



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

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

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

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

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

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

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

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

Resumo

O hidrogênio é uma forma limpa e renovável de energia que surge como uma alternativa para diversificação da matriz energética. Sua obtenção por meio da fermentação anaeróbia pode ser por consórcios microbianos ou culturas puras de diversos microrganismos, utilizando distintos substratos comerciais e resíduos industriais. O uso do substrato glicose permite saber o potencial de produção de hidrogênio por estes microrganismos. Este trabalho tem como objetivo comparar a produção de hidrogênio por consórcio microbiano obtido de lodo granular e culturas puras *Bacillus cereus*, *Enterobacter aerogenes* e *Enterococcus faecalis* em meio de glicose. Os ensaios foram realizados em frascos de 60 mL, em triplicata, contendo 30 mL de meio de glicose e 0,25 g de inóculo de consórcio microbiano após tratamento térmico (90°C -10 min) e um volume equivalente a 1 D.O. (densidade óptica) para cada cultura pura. Os frascos foram mantidos em agitação orbital a 37°C por 48 horas. A maior produção de hidrogênio foi obtida pelo consórcio (107,06 mmol H₂. L⁻¹), com as culturas puras, a produção de hidrogênio foi reduzida, sendo 5,81 mmol H₂. L⁻¹ para *B. cereus*, 3,82 mmol H₂. L⁻¹ para *E. aerogenes* e 0,57 mmol H₂. L⁻¹ para *E. faecalis*. O maior consumo do substrato glicose foi de 68,10% pelo consórcio microbiano e o menor foi de 0,35% pelo microrganismo *E. faecalis*. Os resultados mostram que em meio com glicose, os microrganismos isolados tiveram seu potencial de produção de hidrogênio reduzido, enquanto que os consorciados apresentaram um melhor desempenho neste mesmo meio de cultivo.

Palavras-chave: Hidrogênio. Glicose. Fermentação anaeróbia

Área Temática: Energia e Energia Renováveis

Hydrogen production by microbial consortium compared to *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis* and *Enterobacter aerogenes* using glucose as substrate

Abstract

Hydrogen is a clean, renewable form of energy that emerges as an alternative to diversifying the energy matrix. Its obtaining through the anaerobic fermentation can be by microbial



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

Keywords: Hydrogen. Glucose. Anaerobic fermentation

Subject Area: Renewable Energy and Energy



1 Introdução

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

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

Dentre as formas de obtenção de hidrogênio, destaca-se a produção por fermentação anaeróbia, processo realizado por consórcios microbianos, derivadas de ambientes naturais, como solo, água residual e lodos de estações de tratamento, ou por culturas puras de bactérias produtoras de hidrogênio. As vantagens na utilização de culturas puras estão relacionadas à seletividade do substrato, aos elevados rendimentos de H_2 e redução de subprodutos (VASCONCELOS, 2014), diversas culturas puras são usadas na produção biológica de hidrogênio, conforme Hallenbeck, (2009), como espécies dos gêneros *Enterobacter* e *Bacillus*.

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

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

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

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

2 Metodologia

2.1 Consórcio microbiano

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



2.2 Isolados microbianos

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

2.3 Ensaio de produção de hidrogênio

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

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

2.4 Análises químicas

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

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

2.5 Análise dos dados

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

$$P. V = n. R. T$$

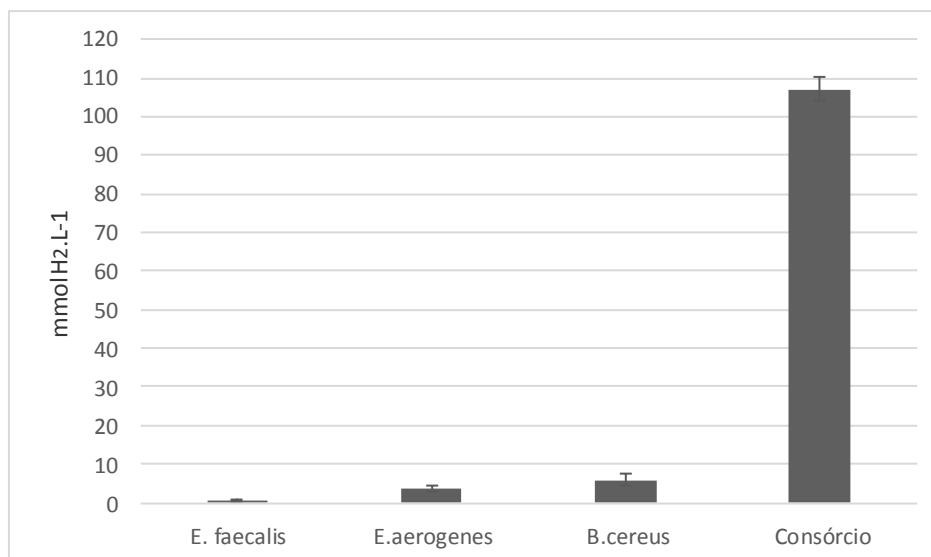
Onde P é a pressão atmosférica em Caxias do Sul (0,918 atm), V é o volume de H₂ (litros), n é o número de mols de H₂, e R é a constante universal dos gases ideais (0,082 atm L. K⁻¹. mol), e T é a temperatura utilizada nos experimentos (K).

3 Resultados e Discussão



A produção de hidrogênio (Figura 1) para o consórcio microbiano teve uma elevada produção de $107,06 \text{ mmol H}_2 \cdot \text{L}^{-1}$, enquanto *Bacillus cereus* produziu $5,81 \text{ mmol H}_2 \cdot \text{L}^{-1}$, *Enterobacter aerogenes* $3,82 \text{ mmol H}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ e *Enterococcus faecalis* $0,57 \text{ mmol H}_2 \cdot \text{L}^{-1}$.

Figura 1 – Produção de Hidrogênio em meio com glicose



Fonte: O autor

A maior produção de hidrogênio no consórcio pode ser explicada devido a sintrofia presentes nesta associação de diferentes microrganismos que compõe os grânulos do lodo. Esta associação se estabelece devido à relação fisiológica das diferentes rotas metabólicas de cada espécie, desempenhando diferentes funções no consórcio. Por isso, os consórcios são muito usados para a produção de hidrogênio (PHOWANA e DANVIRTUAL, 2014; SEM e SUTTAR, 2012; KAN, 2013). Yossan *et al* (2012), usando um consórcio obtido de efluente de óleo de palmeira obtiveram uma taxa de produção de hidrogênio de $74,54 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Também, Davila-Vazquez *et al.* (2009), com a utilização de consórcios microbianos proveniente de lodo anaeróbio granular e soro de queijo como substrato, obtiveram $46,61 \text{ mmol H}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

Enquanto que para as culturas puras, a produção foi muito reduzida, mostrando que este meio de cultivo não favorece a produção de hidrogênio por estes isolados. *B. cereus* foi descrito como produtor de hidrogênio no estudo de Patel *et al.* (2011) que usaram glicose como substrato obtendo rendimentos de 2 mols H_2 por mol de glicose. Este gênero de *Bacillus* está sendo bastante descrito na literatura para a produção de hidrogênio, devido sua capacidade de metabolizar vários substratos como vinhaça, glicerol e carboidratos para obtenção deste gás. Shah *et al.* (2016) utilizando cepas de *Bacillus sp.* obtiveram um rendimento de 0,16-1,53 mols de H_2 por mol de glicose consumida a partir de resíduos sólidos municipais, Das e Veziroglu, (2001) apontam *Enterobacter aerogenes* como uma das principais bactérias produtoras de hidrogênio, capacidade descoberta por Tanisho, pesquisador japonês, na década de 80 em estirpes isoladas do solo, tem um rendimento teórico a partir da glicose de $10 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol}^{-1}$ glicose (ZHANG *et al.*, 2011) e Kapdan e Kargi, (2006) obtiveram rendimentos de $1,97 \text{ mmol H}_2 \cdot \text{g}^{-1}$ glicose com *E. aerogenes*. Já o microrganismo *E. faecalis* é pouco descrito na literatura para a produção de hidrogênio, no entanto, Valdez-Vazquez *et al.* (2015) obtiveram uma produção de $79,54 \text{ mL}$ de hidrogênio por grama de xilose usando três espécies de *Enterococcus*.



Os carboidratos simples são rapidamente degradados e usados para crescimento e posterior produção de hidrogênio por bactérias fermentativas. Nos bioensaios o consumo de carboidrato foi proporcional à produção de hidrogênio, sendo o maior consumo de glicose para o consórcio microbiano que utilizou 68,10% do carboidrato disponível, seguido por *B. cereus* com 14,91%, *E. aerogenes* 10,82% e *E. faecalis* com apenas 0,35%, conforme mostra a Tabela 1. A glicose mostrou ser um substrato eficiente para a produção de hidrogênio pelos microrganismos consorciados, mas não tão eficiente para as culturas puras.

Tabela 1- Consumo de Glicose nos bioensaios

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

Fonte: O autor

4 Considerações Finais

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

5 Referências

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

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

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

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

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

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



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

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

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

MORIMOTO, M. et al. Biological production of hydrogen from glucose by natural anaerobic microflora. **International Journal of Hydrogen Energy**, p. 709-713, 2004.

PATEL, S. K. S., SINGH, M., KALIA, V.C. Hydrogen and Polyhydroxy butyrate Producing Abilities of Bacillus spp. From Glucose in Two Stage System. **Indian Journal of Microbiology**, v. 51 (4), p. 418-423, 2011.

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

PRAKASHAM, R.S.; BRAHMAIAH, P.; SATHISH, T.; SAMBASIVARAO, K.R.S. Fermentative biohydrogen production by mixed anaerobic consortia: Impact of glucose to xylose ratio, **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, p. 9354-9361, 2009.

SEM, B.; SUTTAR, R. R. Mesophilic fermentative hydrogen production from sago starch processing wastewater using enriched mixed cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37 (20), p. 15558-15559, 2012.

SHAH, T.; FAVARO, L.; ALIBARDI, L.; CAGNIN, A.; SANDON, R.; COSSU, S.; C ASELLA, M. Bacillus sp. strains to produce biohydrogen from the organic fraction of municipal solid waste. **Applied Energy**, v. 176, p. 116-124, 2016.

VASCONCELOS DE SÁ, L.R.; CAMMAROTA, M. C.; FERREIRA-LEITÃO, V. S. Produção de hidrogênio via fermentação anaeróbia – aspectos gerais e possibilidade de utilização de resíduos agroindustriais brasileiros. **Química Nova**, v. 37, n. 5, p. 857-867, 2014.

WANG, J.; WAN, W. Factors influencing fermentative hydrogen production: A review. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, p. 799-811, 2009.

YOSSAN, S.; O-THONG, S.; PRASERTSAN, P. Effect of initial pH, nutrients and temperature on hydrogen production from palm oil mill effluent using thermotolerant consortia and corresponding microbial communities. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, p. 13806-13814, 2012.

YU, H. Hydrogen production from rice winery wastewater in na upflow anaerobic reactor by using mixed anaerobic cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 27, n. 11 – 12, p. 1359–1365, 2002.



6º Congresso Internacional de Tecnologias para o Meio Ambiente

Bento Gonçalves – RS, Brasil, 10 a 12 de Abril de 2018

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