

**II-114 - ADIÇÃO DE FLUIDO RUMINAL E ESTERCO BOVINO AO LODO ANAERÓBIO COMO INÓCULO PARA FAVORECIMENTO DA PRODUÇÃO DE METANO A PARTIR DA DIGESTÃO ANAERÓBIA DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR BRUTO**

**Andressa Rezende Pereira<sup>(1)</sup>**

Graduada em Engenharia Ambiental e Sanitária pela Universidade Federal de Juiz de Fora. Mestre e doutora em Engenharia Ambiental pela Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP). Pesquisadora na UFOP.

**Nathalia Vercelli de Assis**

Graduada em Engenharia de Bioprocessos e Bacharel em Ciências e Tecnologia pela Universidade Federal de São João Del Rey (UFSJ). Mestre e doutoranda em Biotecnologia pela UFOP.

**Diego Roberto Sousa Lima**

Graduado em Química pela Universidade Federal de Alfenas. Mestre e doutor em Engenharia Ambiental pela Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP). Professor e pesquisador na Faculdade Santa Rita - Fasar (Conselheiro Lafaiete - MG).

**Sérgio Francisco de Aquino**

Bacharel/Licenciado em Química pela Universidade Federal de Viçosa (UFV). Mestre em Engenharia Hidráulica e Saneamento pela Universidade de São Paulo (USP). Doutor em Engenharia Química pelo Imperial College London. Professor Titular do Departamento de Química (DEQUI) da UFOP.

**Silvana de Queiroz Silva**

Graduação em Ciências Biológicas pela UFSCar. Mestre em Engenharia Hidráulica e Saneamento pela USP. Doutora em Microbiologia Ambiental pela University of Essex e Natural History Museum, Londres. Professora Associada do Departamento de Ciências Biológicas (DECBI) da UFOP.

**Endereço<sup>(1)</sup>:** Laboratório de Química Tecnológica e Ambiental, Universidade Federal de Ouro Preto – campus Morro do Cruzeiro, Ouro Preto - MG - CEP: 35400-000 - Brasil - Tel: (32) 984279982 - e-mail: andressa.rezende@engenharia.ufjf.br

**RESUMO**

Na digestão anaeróbia, a escolha do tipo de inóculo é relevante para a produção de metano. Três diferentes inóculos – lodo anaeróbio, lodo anaeróbio adicionado de fluido ruminal e lodo anaeróbio acrescido de esterco bovino fresco – foram testados para determinar seu desempenho na produção de metano a partir do bagaço de cana-de-açúcar. A adição de esterco fresco resultou na maior produção de metano do bagaço, gerando 143,3 NLCH<sub>4</sub> kgsv<sup>-1</sup>. A análise metagenômica mostrou que a maior adaptabilidade deste inóculo (redução da fase lag) pode ser atribuída especialmente às sequências correspondentes aos gêneros *Pseudomonas* e *Anaerobaculum*, que são capazes de degradar, respectivamente, compostos lignocelulósicos e uma variedade de carboidratos, produzindo como H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>, para atuação de organismos metanogênicos como *Methanobacterium*.

**PALAVRAS-CHAVE:** material lignocelulósico; suplementação de inóculos; bactérias fermentativas; arqueias metanogênicas.

**INTRODUÇÃO**

O setor sucroalcooleiro ocupa posição de destaque no ranking mundial, abastecendo os mercados interno e externo com expressiva produção de açúcar e biocombustível. De acordo com o Boletim Brasileiro de Monitoramento de Safras de agosto/2020, estima-se que 642,1 milhões de toneladas de cana serão colhidas na safra 2020/2021, sendo convertidas em aproximadamente 40 mil toneladas de açúcar e 28 bilhões de litros de etanol (CONAB, 2020).

O principal resíduo desta atividade é o bagaço de cana-de-açúcar, que consiste basicamente em celulose (50%), hemicelulose (25%) e lignina (25%), sendo a lignina recalcitrante, diferentemente dos outros dois constituintes biodegradáveis. Devido à sua rica composição, principalmente o alto teor de carboidratos, o bagaço da cana-de-

açúcar pode ser reaproveitado como matéria-prima para obtenção de biocombustíveis de segunda geração, como bioetanol e biogás, sendo assim incorporado ao conceito de biorrefinaria.

A digestão anaeróbia (DA) da biomassa lignocelulósica tem se destacado nos últimos anos, pois permite maior produtividade volumétrica do biogás com a utilização de substratos com alto teor de sólidos, de 15 a 40% (YANG et al., 2015). A utilização de inóculos adaptados neste processo pode ser favorável, pois fornecem microrganismos capazes de aumentar as taxas de degradação do material lignocelulósico, principalmente na etapa de hidrólise, reduzindo a fase de adaptação (lag) durante a DA.

Portanto, inóculo de lodo anaeróbio enriquecido com fluido ruminal ou adição de esterco bovino são promissores, pois os microrganismos que os constituem são potencialmente capazes de hidrolisar compostos lignocelulósicos, realizar fermentação, produzir metano e ainda tolerar a presença de compostos tóxicos gerados durante a degradação. Assim, o desempenho sintrófico desse inóculo tão diversificado e adaptado poderia garantir maiores níveis de conversão do material lignocelulósico, aumentando a produtividade do biogás. Segundo Jonge et al. (2020), a identificação de comunidades microbianas, que atuam na sintrofia durante a digestão anaeróbia do bagaço de cana, pode servir como uma importante ferramenta para descrever o potencial do inóculo utilizado, bem como a estabilidade e o potencial de resiliência a possíveis adversidades ocorridas durante o processo de DA.

## OBJETIVOS

O presente estudo busca comparar o efeito da adição de esterco bovino fresco e fluido ruminal a um lodo anaeróbio típico, na produção de metano e na comunidade microbiana a partir da digestão anaeróbia de bagaço de cana-de-açúcar bruto.

## METODOLOGIA

Foram avaliados três inóculos no processo de digestão anaeróbia do bagaço de cana de açúcar bruto, a saber: lodo de reator anaeróbio UASB tratando esgoto doméstico (denominado U); este lodo enriquecido com fluido de rúmem (denominado UR) e o lodo anaeróbio enriquecido com esterco bovino (UFM).

O bagaço de cana-de-açúcar foi coletado na empresa sucroalcooleira Bioenergética Aroeira®, localizada no Estado de Minas Gerais, em meados de 2014 (safra 2014/2015). O lodo anaeróbio foi obtido de um reator UASB em escala de demonstração, instalado no Centro de Pesquisa e Treinamento em Saneamento – CePTS – UFMG/COPASA, localizado na estação Arrudas, Belo Horizonte, MG. O fluido ruminal bovino foi retirado de animais fistulados e fornecido pelo Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa (comitê de ética: 42/2016). O esterco bovino foi coletado na região de pastagem dos animais.

Os inóculos foram misturados em 50% v/v. Os ensaios digestão anaeróbia foram realizados em frascos de vidro (Volume útil = 100 mL) vedados com tampa de borracha, utilizando apenas 60% do volume para a fase líquida (40 mL *head space*). Esses frascos foram incubados a 35°C a 150 rpm em shaker (Thoth®, modelo 6440) pelo tempo necessário ao encerramento da produção de biogás. A produção de biogás foi monitorada diariamente por meio da aferição da sua pressão e composição, registrando o volume acumulado de metano. Para tal foi analisada a pressão dos frascos (Manometer®, modelo PM-9100HA) e quantificados as porcentagens de volume (% v/v) de metano presente no biogás por meio do cromatógrafo de fase gasosa (CG) (Shimadzu®, modelo 2014/TCD).

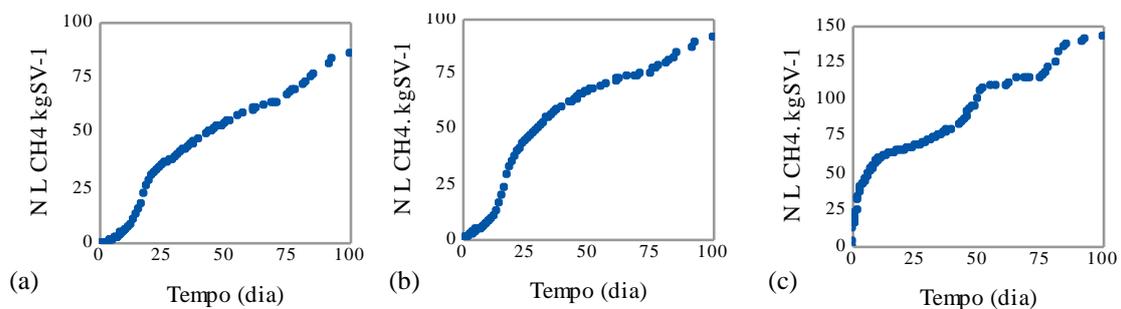
A identificação da comunidade microbiana nas amostras dos inóculos (U, UR, UFM), bem como nas amostras coletadas ao final dos ensaios de DA (M-U, M-UR e M-UFM), foi realizada por meio do Sequenciamento de Nova Geração (NGS) de fragmentos de DNA ribossomal, correspondendo a região V3-V4, utilizando a tecnologia Illumina da Neoprosperta Microbiome Technologies (Florianópolis, Brasil) de acordo com Christoff et al (2017).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Três inóculos distintos foram testados para determinar seu desempenho na produção de metano a partir do bagaço de cana-de-açúcar bruto. Para isso, amostras de rúmen (R) e amostras de esterco fresco (FM) foram misturadas individualmente a um lodo de UASB (U) para comparar o efeito da adição de microrganismos lignocelulósicos mais adaptados à digestão anaeróbia. Como observado na Tabela 1, o maior aumento na produção de metano foi alcançado pela adição de esterco fresco ao lodo anaeróbio. Essa adição de estrume proporcionou um aumento de 67% na produção de metano quando comparada com a produção do inóculo anaeróbio do UASB (85,6 NLCH<sub>4</sub> kgSV<sup>-1</sup>). Já a adição de microrganismos presentes no rúmen bovino proporcionou um aumento de 17% na biometanização do bagaço de cana, produzindo 100,0 NLCH<sub>4</sub> kgSV<sup>-1</sup>. A cinética de produção de metano foi favorecida no inóculo UFM (Figura 1).

**Tabela 1: Teor de sólidos totais nos inóculos e produção acumulada de metano para cada inóculo utilizado (U - lodo anaeróbio, UR – lodo anaeróbio acrescido de fluido ruminal, e UFM – lodo anaeróbio acrescido de esterco bovino)**

Tipo de Inóculo	Sólidos Totais (%)	CH <sub>4</sub> (NLCH <sub>4</sub> kgSV <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>
U	15,6 (± 0,1)	85,6 (± 2,8)
UR	17,1 (± 0,2)	100,0 (± 3,6)
UFM	15,6 (± 0,4)	143,3 (± 4,9)



**Figura 2: Produção de metano ao longo do processo de digestão anaeróbia do bagaço de cana bruto, para cada inóculo utilizado, sendo a) U - lodo anaeróbio b) UR – lodo anaeróbio acrescido de fluido ruminal, c) UFM – lodo anaeróbio acrescido de esterco bovino**

Com base nos grupos microbianos identificados no inóculo e ensaios de DA (Figura 2), bem como no metabolismo previsto de cada gênero microbiano, pode-se especular que o sucesso na produção de metano com inóculo acrescido de esterco bovino ocorreu devido à presença de bactérias com habilidades hidrolíticas, principalmente os gêneros *Clostridium* e *Peptoclostridium*, desempenhando um papel importante nos estágios iniciais da DA.

Esses gêneros, juntamente com a espécie *Anaerobaculum mobile*, um importante e exclusivo membro do inóculo UFM, foram capazes de metabolizar açúcares facilmente fermentáveis, produzindo ácidos graxos voláteis, H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>. A produção de metano parece ocorrer predominantemente pela atividade de arqueias hidrogenotróficas do gênero *Methanobacterium*. Nos estágios finais da DA, após 100 dias de incubação, baixa abundância de metanogênicas e uma alteração na dominância bacteriana foram observadas, provavelmente como resultado da presença de substratos mais recalcitrantes, dando espaço para a ação das bactérias *Pseudomonas sp*, *Alcaligenes sp* e *Bacillus sp*, em especial a espécie *Pseudomonas stutzeri*, um membro abundante e exclusivo da comunidade M-UFM. Além de desempenharem um importante papel na etapa de hidrólise-fermentação, esses três gêneros estão envolvidos na degradação de derivados de lignina, os quais, provavelmente, se acumularam durante a digestão do bagaço.

Já o gênero acidogênico *Anaerobaculum* demonstrou resiliência e tolerância ao ambiente severo, estando no inóculo UFM e após 100 dias de DA. Destaca-se também que a presença abundante de *Alcaligenes sp.* ao final do ensaio, uma bactéria reconhecidamente metanotrófica, pode ter comprometido a produtividade de metano em todos os ensaios. No entanto, a menor abundância de *Alcaligenes* foi observada no ensaio M-UFM, o que provavelmente contribuiu para o maior acúmulo de metano nesta condição.

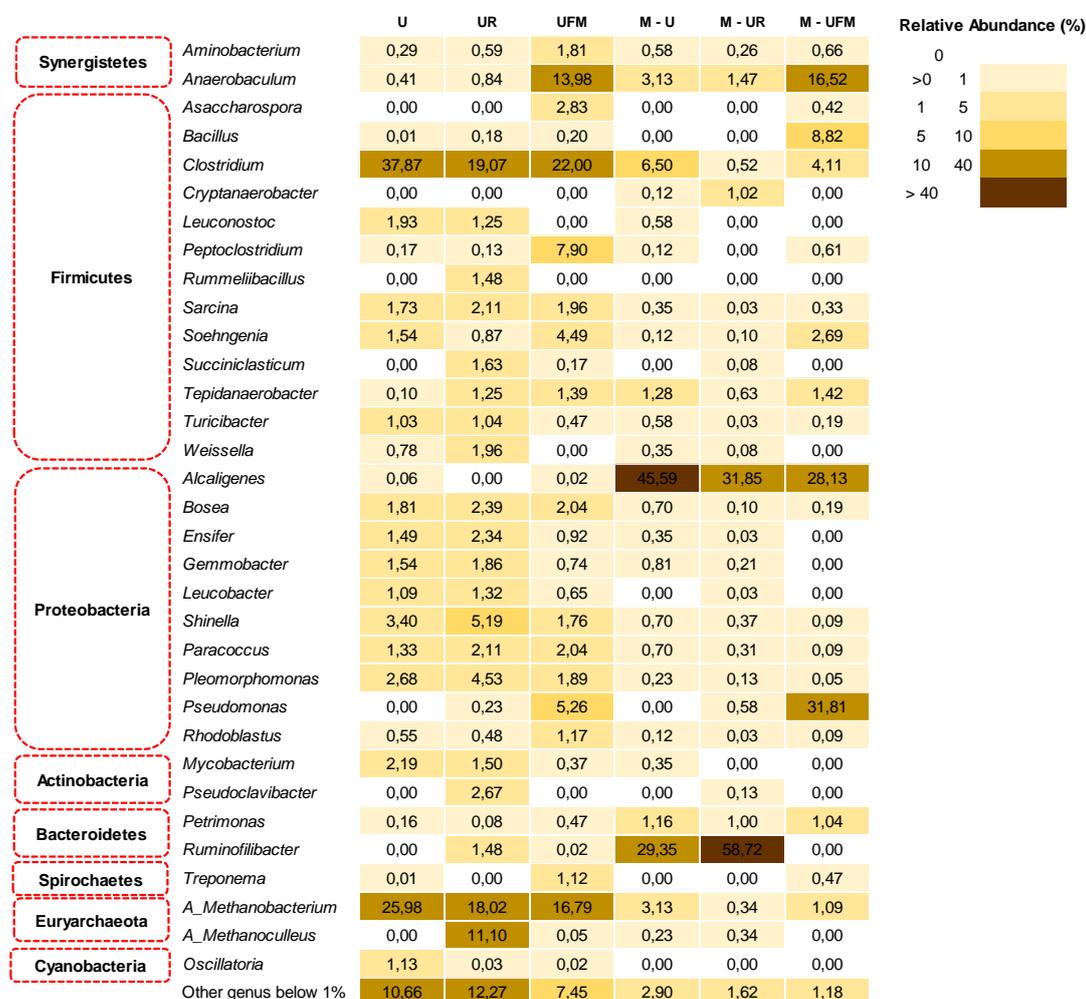


Figura 3: Mapa de calor representando a abundância relativa dos gêneros microbianos identificados nos inóculos (U, UR, UFM) e nos ensaios de digestão anaeróbia do bagasse de cana-de-açúcar bruto (M-U, M-UR e M-UFM) (sendo, U- lodo anaeróbio, UR – lodo anaeróbio acrescido de fluido ruminal, e UFM – lodo anaeróbio acrescido de esterco bovino)

## CONCLUSÕES

A produtividade e a cinética da produção de metano a partir do material lignocelulósico bruto da cana-de-açúcar, utilizando um lodo anaeróbio típico, pode ser potencializada pela adição de fluidos ruminais e esterco fresco, na proporção 50/50. No entanto, a maior melhoria (68%) foi observada para a adição de esterco fresco ( $143 \text{ NLCH}_4 \cdot \text{kg}_{\text{sv}}^{-1}$ ). Análises comparativas revelaram que uma microbiota comum foi observada entre todos os inóculos (compostos principalmente pelos gêneros *Clostridium* e *Methanobacterium*), entretanto, a adição de esterco fresco ao lodo anaeróbio promoveu um enriquecimento de espécies de *Anaerobaculum sp.* e *Pseudomonas sp.*, que desempenharam um papel importante durante a fermentação do bagaço de cana-de-açúcar. O gênero *Alcaligenes*, uma bactéria hidrolítica-fermentativa e consumidora de derivados de lignina, também foi um membro abundante em todos os ensaios de DA. Entretanto, seu papel na produção de biogás pode ser controverso devido à sua capacidade de realizar a oxidação do metano.



## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem às seguintes agências/instituições pelo apoio financeiro: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES (Código Financeiro 001); Conselho Nacional de Pesquisas (CNPq); Agência de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG – nº do auxílio: TEC-APQ-03502-16); e Universidade Federal de Ouro Preto (Processo 23109.004080/2019-88).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. APHA. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 21. ed. Washington: American Public Health Association, Water Environmental Federation, 2005.
2. CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. *Acompanhamento da safra brasileira - Cana de Açúcar, safra 2020/2021, segundo levantamento*. Brasília 7(2), p. 1-64, 2020.
3. YANG L. et al. Challenges and strategies for solid-state anaerobic digestion of lignocellulosic biomass. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (44), p. 824-834, 2015.
4. JONGE N. et al. Characterisation of microbial communities for improved management of anaerobic digestion of food waste. *Waste Manag.* (117), p. 124-135, 2020.
5. CHRISTOFF A. P. et al. Bacterial identification through accurate library preparation and high-throughput sequencing. *Neoprosecta Microbiome Technologies* (25), 2017.