



REVISTA BRASILEIRA DE ENERGIAS RENOVÁVEIS

CULTURAS MISTAS DE BACTÉRIAS ANAERÓBIAS GERADORAS DE H₂ APLICADAS NO CONSUMO DE GLICEROL BRUTO GERADO EM USINAS DE BIODIESEL A PARTIR DE ÓLEOS RESIDUAIS DOMÉSTICOS¹

KAMILI O. SANTANA², CAROLINE VARELLA RODRIGUES³, MILENA NOVA CASTELBLANC4, SANDRA IMACULADA MAINTINGUER⁵

¹Apresentado no 1° Congresso de Pós-Graduação do IFSP: 29 de novembro a 02 de dezembro de 2016 - Matão-SP, Brasil

²Pós-Graduanda em Biotecnologia, Bolsista CAPES, UNESP, Instituto de Química, Araraquara, kamili.biocombustiveis@outlook.com

³Pós-Graduanda em Química, Bolsista CAPES, UNESP, Instituto de Química, Araraquara, carolvr61@hotmail.com

⁴Pós-Graduanda em Biotecnologia, Bolsista CAPES, UNESP, Instituto de Química, Araraquara, milenan80@gmail.com

⁵Docente da UNESP, Instituto de Pesquisa em Bioenergia (IPBEN), Rio Claro, mainting2008@gmail.com

RESUMO: O biodiesel é um biocombustível produzido principalmente através da reação de transesterificação, a partir de óleos ou gorduras e adição de um álcool e uma base forte como catalizador. Do total dessa reação, aproximadamente 10% é glicerol, que é separado da fração de ésteres resultantes (biodiesel). Quando utilizado na forma bruta (baixo grau de pureza) é uma matéria-prima barata e renovável, podendo ser utilizado como substrato na produção de energia limpa. Nesse sentido, o objetivo desse estudo foi avaliar a geração de H₂ em reatores anaeróbios em batelada utilizando glicerol bruto, além de caracterizar as culturas de bactérias anaeróbias presentes por técnicas de microbiologia clássica. O consórcio foi pré-tratado à

quente a fim de inibir a geração de CH₄. Os reatores foram operados com esgoto sanitário e glicerol bruto nas seguintes concentrações (g DQO L⁻¹): 20, 40, 160, 240 e 320. A geração de

H₂ ocorreu em todos os reatores, no entanto, para cargas orgânicas mais elevadas foram

observadas gerações reduzidas de H2. Não foi detectada a presença CH4 nos reatores. Foi

verificada a presença de colônias bactérias pertencentes aos gêneros de Lactobacillus sp. e

Clostridium sp.

PALAVRAS-CHAVE: hidrogênio; consórcio bacteriano; óleo residual doméstico; processos

fermentativos.

Mixed cultures of H₂ generating anaerobic bacteria applied in the consumption of crude

glycerol generated on biodiesel plants from household waste oils.

ABSTRACT:

The biodiesel is a biofuel produced mainly by transesterification reaction, from oils or fats,

and adding an alcohol and a strong base as catalyst. From this reaction, glycerol is formed,

which is separated from the resulting esters fraction (biodiesel). From the total volume of

biodiesel, approximately 10% corresponds to glycerol, which is separated from the resulting

esters fraction (biodiesel). When used in its crude form (low purity), it is a cheap and

renewable raw material, and can be used as a substrate in the production of clean energy. In

this sense, the objective of this study was to evaluate the generation of hydrogen, the removal

of organic matter (COD) in anaerobic batch reactors using crude glycerol and characterization

of anaerobic bacteria consortia by basic microbiological techniques. Heat pretreated anaerobic

H₂ bacterial consortium was used, in order to inhibit the generation of CH₄. The reactors were

operated with sewage and crude glycerol in the following concentrations (g COD L⁻¹): 20, 40,

160, 240 and 320. The generation of H₂ occurred in all reactors, however, the larger organic

loads had lower H₂ formation. It was not detected CH₄ presence in the reactors. It was

checked by plating the presence of colonies of *Lactobacillus* sp. and *Clostridium* sp.

KEYWORDS: hydrogen; bacterial consortium; domestic residual oil; fermentative processes.

INTRODUÇÃO

O glicerol é um substrato inadequado para o processo fermentativo quando utilizado sozinho, por possuir concentrações elevadas de carbono (aproximadamente 1500 g DQO L⁻¹), além de ser pobre em nutrientes e possuir elevada viscosidade (SANTOS et al., 2013; CHI et al., 2007) Sendo assim, o glicerol deve sofrer diluições em misturas adequadas de cosubstratos como, por exemplo, esgotos sanitários ou industriais, que auxiliaria no seu consumo (MARONE et al., 2015).

A degradação anaeróbia do glicerol acontece em quatro etapas: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese, com consequente geração de metano e dióxido de carbono. Entretanto, para obtenção do H₂ existe a necessidade de otimizar-se as condições fermentativas, evitando que microrganismos acetogênicos e metanogênicos sobrevivam, sendo eles os principais consumidores de hidrogênio durante a digestão anaeróbia para formação de gás metano. Técnicas como elevação de temperatura são bastante utilizadas para inativar esses microrganismos e selecionar bacilos Gram-positivos, que são as morfologias predominantes de bactérias anaeróbias geradoras de gás hidrogênio. (SIVAGURUNATHAN et al., 2015; ROSSI et al., 2011).

Nesse sentido, o objetivo desse estudo foi avaliar o potencial de geração de H₂ em reatores operados em batelada, utilizando glicerol bruto diluído em esgoto sanitário e quantificar as espécies de bactérias anaeróbias presentes no final da operação. Para tanto, foi utilizado consórcio de bactérias anaeróbias obtido após pré-tratamento térmico de lodo granular metanogênico.

MATERIAL E MÉTODOS

O inóculo utilizado foi obtido de lodo granular de reator UASB (Upflow anaerobic sludge blanket) da avícola DAKAR, localizada na cidade de Tietê (SP), empregado no tratamento de resíduos do abate de aves. O lodo foi submetido à pré-tratamento térmico – 100°C por 15 minutos (MAINTINGUER et al., 2008).

Demanda Química de Oxigênio (DQO) do resíduo foi utilizada como parâmetro analítico indicador da quantidade de matéria orgânica (APHA, 2005).

Reatores anaeróbios em batelada (250 mL) foram alimentados com 5 g L⁻¹ de extrato de levedura e glicerol bruto nas concentrações (g DQO L⁻¹): 20, 40, 160, 240 e 320, diluídos em

200 mL de esgoto sanitário. Todos os reatores foram mantidos a 30°C e pH inicial 7,0, sem agitação durante 100 horas.

O consumo do glicerol foi estimado segundo a metodologia descrita por Bondioli e Bella (2005). Para a quantificação do gás gerado foi montado um sistema de medição volumétrica adaptado do modelo descrito em Aquino et al. (2007) e Kalia et al. (1994), considerando a equação dos gases ideais. Os dados da produção acumulada foram modelados a partir da equação de Gompertz modificada por Lay, Li e Noike (1998).

A composição do gás foi qualitativamente confirmada por cromatografia, em cromatógrafo a gás Thermo Trace GC Ultra, equipado com injetor split/splitess, detector de condutividade térmica (TCD) e detetor de ionização por chama (FID).

As análises microbiológicas foram realizadas através de exame de microscopia óptica de luz comum em amostras oriundas dos reatores durante reativação celular (DSM, 1991).

Também foi feita contagem em placa nos meios: Neomicina Nagler (NN) para a enumeração de *Clostridium* sp., o meio Desoxicolato Sulfeto de Hidrogênio Lactose (DHL) para *Enterobacteriaceae* sp. e Ágar Lactobacilli Selectiva (LBS) para *Lactobacillus* sp. (SONG et al., 2012).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O consumo do glicerol ocorreu em todos os reatores e foi observada uma tendência na redução do consumo do glicerol com a elevação nas concentrações aplicadas. O perfil das produções acumuladas de H₂ coincidiu com o perfil de consumo do glicerol, sendo observada a mesma tendência, (Tabela 1). Concentrações de glicerol mais elevadas podem apresentar maiores quantidades de contaminantes, que representam uma fonte de interferentes e inibidores da atividade biológica, provocando a redução nos consumos do glicerol e nas gerações de H₂ (KIVISTÖ et al. 2013). Em nenhum dos reatores foi detectada a presença de metano.

TABELA 1. Consumos de glicerol, remoção da DQO e gerações de H₂ no final da operação dos reatores anaeróbios em batelada.

Reator	Consumo do glicerol	Remoção da	Produções
(g DQO L ⁻¹)	(%)	DQO (%)	(mmol L ⁻¹ de H ₂)
20	99,13	60,25	21,38
40	48,06	6,51	2,69
160	15,64	51,82	8,35
240	22,70	45,08	15,07
320	10,27	46,80	0,80**

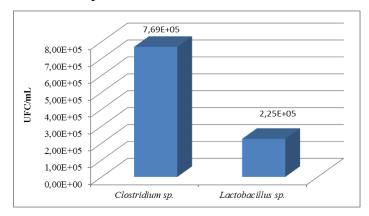
^{**} Valor experimental não aplicado modelamento matemático devido ausência de amostragem na fase exponencial.

Selembo et al. (2009) obteve produção máxima de 7,018 mmol de H_2 L^{-1} , utilizando consórcio microbiano em reatores batelada alimentados com 3 g L^{-1} de glicerol bruto. Considerando que o autor utilizou glicerol de elevado grau de pureza e meio de cultivo sintético, a produção de H_2 do presente estudo foi superior também e se mostrou economicamente mais vantajosa.

A biomassa reativada e utilizada durante a operação dos reatores apresentou diversidade morfológica elevada, com predomínio de bacilos Gram-Positivos. Os resultados do plaqueamento confirmaram a presença de *Clostridium* sp., que apresentou uma concentração celular de 7,69 x 10⁵ UFC/mL, enquanto que nenhuma colônia de *Enterobacter* sp. foi observada nas diluições testadas. Quanto às bactérias do gênero *Lactobacillus* sp., foram contadas 2,25 x 10⁵ UFC/ mL (Figura 1).

O predomínio do gênero *Clostridium* e a ausência de *Enterobacteriaceae* sp. demonstraram a eficiência do pré-tratamento térmico, que visa selecionar espécies produtoras de endósporos, ocasionado a redução da presença do gênero *Enterobacteriaceae* sp., uma vez que estes não formam endósporos (FORSYTHE, 2013).

FIGURA 1. Concentração celular de *Lactobacillus sp.* e *Clostridium sp.* após crescimento de colônias em meio específico.



Além disso, *Enterobacteriaceae* sp. são anaeróbias facultativas e a completa ausência de oxigênio pode ter comprometido sua atividade (KRAEMER e BAGLEY, 2007; ZHANG et al., 2011).

A presença de *Lactobacillus* sp. pode ser apontado com um fator de comprometimento dos rendimentos na geração de H₂ pois esse gênero é produtor de nisina, um bacteriocina capaz de inibir a ação de *Clostridium* sp. (MEGHROUS et al., 1999).

CONCLUSÕES

Concentrações mais elevadas de glicerol podem ser inibitórias para a geração de H₂ principalmente pelo acúmulo de outros constituintes do glicerol, como sabões e metanol, inviabilizando a fermentação.

O inóculo apresentou diversidade morfológica elevada com predomínio de Bacilos Gram-positivos, morfologia característica de bactérias pertencentes ao Gênero *Clostridium* sp.; e de bacilos Gram-Negativos, provavelmente representados por bactérias do gênero *Lactobacillus* sp.

AGRADECIMENTOS

CAPES, FAPESP, CNPq e ao Centro Multidisciplinar de Pesquisa em Combustíveis, Biocombustíveis, Petróleo e Derivados (CEMPEQC).

REFERÊNCIAS

APHA, AWWA, and WEF. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21st ed. American Public Health Association, Washington, DC (2005).

CHI, Z. et al. A laboratory study of producing docosahexaenoic acid from biodiesel-waste glycerol by microalgal fermentation. Process Biochemistry, v. 42, n. 11, p. 1537-1545, 2007.

DSM. Scientific Services of Culture Collections. Curso Ministrado na Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello", Campinas, 1991.

FORSYTHE, S. J. Microbiologia da Segurança dos Alimentos. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

KIVISTÖ, A.; SANTALA, V.; KARP, M. Non-sterile process for biohydrogen and 1,3-propanediol production from raw glycerol. International Journal of Hydrogen Energy, v. 38, n. 27, p. 11749-11755, 2013.

LAY, J.-J.; LI, Y.-Y.; NOIKE, T. Developments of bacterial population and methanogenic activity in a laboratory-scale landfill bioreactor. Water Research, v. 32, n. 12, p. 3673-3679, 1998.

MAINTINGUER, S. I. et al. Fermentative hydrogen production by microbial consortium. International Journal of Hydrogen Energy, v. 33, n. 16, p. 4309-4317, 2008.

MARONE, A. et al. Optimization of substrate composition for biohydrogen production from buffalo slurry co-fermented with cheese whey and crude glycerol, using microbial mixed culture. International Journal of Hydrogen Energy, v. 40, n. 1, p. 209-218, 2015.

MEGHROUS, J.; LACROIX, C.; SIMARD, R. E. The effects on vegetative cells and spores of three bacteriocins from lactic acid bacteria. Food Microbiology, v. 16, n. 2, p. 105-114, 1999.

ROSSI, D. M. et al. Comparison of different pretreatment methods for hydrogen production using environmental microbial consortia on residual glycerol from biodiesel. International Journal of Hydrogen Energy, v. 36, n. 8, p. 4814-4819, 2011.

SANTOS, K.G., et al. Glicerina: Utilidades e destinações. Acta Iguazu, Cascavel, v.2, n.4, p. 109-119, 2013.

SELEMBO, P. A. et al. Enhanced hydrogen and 1,3-propanediol production from glycerol by fermentation using mixed cultures. Biotechnol Bioeng, v. 104, n. 6, p. 1098-106, Dec 15 2009.

SIVAGURUNATHAN, P. et al. Feasibility of enriched mixed cultures obtained by repeated batch transfer in continuous hydrogen fermentation. International Journal of Hydrogen Energy, v. 41, n. 7, p. 4393-4403, 2016.