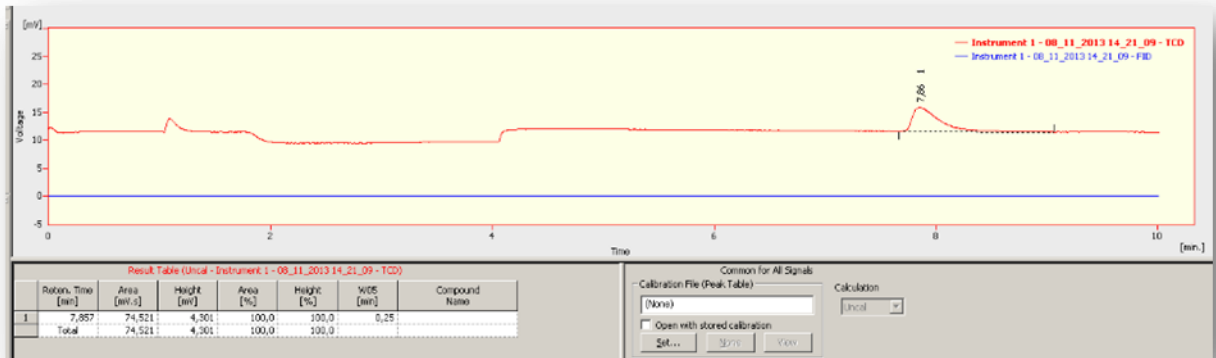


Figura A.15: Análise cromatográfica da produção de hidrogênio com inóculo *Paenibacillus cooki*.

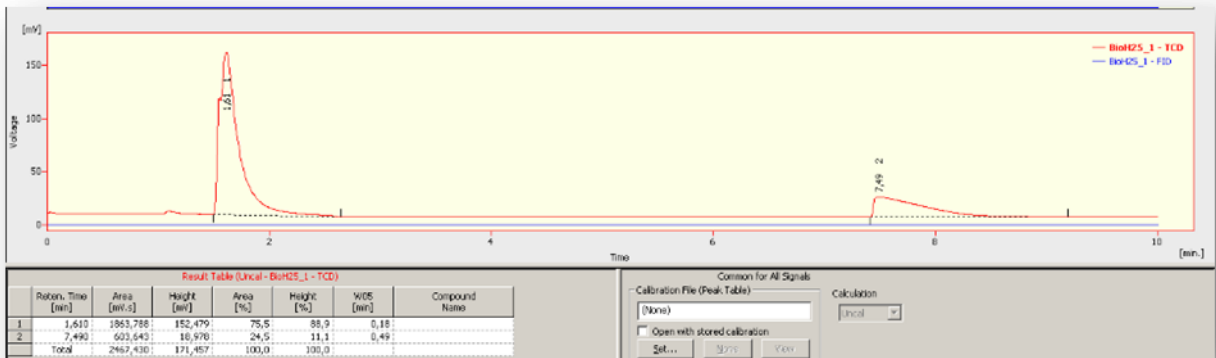


Figura A.16: Análise cromatográfica da produção de hidrogênio com inóculo células *Bacillus atropheus*.

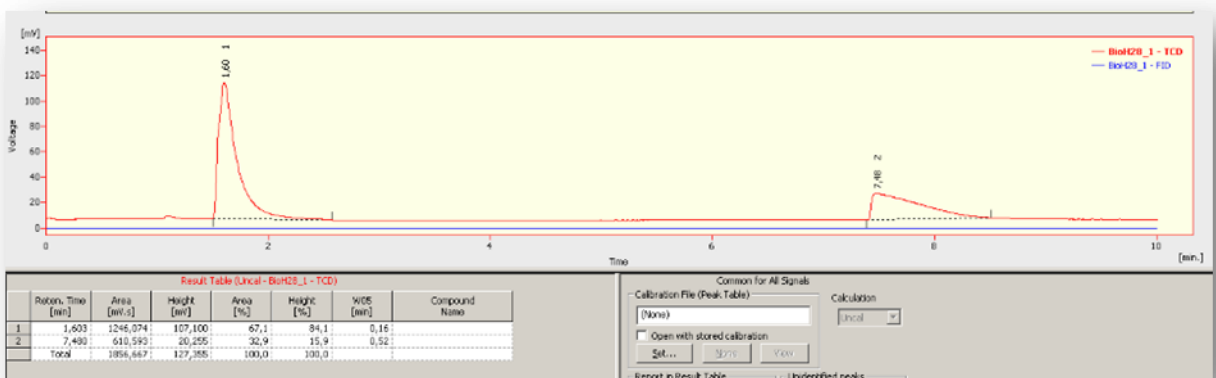


Figura A.17: Análise cromatográfica da produção de hidrogênio com inóculo *Citrobacter freundii*.

## Anexo B- Resultados do *BLAST*

**Tabela B.1.** Análise das sequências do operon Gene hyc, resultados da análise de proteínas do gene HycC, através de *BLAST* (All).

<b>Microrganismo isolado</b>	<b>Microorganismo</b>	<b>Similar. (%)</b>	<b>Proteína similar</b>	<b>Função</b>	<b>E-value</b>
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42	<i>Citrobacter rodentium</i> ICC168	32	mrpA	Monovalent cation/H+ antiporter subunit A	2,00E-12
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	<i>Citrobacter rodentium</i> ICC168	30	mrpA	Monovalent cation/H+ antiporter subunit A	1,00E-10
<i>Bacillus atrophaeus</i> 1942	<i>Citrobacter rodentium</i> ICC168	30	mrpA	Monovalent cation/H+ antiporter subunit A	1,00E-09
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	<i>Citrobacter turicensis</i> z3032	30	mrpA	Monovalent cation/H+ antiporter subunit A	4,00E-16
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	<i>Citrobacter turicensis</i> z3032	31	mrpD	Monovalent cation/H+ antiporter subunit D	5,00E-06
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42	<i>Citrobacter turicensis</i> z3032	31,6	mrpD	Monovalent cation/H+ antiporter subunit D	5,00E-06
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42	<i>Citrobacter turicensis</i> z3032	30	mrpA	Monovalent cation/H+ antiporter subunit A	2,00E-18
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	<i>Dehalococcoides</i> CBDB1	31	mrpA	Monovalent cation/H+ antiporter subunit A	2,00E-34
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	<i>Dehalococcoides</i> CBDB1	26,5	mrpD	Monovalent cation/H+ antiporter subunit D	1,00E-23
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42	<i>Dehalococcoides</i> CBDB1	31	mrpA	Monovalent cation/H+ antiporter subunit A	6,00E-23
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42	<i>Dehalococcoides</i> CBDB1	29	mrpD	Monovalent cation/H+ antiporter subunit D	6,00E-23

<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42	<i>Dehalococcoides</i> VS	32	mrpA	Monovalent cation/H+ antiporter subunit A	6,00E-34
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	<i>Dehalococcoides</i> VS	25,8	mrpD	Monovalent cation/H+ antiporter subunit D	2,00E-24
<i>Bacillus atrophaeus</i> 1942	<i>Dehalococcoides</i> VS	33,7	mrpA	Monovalent cation/H+ antiporter subunit A	9,00E-34
<i>Bacillus atrophaeus</i> 1942	<i>Dehalococcoides</i> VS	25	mrpD	Monovalent cation/H+ antiporter subunit D	1,00E-22
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	<i>Enterobacter cloacae</i> Ecwsu1	27,8	mrpA	Monovalent cation/H+ antiporter subunit A	7,00E-20
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	<i>Enterobacter cloacae</i> Ecwsu1	28,6	mrpD	Monovalent cation/H+ antiporter subunit D	7,00E-22
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42	<i>Enterobacter cloacae</i> Ecwsu1	29,2	mrpA	Monovalent cation/H+ antiporter subunit A	2,00E-22
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42	<i>Enterobacter cloacae</i> Ecwsu1	29,3	mrpD	Monovalent cation/H+ antiporter subunit D	3,00E-14
<i>Bacillus atrophaeus</i> 1942	<i>Escherichia coli</i> 55989	29,3	mrpA	Monovalent cation/H+ antiporter subunit A	1,00E-12
<i>Bacillus atrophaeus</i> 1942	<i>Escherichia coli</i> 55989	24,3	mrpD	Monovalent cation/H+ antiporter subunit D	9,00E-07
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	<i>Escherichia coli</i> APECO1	27,7	mrpA	Monovalent cation/H+ antiporter subunit A	1,00E-13
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	<i>Escherichia coli</i> APECO1	24,4	mrpD	Monovalent cation/H+ antiporter subunit D	3,00E-07
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42	<i>Escherichia coli</i> APECO1	25,7	mrpA	Monovalent cation/H+ antiporter subunit A	8,00E-16
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Escherichia coli</i> APECO1	25	mrpD	Monovalent cation/H+ antiporter subunit D	2,00E-07

FZB42

<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	<i>Escherichia coli</i> BREL606	24,5	mrpA	Monovalent cation/H+ antiporter subunit A	2,00E-13
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	<i>Escherichia coli</i> BREL606	24,5	mrpD	Monovalent cation/H+ antiporter subunit D	4,00E-07
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42	<i>Escherichia coli</i> BREL606	25,7	mrpA	Monovalent cation/H+ antiporter subunit A	8,00E-16
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42	<i>Escherichia coli</i> BREL606	25	mrpD	Monovalent cation/H+ antiporter subunit D	2,00E-07
<i>Bacillus atrophaeus</i> 1942	<i>Escherichia coli</i> BREL606	29,3	mrpA	Monovalent cation/H+ antiporter subunit A	1,00E-12
<i>Bacillus atrophaeus</i> 1942	<i>Escherichia coli</i> BREL606	24,3	mrpD	Monovalent cation/H+ antiporter subunit D	7,00E-07
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	<i>Escherichia coli</i> BW2952	24,5	mrpA	Monovalent cation/H+ antiporter subunit A	2,00E-13
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	<i>Escherichia coli</i> BW2952	27,7	mrpD	Monovalent cation/H+ antiporter subunit D	3,00E-07
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42	<i>Escherichia coli</i> BW2952	25,7	mrpA	Monovalent cation/H+ antiporter subunit A	1,00E-15
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42	<i>Escherichia coli</i> BW2952	25	mrpD	Monovalent cation/H+ antiporter subunit D	3,00E-07
<i>Bacillus atrophaeus</i> 1942	<i>Escherichia coli</i> BW2952	29,3	mrpA	Monovalent cation/H+ antiporter subunit A	2,00E-12
<i>Bacillus atrophaeus</i> 1942	<i>Escherichia coli</i> BW2952	24,3	mrpD	Monovalent cation/H+ antiporter subunit D	6,00E-07
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	<i>Escherichia coli</i> CFT073	28,4	mrpA	Monovalent cation/H+ antiporter subunit A	2,00E-14
<i>Bacillus</i>	<i>Escherichia coli</i>	24,7	mrpD	Monovalent cation/H+	3,00E-07

<i>licheniformis</i> ATCC 14580	CFT073				antiporter subunit D	
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42	<i>Escherichia coli</i> E24377A	25,7	mrpA		Monovalent cation/H+ antiporter subunit A	1,00E-15
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42	<i>Escherichia coli</i> E24377A	25	mrpD		Monovalent cation/H+ antiporter subunit D	3,00E-07
<i>Bacillus atrophaeus</i> 1942	<i>Escherichia coli</i> E24377A	29,3	mrpA		Monovalent cation/H+ antiporter subunit A	2,00E-12
<i>Bacillus atrophaeus</i> 1942	<i>Escherichia coli</i> E24377A	24,3	mrpD		Monovalent cation/H+ antiporter subunit D	9,00E-07
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	<i>Escherichia coli</i> ED1a	27,7	mrpA		Monovalent cation/H+ antiporter subunit A	2,00E-13
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	<i>Escherichia coli</i> ED1a	24,4	mrpD		Monovalent cation/H+ antiporter subunit D	4,00E-07
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	<i>Escherichia coli</i> HS	27,7	mrpA		Monovalent cation/H+ antiporter subunit A	2,00E-13
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	<i>Escherichia coli</i> HS	24,4	mrpD		Monovalent cation/H+ antiporter subunit D	4,00E-07
<i>Bacillus atrophaeus</i> 1942	<i>Escherichia coli</i> HS	29,3	mrpA		Monovalent cation/H+ antiporter subunit A	1,00E-12
<i>Bacillus atrophaeus</i> 1942	<i>Escherichia coli</i> HS	24,3	mrpD		Monovalent cation/H+ antiporter subunit D	7,00E-07
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	<i>Escherichia coli</i> K12	27,7	mrpA		Monovalent cation/H+ antiporter subunit A	2,00E-13
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	<i>Escherichia coli</i> K12	24,4	mrpD		Monovalent cation/H+ antiporter subunit D	3,00E-07
<i>Bacillus atrophaeus</i> 1942	<i>Escherichia coli</i> O26	29,3	mrpA		Monovalent cation/H+ antiporter subunit A	1,00E-12
<i>Bacillus atrophaeus</i> 1942	<i>Escherichia coli</i> O26	24,3	mrpD		Monovalent cation/H+ antiporter subunit D	7,00E-07
<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Escherichia coli</i> O55	27,7	mrpA		Monovalent cation/H+	9,00E-14

ATCC 14580					antiporter subunit A	
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	<i>Escherichia coli</i> O55	<i>coli</i>	24,7	mrpD	Monovalent cation/H+ antiporter subunit D	2,00E-07
<i>Bacillus atrophaeus</i> 1942	<i>Escherichia coli</i> O103	<i>coli</i>	29,3	mrpA	Monovalent cation/H+ antiporter subunit A	2,00E-12
<i>Bacillus atrophaeus</i> 1942	<i>Escherichia coli</i> O103	<i>coli</i>	24,3	mrpD	Monovalent cation/H+ antiporter subunit D	9,00E-07
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	<i>Escherichia coli</i> O111	<i>coli</i>	27,7	mrpA	Monovalent cation/H+ antiporter subunit A	2,00E-13
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	<i>Escherichia coli</i> O111	<i>coli</i>	24,4	mrpD	Monovalent cation/H+ antiporter subunit D	3,00E-07
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	<i>Escherichia coli</i> O127	<i>coli</i>	29,7	mrpA	Monovalent cation/H+ antiporter subunit A	4,00E-13
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	<i>Escherichia coli</i> O127	<i>coli</i>	24,4	mrpD	Monovalent cation/H+ antiporter subunit D	4,00E-07
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42	<i>Escherichia coli</i> O127	<i>coli</i>	25,7	mrpA	Monovalent cation/H+ antiporter subunit A	2,00E-07
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42	<i>Escherichia coli</i> O127	<i>coli</i>	25	mrpD	Monovalent cation/H+ antiporter subunit D	8,00E-11
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	<i>Escherichia coli</i> O157	<i>coli</i>	27,7	mrpA	Monovalent cation/H+ antiporter subunit A	1,00E-13
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	<i>Escherichia coli</i> O157	<i>coli</i>	24,7	mrpD	Monovalent cation/H+ antiporter subunit D	2,00E-07
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	<i>Escherichia coli</i> S88	<i>coli</i>	27,7	mrpA	Monovalent cation/H+ antiporter subunit A	1,00E-13
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	<i>Escherichia coli</i> S88	<i>coli</i>	24,7	mrpD	Monovalent cation/H+ antiporter subunit D	3,00E-07
<i>Bacillus atrophaeus</i> 1942	<i>Escherichia coli</i> S88	<i>coli</i>	29,4	mrpA	Monovalent cation/H+ antiporter subunit A	1,00E-12



<i>Bacillus atrophaeus</i> 1942	<i>Escherichia coli</i> S88	23,4	mrpD	Monovalent cation/H+ antiporter subunit D	8,00E-07
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	<i>Escherichia coli</i> SMS	27,7	mrpA	Monovalent cation/H+ antiporter subunit A	1,00E-13
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	<i>Escherichia coli</i> SMS	24,6	mrpD	Monovalent cation/H+ antiporter subunit D	3,00E-07
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42	<i>Escherichia coli</i> SMS	25,7	mrpA	Monovalent cation/H+ antiporter subunit A	1,00E-15
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42	<i>Escherichia coli</i> SMS	25	mrpD	Monovalent cation/H+ antiporter subunit D	3,00E-07
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	<i>Escherichia coli</i> UMN026	27,7	mrpA	Monovalent cation/H+ antiporter subunit A	2,00E-13
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	<i>Escherichia coli</i> UMN026	24,1	mrpD	Monovalent cation/H+ antiporter subunit D	1,00E-06
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42	<i>Escherichia coli</i> UTI89	25,7	mrpA	Monovalent cation/H+ antiporter subunit A	8,00E-16
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42	<i>Escherichia coli</i> UTI89	25,1	mrpD	Monovalent cation/H+ antiporter subunit D	2,00E-07
<i>Bacillus atrophaeus</i> 1942	<i>Escherichia coli</i> UTI89	29,3	mrpA	Monovalent cation/H+ antiporter subunit A	2,00E-10
<i>Bacillus atrophaeus</i> 1942	<i>Escherichia coli</i> UTI89	24,3	mrpD	Monovalent cation/H+ antiporter subunit D	1,00E-12

---

**Tabela B.2.** Análise das sequências do operon Gene *hyf*, resultados da análise de proteínas do gene *HyfF*, através de *BLAST* (All

<b>Microrganismo isolado</b>	<b>Microrganismo</b>	<b>Similar. (%)</b>	<b>Proteína similar</b>	<b>Função</b>	<b>E-value</b>
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> ATCC 23270	25,4	mrpA	monovalent cation/H <sup>+</sup> antiporter subunit A	6,00E-11
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> ATCC 23270	26,6	mrpD	monovalent cation/H <sup>+</sup> antiporter subunit D	3,00E-10
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> ATCC 23270	26,6	mrpA	monovalent cation/H <sup>+</sup> antiporter subunit A	7,00E-11
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> ATCC 23270	25	mrpD	monovalent cation/H <sup>+</sup> antiporter subunit D	2,00E-09
<i>Bacillus atrophaeus</i> 1942	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> ATCC 23270	26	mrpA	monovalent cation/H <sup>+</sup> antiporter subunit A	2,00E-10
<i>Bacillus atrophaeus</i> 1942	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> ATCC 23270	24	mrpD	monovalent cation/H <sup>+</sup> antiporter subunit D	2,00E-09
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	<i>Aromatoleum aromaticum</i> EbN1	26,8	mrpA	monovalent cation/H <sup>+</sup> antiporter subunit A	2,00E-22
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	<i>Aromatoleum aromaticum</i> EbN1	24,8	mrpD	monovalent cation/H <sup>+</sup> antiporter subunit D	2,00E-20
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	<i>Aromatoleum aromaticum</i> EbN1	30,3	ndhF	NADH dehydrogenase subunit 5	3,00E-10
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	<i>Azospirillum lipoferum</i> 4B	7,1	mrpA	monovalent cation/H <sup>+</sup> antiporter subunit A	5,00E-16
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	<i>Azospirillum lipoferum</i> 4B	23,1	mrpD	monovalent cation/H <sup>+</sup> antiporter subunit D	5,00E-06
<i>Bacillus atrophaeus</i> 1942	<i>Azospirillum lipoferum</i> 4B	26,1	mrpA	monovalent cation/H <sup>+</sup> antiporter subunit A	2,00E-15
<i>Bacillus atrophaeus</i> 1942	<i>Azospirillum lipoferum</i> 4B	25,5	mrpD	monovalent cation/H <sup>+</sup> antiporter subunit D	2,00E-07
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110	26,4	mrpA	monovalent cation/H <sup>+</sup> antiporter subunit A	7,00E-20

<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110	23,8	mrpD	monovalent cation/H <sup>+</sup> antiporter subunit D	7,00E-19
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110	27,5	mrpA	monovalent cation/H <sup>+</sup> antiporter subunit A	4,00E-22
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110	26	mrpD	monovalent cation/H <sup>+</sup> antiporter subunit D	3,00E-17
<i>Bacillus atrophaeus</i> 1942	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110	24,3	mrpA	monovalent cation/H <sup>+</sup> antiporter subunit A	2,00E-19
<i>Bacillus atrophaeus</i> 1942	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110	27,4	mrpD	monovalent cation/H <sup>+</sup> antiporter subunit D	3,00E-19
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	<i>Burkholderia pseudomallei</i> 1710b	26,7	mrpA	monovalent cation/H <sup>+</sup> antiporter subunit A	5,00E-21
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	<i>Burkholderia pseudomallei</i> 1710b	25,5	mrpD	monovalent cation/H <sup>+</sup> antiporter subunit D	4,00E-19
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	<i>Burkholderia pseudomallei</i> 1710b	30,8	ndhF	NADH dehydrogenase subunit 5	5,00E-08
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42	<i>Burkholderia pseudomallei</i> 1710b	27,4	mrpA	monovalent cation/H <sup>+</sup> antiporter subunit A	3,00E-19
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42	<i>Burkholderia pseudomallei</i> 1710b	24,7	mrpD	monovalent cation/H <sup>+</sup> antiporter subunit D	5,00E-17
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	<i>Candidatus Nitrospira defluvii</i>	28,1	mrpA	monovalent cation/H <sup>+</sup> antiporter subunit A	1,00E-12
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	<i>Candidatus Nitrospira defluvii</i>	26,8	mrpD	monovalent cation/H <sup>+</sup> antiporter subunit D	4,00E-11
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42	<i>Candidatus Nitrospira defluvii</i>	25,7	mrpA	monovalent cation/H <sup>+</sup> antiporter subunit A	6,00E-13
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42	<i>Candidatus Nitrospira defluvii</i>	23,9	mrpD	monovalent cation/H <sup>+</sup> antiporter subunit D	4,00E-11
<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Cupriavidus necator</i> N1	24,7	mrpA	monovalent cation/H <sup>+</sup> antiporter subunit A	4,00E-20

ATCC 14580

<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	<i>Cupriavidus necator</i> N1	26,3	mrpD	monovalent cation/H <sup>+</sup> antiporter subunit D	2,00E-16
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	<i>Cupriavidus necator</i> N1	31	ndhF	NADH dehydrogenase subunit 5	4,00E-10
<i>Bacillus atropheus</i> 1942	<i>Cupriavidus necator</i> N1	26,7	mrpA	monovalent cation/H <sup>+</sup> antiporter subunit A	6,00E-21
<i>Bacillus atropheus</i> 1942	<i>Cupriavidus necator</i> N1	24	mrpD	monovalent cation/H <sup>+</sup> antiporter subunit D	3,00E-15
<i>Bacillus atropheus</i> 1942	<i>Cupriavidus necator</i> N1	25,8	ndhF	NADH dehydrogenase subunit 5	2,00E-06
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	<i>Dickeya dadantii</i> 937	27,7	mrpA	monovalent cation/H <sup>+</sup> antiporter subunit A	3,00E-20
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	<i>Dickeya dadantii</i>	24,1	mrpD	monovalent cation/H <sup>+</sup> antiporter subunit D	7,00E-10
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	<i>Escherichia coli</i> 55989	31,5	mrpA	monovalent cation/H <sup>+</sup> antiporter subunit A	1,00E-29
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	<i>Escherichia coli</i> 55989	25,1	mrpD	monovalent cation/H <sup>+</sup> antiporter subunit D	5,00E-13
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	<i>Escherichia coli</i> 55989	35,2	ndhF	NADH dehydrogenase subunit 5	7,00E-06
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42	<i>Escherichia coli</i> BREL606	30,7	mrpA	monovalent cation/H <sup>+</sup> antiporter subunit A	4,00E-08
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42	<i>Escherichia coli</i> BREL606	24,7	mrpD	monovalent cation/H <sup>+</sup> antiporter subunit D	2,00E-26
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	<i>Escherichia coli</i> BREL606	31,5	mrpA	monovalent cation/H <sup>+</sup> antiporter subunit A	1,00E-29
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	<i>Escherichia coli</i> BREL606	24,5	mrpD	monovalent cation/H <sup>+</sup> antiporter subunit D	5,00E-13
<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Escherichia coli</i> BW2952	31,2	mrpA	monovalent cation/H <sup>+</sup> antiporter subunit A	1,00E-29

ATCC 14580

<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	<i>Escherichia coli</i> BW2952	24,5	mrpD	monovalent cation/H+ antiporter subunit D	5,00E-13
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> s FZB42	<i>Escherichia coli</i> IAI1	30,5	mrpA	monovalent cation/H+ antiporter subunit A	2,00E-25
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> s FZB42	<i>Escherichia coli</i> IAI1	24,7	mrpD	monovalent cation/H+ antiporter subunit D	2,00E-13
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	<i>Escherichia coli</i> IAI39	40	mrpA	monovalent cation/H+ antiporter subunit A	5,00E-28
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	<i>Escherichia coli</i> IAI39	25,3	mrpD	monovalent cation/H+ antiporter subunit D	3,00E-11
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> s FZB42	<i>Escherichia coli</i> K12	30,7	mrpA	monovalent cation/H+ antiporter subunit A	2,00E-26
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> s FZB42	<i>Escherichia coli</i> K12	24,7	mrpD	monovalent cation/H+ antiporter subunit D	1,00E-13
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	<i>Escherichia coli</i> K12	31,2	mrpA	monovalent cation/H+ antiporter subunit A	1,00E-29
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	<i>Escherichia coli</i> K12	24,5	mrpD	monovalent cation/H+ antiporter subunit D	5,00E-13
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	<i>Escherichia coli</i> K12	34,6	ndhF	NADH dehydrogenase subunit 5	1,00E-06
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> s FZB42	<i>Escherichia coli</i> O26	30,1	mrpA	monovalent cation/H+ antiporter subunit A	1,00E-25
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> s FZB42	<i>Escherichia coli</i> O26	25	mrpD	monovalent cation/H+ antiporter subunit D	1,00E-13
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	<i>Escherichia coli</i> O26	31.51	mrpA	monovalent cation/H+ antiporter subunit A	9,00E-30
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	<i>Escherichia coli</i> O26	24.57	mrpD	monovalent cation/H+ antiporter subunit D	6,00E-13

<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	<i>Escherichia coli</i> O26	34.62	ndhF	NADH dehydrogenase subunit 5	7,00E-06
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42	<i>Escherichia coli</i> O55	30.77	mrpA	monovalent cation/H <sup>+</sup> antiporter subunit A	3,00E-26
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42	<i>Escherichia coli</i> O55	24.74	mrpD	monovalent cation/H <sup>+</sup> antiporter subunit D	2,00E-13
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	<i>Escherichia coli</i> O55	31.77	mrpA	monovalent cation/H <sup>+</sup> antiporter subunit A	3,00E-30
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	<i>Escherichia coli</i> O55	24.78	mrpD	monovalent cation/H <sup>+</sup> antiporter subunit D	8,00E-13
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	<i>Escherichia coli</i> O55	34.62	ndhF	NADH dehydrogenase subunit 5	7,00E-06
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	<i>Escherichia coli</i> O103	30,8	mrpA	monovalent cation/H <sup>+</sup> antiporter subunit A	2,00E-27
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	<i>Escherichia coli</i> O103	23,9	mrpD	monovalent cation/H <sup>+</sup> antiporter subunit D	1,00E-11
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	<i>Escherichia coli</i> O103	24,6	ndhF	NADH dehydrogenase subunit 5	8,00E-06
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42	<i>Escherichia coli</i> O103	29,4	mrpA	monovalent cation/H <sup>+</sup> antiporter subunit A	2,00E-23
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42	<i>Escherichia coli</i> O103	24,4	mrpD	monovalent cation/H <sup>+</sup> antiporter subunit D	1,00E-12
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	<i>Escherichia coli</i> O157	21,7	mrpA	monovalent cation/H <sup>+</sup> antiporter subunit A	2,00E-30
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	<i>Escherichia coli</i> O157	24,7	mrpD	monovalent cation/H <sup>+</sup> antiporter subunit D	6,00E-13
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	<i>Escherichia coli</i> O157	31,6	ndhF	NADH dehydrogenase subunit 5	7,00E-06
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42	<i>Escherichia coli</i> O157	30,7	mrpA	monovalent cation/H <sup>+</sup> antiporter subunit A	3,00E-26

<i>Bacillus amyloliquefacien s FZB42</i>	<i>Escherichia coli</i> O157	24,7	mrpD	monovalent cation/H+ antiporter subunit D	2,00E-13
--	---------------------------------	------	------	--	----------

---