



III SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE GERENCIAMENTO DE
RESÍDUOS AGROPECUÁRIOS E AGROINDUSTRIAIS
12 E 14 DE MARÇO DE 2013 – SÃO PEDRO - SP

EFEITO DE DIFERENTES TRHS NA SELEÇÃO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE HIDROGÊNIO A PARTIR DE UM LODO ANAERÓBIO

Lamaison, F.C.¹; Loss, R.A.¹; Antônio, R.V.¹; Reginatto, V.²

¹ Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC, Brasil.

² Departamento de Química, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto-SP, Brasil.

[*valeriars@ffclrp.usp.br](mailto:valeriars@ffclrp.usp.br)

RESUMO: Este trabalho mostra o efeito de diferentes Tempos de Retenção Hidráulica (TRHs) aplicados a um reator operado em modo contínuo, inoculado com um lodo anaeróbio proveniente de um sistema de tratamento de vinhaça, com o objetivo de enriquecer o inóculo em bactérias produtoras de H₂. O efeito dos TRHs de 1, 6 e 12 h aplicados ao lodo foi verificado pela análise da composição do gás gerado, além da análise dos microrganismos por DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*). Verificou-se que os TRHs aplicados ao lodo não promoveram aumento da produção de H₂, uma vez que a maior concentração de H₂ foi encontrada no lodo sem pré-tratamento. Estes resultados demonstraram que o lodo utilizado como inóculo é uma excelente fonte de microrganismos produtores de H₂ para utilização em trabalhos futuros.

PALAVRAS-CHAVE: biohidrogênio, tempo de retenção hidráulico (TRH), pré-tratamentos.

EFFECT OF DIFFERENT HYDRAULIC RETENTION TIME IN SELECTION BIOHYDROGEN PRODUCING BACTERIA FROM AN ANAEROBIC SLUDGE

ABSTRACT: This work shows the effect of different Hydraulic Retention Times (TRHs) applied to a reactor operated in continuous mode, inoculated with anaerobic sludge from a stillage treatment system enriching the inoculum in H₂-producing bacteria. The effect of TRHs 1, 6 and 12 h applied to sludge was verified by analyzing the gas composition generated in addition to the analysis of microorganisms by DGGE (denaturing Gradient Gel Electrophoresis). It was found that the TRHs applied to the sludge did not promote increased production of H₂, since the highest concentration of H₂ was found in the sludge without pretreatment. These results demonstrated that the sludge used as inoculum is an excellent source H₂-producing microorganisms for use in future work.

Key- Words: biohydrogen, hydraulic retention time (HRT), pretreatment.

INTRODUÇÃO

Há muitos anos tem-se desenvolvido tecnologia anaeróbia com sucesso para a degradação da matéria orgânica presente em efluentes e resíduos sólidos. Nesses processos, poluentes orgânicos e resíduos são convertidos em metano através de uma série de reações em cadeia mediada por grupos distintos de microrganismos anaeróbios. Materiais orgânicos complexos são primeiramente hidrolisados e fermentados em ácidos orgânicos, que são posteriormente convertidos em acetato e H₂, e, finalmente em metano (FANG e LIU, 2002). Portanto, a metanogênese e a produção biológica de H₂ compartilham as primeiras etapas da digestão anaeróbia da matéria orgânica, ou seja, as etapas de hidrólise e a acetogênese. Porém, o sucesso da produção de H₂ por cultura



III SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE GERENCIAMENTO DE
RESÍDUOS AGROPECUÁRIOS E AGROINDUSTRIAIS
12 E 14 DE MARÇO DE 2013 – SÃO PEDRO - SP

mista anaeróbia (lodo) requer a inibição dos microrganismos consumidores de H_2 no decorrer das reações de decomposição da matéria orgânica. Tais reações são mediadas pelas bactérias homoacetogênicas, responsáveis pela conversão de CO_2 e H_2 em acetato, as metanogênicas hidrogenotróficas que produzem metano a partir de CO_2 e H_2 , além da desnitrificação e redução do sulfato, processos estes que competem pelo H_2 . Pré-tratamentos de culturas mistas têm sido utilizados para a seleção e enriquecimento de grupos de bactérias produtoras de H_2 e para a inibição de outros grupos de bactérias consumidoras de H_2 (DAS E VERZIROGLU, 2008). Dentre os métodos mais utilizados estão o tratamento térmico e a lavagem seletiva do lodo. A lavagem seletiva do lodo é uma estratégia comumente utilizada durante o start-up de biorreatores com a finalidade de reter no reator os microrganismos desejados. Tal estratégia tem como fundamento a operação de um reator de mistura completa em modo contínuo (CSTR do inglês, Continuous Stirred Tank Reactor) aplicando ao reator tempos de retenção hidráulica (TRH) mais baixos do que as velocidades específicas de crescimento das bactérias que se pretende lavar, de forma a tornar o lodo mais rico nas bactérias de interesse, que permanecem no reator (KIELING et al. 2007). Este trabalho tem como objetivo verificar o efeito de diferentes TRHs aplicados a um CSTR, alimentado com meio contendo glicose e nutrientes, no enriquecimento de um lodo anaeróbio em bactérias produtoras de H_2 . O efeito dos TRHs no enriquecimento do lodo foi verificado pela análise da composição do gás gerado, além da análise da diversidade dos microrganismos por DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*).

MATERIAL E MÉTODOS

Inóculo e meio de cultivo

Foi utilizada cultura mista, ou seja, lodo obtido de um reator anaeróbio de fluxo ascendente de manta de lodo (UASB) termofílico utilizado no tratamento de águas residuárias de uma usina de açúcar e etanol, localizada na região de Ribeirão Preto – SP. A alimentação do lodo foi feita com glicose e a suplementação de nutriente utilizada nos biorreatores foi a sugerida por Del Nery (1987).

Pré-tratamentos do lodo

Os pré-tratamentos utilizados foram a lavagem seletiva do lodo com três TRHs diferentes, quais sejam; 12, 6 e 1 h. Os pré-tratamentos foram realizados em um reator de vidro com volume total de 1,5 L ao qual foi adicionado 1 L do lodo no reator constituindo uma camisa de troca térmica, permitindo a circulação da água de aquecida a 55 °C. A tampa do biorreator era munida de perfurações onde foram acopladas 3 tubulações: entrada do meio de alimentação, saída do efluente e saída de gás. Para o reator com TRH de 12 h utilizou-se uma vazão 2,0 L/d e a carga orgânica foi de 39,8 g de glicose/d. Para o reator com TRH de 6 h utilizou-se uma vazão de 4,0 L/d e uma carga orgânica de 79,6 g glicose/d. O terceiro reator com TRH de 1 h utilizou-se uma vazão de 24 L/d e uma carga orgânica de 480 g de glicose/d. O biorreator foi operado como um CSTR e parte do lodo era retirada diariamente do reator, juntamente com a retirada do meio. A lavagem do lodo foi interrompida quando se chegou a uma concentração de sólidos suspensos voláteis (SSV) de 2,59, 2,41 e 2,5 g/L para os lodos tratados com TRHs de 12 , 6 e 1 h, respectivamente. Em seguida foi comparada a produção de gás pelos lodos, em ensaios em batelada.

Ensaio em batelada com os lodos pré-tratados

Uma série de biorreatores em batelada de 250 mL foram montados visando quantificar o volume e a composição do gás produzido. Os biorreatores foram inoculados com 100 mL do lodo sem tratamento (controle ou inóculo) e com os lodos previamente tratados pela lavagem seletiva com TRH de 12, 6 e 1 h. Aos lodos foi adicionando 100mL de meio de cultura contendo 15g/L de glicose e nutrientes. O pH inicial foi ajustado para 6,5. O sistema foi mantido à temperatura de 55°C e a agitação a 200 rpm. A anaerobiose



III SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE GERENCIAMENTO DE
RESÍDUOS AGROPECUÁRIOS E AGROINDUSTRIAIS
12 E 14 DE MARÇO DE 2013 – SÃO PEDRO - SP

foi mantida pelo borbulhamento de gás argônio. O teste foi acompanhado por 24h. A composição do gás foi verificada por cromatografia gasosa (GC - 2014, Shimadzu) equipado com detector de condutividade térmica (TCD).

Eletofórese em gel de gradiente desnaturante (DGGE)

O DNA genômico dos lodos previamente tratados e o lodo não tratado (controle) foi extraído utilizando-se o Kit QIAGEN (STOOL SAMPLES) de acordo com o protocolo do fabricante. A partir do DNA genômico extraído da amostra, foram obtidos fragmentos do RNAr 16S, utilizando a técnica de PCR para amplificação dos fragmentos de DNA, empregando-se iniciadores específicos para DGGE. Os gradientes utilizados foram de 25 e 55 %.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O pré-tratamento do lodo é utilizado como estratégia para suprimir ao máximo a atividade das bactérias consumidoras de H_2 no processo de biodigestão, enquanto preserva a atividade das produtoras de H_2 . Foram utilizados 3 diferentes TRHs do lodo para a lavagem seletiva entre 1, 6 e 12h. Esta faixa de TRH foi utilizada baseando-se na literatura, na qual trabalhos como o de Han e Shin (2004) estudaram diferentes vazões específicas de alimentação (D), entre 2,1 e 5,6 d⁻¹, para a produção de H_2 a partir de resíduos sólidos de alimentos e obtiveram maiores produções de H_2 em D 4,5 d⁻¹, ou seja, um TRH de 5,3 h. Kim e Lee (2010) prepararam um inóculo com elevada produção de H_2 a partir da operação de um CSTR de 5 L a 60 °C, aplicando um TRH de 10,3 h. A Figura 1 mostra os volumes totais de gás produzido pelos lodos nos testes em batelada. O experimento demonstra que as condições foram propícias para a produção de gás em todos os biorreatores, embora em quantidades diferentes. Pode-se observar que no biorreator controle, inoculado com o lodo não tratado houve a maior produção de gás 200 mL, seguido do biorreator inoculado com lodo tratado com TRH de 6h que produziu 130 mL. Na sequência foi o biorreator inoculado com lodo de TRH de 12h que produziu 100 mL e 70 mL o biorreator que recebeu o lodo tratado com TRH de 1h. Entretanto, quando se verificou a composição do gás gerado nos biorreatores (Tabela 1), observou-se que o H_2 foi o gás em menor proporção em todos os biorreatores. No entanto seu percentual é variável de acordo com cada tipo de TRH praticado. Além disso, observa-se a presença de N_2 em elevada porcentagem. Tal presença deve estar relacionada com o fato do lodo utilizado como inóculo possuir bactérias desnitrificantes. É descartada a possibilidade do gás ter sido contaminado pelo ar no instante da amostragem, pois o O_2 não foi detectado na análise por CG feita no gás. O lodo controle, que não recebeu nenhum pré-tratamento, exibiu a maior produção de H_2 . Assim, constatou-se que o lodo utilizado como inóculo foi melhor fonte de microrganismos produtores de H_2 do que os lodos submetidos aos pré-tratamentos com diferentes TRHs. Neste sentido, Mohan (2009) em artigo de revisão aponta para a necessidade do pré-tratamento de culturas mistas a fim de enriquecer o inóculo em bactérias produtoras de H_2 e revela elevadas diferenças de rendimentos de H_2 entre os lodos pré-tratados e não tratados obtidos por diferentes autores. Entretanto, o autor alerta que cada método de pré-tratamento teve a sua eficácia associada à natureza do inóculo, ao substrato e a forma de operação do biorreator. Neste sentido, o efeito do tratamento do inóculo na produção de H_2 deve ser estudado para cada cultura mista. Na figura 2 podem ser observados os resultados da análise de DGGE dos lodos submetidos a diferentes TRHs e o lodo controle. Pode-se verificar que o tratamento com TRH de 12 e de 6 h promoveu o aparecimento de novas bandas (microrganismos) que não foram detectados no controle, sendo que as bandas para o controle e o lodo que sofreu o tratamento com TRH de 1 h foram muito semelhantes. Estas bandas estão sendo sequenciadas para a identificação dos microrganismos.

CONCLUSÃO

A lavagem seletiva utilizada neste estudo como estratégia para o enriquecimento do lodo anaeróbico em bactérias produtoras de H₂ não foi efetiva. A diminuição do TRH promoveu o aumento da concentração de N₂, indicando o enriquecimento do lodo em bactérias desnitrificantes. Portanto, o lodo utilizado mostrou-se como uma excelente fonte de microrganismos produtores de H₂, para utilização em trabalhos futuros.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Das D, Veziroglu N. *Int. J. Hydrogen Energy* 33: 6016–6057, 2008.
 Del Nery, V. Utilização de lodo anaeróbico imobilizado em gel no estudo de partida de reatores de fluxo ascendente com manta de lodo, 215 p. USP, 1987.
 Fang, H.H.P., Liu, H. *Bioresource Technol*, 82(2), 87–93, 2002.
 Kieling D D., Reginatto V, Schmidell W., Travers D, Menes R, Soares H.M. *Process Biochemistry* 42, 12:1579-1585, 2007.
 Kim M-S, Lee D-Y. *Bioresource Technology* 101, 1, 2010, Pages S48-S52.
 Mohan, S.V. *Int. J. Hydrogen Energy* 34, 7 4 6 0 – 7 4 7 4, 2009.

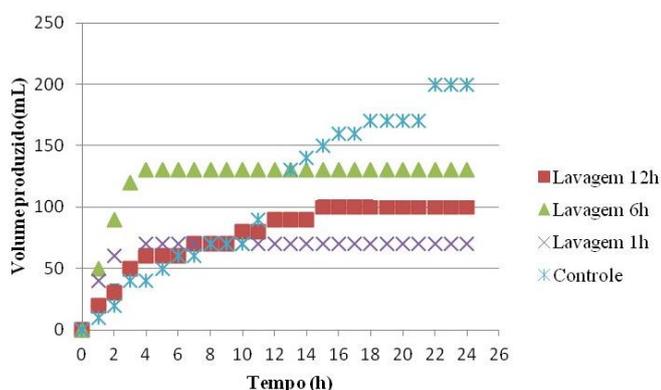


Figura 1: Volume de gás produzido nos ensaios em batelada utilizando os lodos pré tratados com diferentes TRHs.

Tabela 1 Composição dos gases gerados no reatores em batelada

Reatores	Controle	TRH 12h	TRH 6h	TRH 1h
H ₂ (%)	30	0,25	-	-
N ₂ (%)	50	40	80	72,5
CH ₄ (%)	-	-	-	-

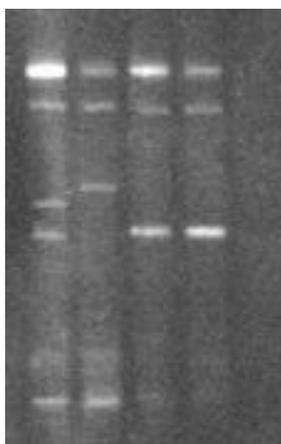


Figura 2: DGGE das amostras de lodo submetidas a TRHs de 12, 6 e 1 h e lodo controle (sem pré-tratamento), da esquerda para a direita.