



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Centro de Tecnologia e Geociências
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil
Área de Concentração em Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos

Mitsue Maia Nakazawa

**APROVEITAMENTO DE GLICEROL PARA A PRODUÇÃO DE BIOGÁS OU 1,3-
PROPANODIOL EM REATOR UASB**

Tese de Doutorado

Recife/2015

Mitsue Maia Nakazawa

APROVEITAMENTO DE GLICEROL PARA A PRODUÇÃO DE BIOGÁS OU 1,3-PROPANODIOL EM REATOR UASB

Tese realizada sob convênio de co-tutela entre a Universidade Federal de Pernambuco e a *Universidad Autónoma de Madrid*.

A tese é apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, Área de Concentração em Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Engenharia Civil, e ao *Programa de Doctorado en Microbiología*, da *Universidad Autónoma de Madrid*, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências, com ênfase em Microbiologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria de Lourdes Florencio dos Santos
(Universidade Federal de Pernambuco)

Orientador no exterior: Prof. Dr. José Luis Sanz Martín
(*Universidad Autónoma de Madrid*)

Recife/2015

Catálogo na fonte
Bibliotecária: Rosineide Mesquita Gonçalves Luz / CRB4-1361 (BCTG)

- N163a Nakazawa, Mitsue Maia.
Aproveitamento de Glicerol para a produção de Biogás ou 1,3-propanodiol em reator UASB / Mitsue Maia Nakazawa. - Recife: O Autor, 2015.
103f, il., fig., gráfs., tabs.
- Orientadora: Profa. Dra. Maria de Lourdes Florencio dos Santos.
Orientador: Prof. Dr. José Luis Sanz Martin.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, 2015.
Co-tutela com a Universidad Autónoma de Madrid.
Inclui Referências e Apêndice.
1. Engenharia Civil. 2. 1,3-PDO. 3. Biodiesel. 4. DGGE. 5. Diversidade microbiana. 6. Hidrogênio. 7. Metano. 8. UASB. I. Santos, Maria de Lourdes Florencio dos (Orientadora). II. Sanz Martin, José Luis (Orientador). II. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA CIVIL

A comissão examinadora da Defesa de Tese de Doutorado em Regime de Co-Tutela com a Universidade Federal de Pernambuco e a Universidade Autônoma de Madri

**APROVEITAMENTO DE GLICEROL PARA A PRODUÇÃO
DE BIOGÁS OU 1,3-PROPANODIOL EM REATOR UASB**

defendida por

Mitsue Maia Nakazawa

Considera a candidata APROVADA

Recife, 11 de novembro de 2015

Orientadores:

Prof. Dr. José Luis Sanz Martín - UAM
(orientador externo)

Prof.^a Dr.^a Maria de Lourdes Florencio dos Santos - UFPE
(orientadora interna)

Banca Examinadora:

Prof. Dr. José Luis Sanz Martín - UAM
(orientador externo)

Prof. Dr. Renato Carrhá Leitão - EMBRAPA
(examinador externo)

Prof.^a Dr.^a Maria de Los Angeles Perez Fernandez Palha - UFPE
(examinadora externa)

Prof.^a Dr.^a Sávia Gavazza dos Santos Pessôa - UFPE
(examinadora interna)

Prof. Dr. Mario Takayuki Kato - UFPE
(examinador interno)

Agradecimentos

Aos meus pais Yara e Mineo Nakazawa, meus irmãos Atsushi e Mieko Nakazawa, e meu noivo João A. O. M. Neto por estarem sempre presentes e pelo apoio incondicional.

A todos os demais familiares e aos amigos que me incentivaram e que torceram por mim.

Aos professores Lourdinha Florencio, Mario Kato e Sávía Gavazza, pela orientação, ensinamentos, incentivo e pela oportunidade de realizar esta tese e tantas outras experiências inesquecíveis ao longo da minha estadia no LSA.

Ao professor José Luis Sanz pelos ensinamentos, por me oferecer a oportunidade de conhecer outra cultura e fazer novos amigos, pelo apoio em Madri e pelos passeios.

A Renato Carrhá Leitão e Maria de Los Angeles Perez Fernandez Palha, membros externos da banca avaliadora de defesa da tese, por suas contribuições.

A Ronaldo Fonseca e todos os colegas do LSA, em especial Wamberto da Silva Júnior, Thorsten Kochling, Luiza Feitosa, Poliana Januário e Jucélia Ferreira pelas dicas, pelo apoio e pela amizade.

Aos amigos Mirna Martínez, Emiliano Díaz, Benedito Correia, Ana Morro, Kary Haro, Tania Leandro, Carlotta Vizioli, e professores Irma Marín, José Pascual Abad, Concha Abrusci e Moustafá Malki, pelo apoio, sugestões e pelos momentos de descontração. Um abraço especial a Ana Morato e sua família por todo o carinho, e à senhora Gloria Romero que me fez sentir em um lar.

À Andrea Negromonte, Claudiana Santiago e Cleide Marques, da Secretaria de Pós-Graduação em Engenharia Civil; e à Tamyls Lima e Marinalva Simão, do Grupo de Saneamento Ambiental, por toda a ajuda prestada, sempre com eficiência e gentileza.

À Universidade Federal de Pernambuco, ao Centro de Tecnologia e Geociências, ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil e ao Laboratório de Saneamento Ambiental (LSA) por fornecerem a infraestrutura necessária para minha formação.

À *Universidad Autónoma de Madrid*, ao *Departamento de Biología Molecular*, e ao *Grupo de Metanogénesis*, por me receberem e me fornecerem os meios necessários para realização da minha pesquisa.

Ao professor Antonio López de Lacey, do *Departamento de Biocatálisis*, do *Instituto de Catálisis y Petróleoquímica*, por permitir o uso do equipamento de HPLC quando foi necessário.

Ao Centro Tecnológico em Bioenergia, do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), pelo fornecimento do glicerol bruto.

À Mahou - San Miguel SA (Espanha), por fornecer uma alíquota de lodo granular.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro (edital MCT/CNPq nº 014/2010 - Universal - Faixa B, processo 470543/2010-8); e pela concessão da bolsa de doutorado (processo 161302/2011-4).

À Capes, pela concessão da bolsa de doutorado sanduíche no exterior (processo BEX 12459/13-5).

À Rede de Resíduos Líquidos Gerados na Cadeia Produtiva de Petróleo (RELINTE).

"Nenhuma grande vitória é possível sem que tenha sido precedida de pequenas vitórias sobre nós mesmos".

(L. M. Leonov)

Resumo

NAKAZAWA, M.M. **Aproveitamento de glicerol para a produção de biogás ou 1,3-propanodiol em reator UASB**. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2015.

No presente estudo o aproveitamento de glicerol através de processos anaeróbios para geração de subprodutos de valor agregado foi analisado de duas maneiras. Em um primeiro momento foi avaliado o uso de glicerol bruto proveniente da produção de biodiesel como substrato para produção de biogás em um reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB) em escala de bancada durante o período experimental de 280 dias. O reator foi operado sob cargas orgânicas volumétricas variando entre 0,50 e 8,06 kg DQO/m³.d. Como resultados, foram alcançadas eficiências médias de remoção de DQO de 89% e valores de conversão de metano (CH₄) de 68%. A produção média de CH₄ foi igual a 0,25 L CH₄/g DQO. Os perfis das bandas de DGGE dos domínios *Bacteria* e *Archaea* sugeriram poucas mudanças na comunidade microbiana durante a operação do reator. Na segunda etapa da tese, 13 variáveis foram avaliadas através do design experimental de Plackett-Burman visando definir a composição adequada do meio de cultivo para a produção de 1,3-propanodiol (1,3-PDO) e/ou hidrogênio. Em seguida, dois reatores UASB foram operados usando-se glicerol analítico como substrato. O rendimento máximo de 0,8 mol 1,3-PDO/mol glicerol consumido foi alcançado, após a adição de bicarbonato de sódio aos reatores. Como produtos secundários foram produzidos propionato e acetato. Análises de ecologia microbiana demonstraram a baixa diversidade presente no lodo granular do inóculo e das fases operacionais finais da operação dos reatores. A partir dos resultados obtidos em ambas etapas de estudo, é possível concluir que o glicerol bruto proveniente da produção de biodiesel pode ser degradado eficientemente através de digestão anaeróbia, alcançando altos rendimentos de metano e que a produção contínua de 1,3-PDO a partir de glicerol em reatores UASB com lodo granular é viável.

Palavras-chave: 1,3-PDO. Biodiesel. DGGE. Diversidade microbiana. Hidrogênio. Metano. UASB

Resumen

NAKAZAWA, M.M. **Aprovechamiento de glicerol para la producción de biogás o 1,3-propanodiol mediante reactor UASB.** Tesis (Doctorado) – Universidad Federal de Pernambuco, Recife, 2015.

En este estudio se analizó el aprovechamiento de glicerol mediante procesos anaerobios mediante dos enfoques diferentes. En una primera etapa se evaluó el uso de glicerol bruto generado en la producción de biodiesel como sustrato para la producción de biogás mediante un reactor anaerobio de manto de lodo con flujo ascendente (UASB) en escala de laboratorio durante un período de 280 días. El reactor operó con cargas orgánicas volumétricas que variaban entre 0,50 y 8,06 kg DQO/m³·d. Como resultado, la eficiencia media de remoción de DQO fue de 89% y la conversión media en metano (CH₄) fue del 68%. La producción de CH₄ fue igual a 0,25 L CH₄/g DQO. Los perfiles de las bandas de DGGE de los dominios *Bacteria* y *Archaea* sugieren pocos cambios en la comunidad microbiana durante el funcionamiento del reactor. En la segunda etapa de la tesis, se evaluaron 13 factores mediante el diseño experimental de Plackett-Burman con el fin de definir la composición adecuada del medio de cultivo para la producción de 1,3-propanodiol (1,3-PDO) y/o hidrógeno. Con posterioridad, se operaron dos reactores UASB utilizando glicerol analítico como sustrato. El rendimiento máximo de 0,8 mol 1,3-PDO/mol glicerol consumido se logró tras la adición de bicarbonato de sodio a los reactores. Como subproductos secundarios se produjeron propionato y acetato. El análisis de la ecología microbiana de los reactores demostró baja diversidad presente en el lodo granular del inóculo y de las fases operativas finales de los reactores. De los resultados obtenidos en ambas etapas del estudio, se puede concluir que el glicerol bruto procedente de la producción de biodiesel se puede degradar de manera eficiente a través de la digestión anaerobia, alcanzando altos rendimientos de metano y que la producción continua de 1,3-PDO desde glicerol en reactores UASB con lodo granular es factible.

Palabras clave: 1,3-PDO. Biodiesel. DGGE. Diversidad microbiana. Glicerol. Hidrógeno. Metano. UASB

Abstract

NAKAZAWA, M.M. **Utilization of glycerol for the production of biogas or 1,3-propanediol in UASB.** Thesis (PhD) – Federal University of Pernambuco, Recife, 2015.

In this study, the use of glycerol for the generation of valuable by-products through anaerobic processes was analyzed in two steps. At first, the use of crude glycerol from the biodiesel production as a substrate for biogas production was evaluated in an upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor in laboratory scale during the period of 280 days. The reactor was operated under volumetric organic loading rates of 0.50 to 8.06 kg COD/m³·d. As a result, on average, the COD removal efficiencies were 89% and the fraction converted to methane (CH₄) reached 68%. The average production of CH₄ was 0.25 L CH₄/g COD. The profiles of the DGGE bands of *Bacteria* and *Archaea* domains suggested little changes in the microbial community during the reactor operation. In the second step of the thesis, 13 variables were evaluated by the Plackett-Burman experimental design aiming to define a suitable composition of the culture medium for the production of 1,3-propanediol (1,3-PDO) and/or hydrogen. Subsequently two UASB reactors were operated using analytical glycerol as substrate. The maximum yield of 0.8 mol 1,3-PDO/mol consumed glycerol was achieved after the addition of sodium bicarbonate to the reactors. As secondary by-products were produced propionate and acetate. Microbial ecology analysis showed low diversity present in granular sludge from the inoculum and from the final operational phases of the reactors. From the results obtained in both study stages, it can be concluded that crude glycerol from biodiesel production can be efficiently degraded through anaerobic digestion, reaching high methane yields and the continuous production of 1,3-PDO from glycerol in UASB reactors with granular sludge is feasible.

Keywords: 1,3-PDO. Biodiesel. DGGE. Glycerol. Hydrogen. Methane. Microbial diversity. UASB

Lista de figuras

Figura 2.1 – Reações gerais da transesterificação de triglicerídeos	18
Figura 2.2 – Esquema da síntese do glicerol a partir de gorduras e óleos.....	19
Figura 2.3 – Esquema da digestão anaeróbia de matéria orgânica complexa	21
Figura 2.4 – Produtos finais da fermentação do glicerol por diferentes micro-organismos.....	23
Figura 3.1 – Usina piloto de produção de biodiesel (Caetés-PE).....	41
Figura 3.2 – Esquema do reator anaeróbios de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB)....	42
Figura 3.3 – Variação da COV aplicada, pH, eficiência de remoção de DQO e produção de CH ₄ ao longo do tempo de operação do reator UASB	49
Figura 3.4 – Gel de DGGE para o domínio <i>Bacteria</i> do reator UASB	54
Figura 3.5 – Gel de DGGE para o domínio <i>Archaea</i> do reator UASB	55
Figura 4.1 – Fotografia dos reatores tipo UASB operados durante 165 dias de experimento .	62
Figura 4.2 – Conjuntos de <i>primers</i> e programas utilizados para a amplificação de genes RNAr 16S, de <i>Bacteria</i> (341F-GC – 907R) e de <i>Archaea</i> (622F-GC – 1100R).....	65
Figura 4.3 – Carga orgânica de glicerol (CO-G), consumo de glicerol (%) e rendimentos dos subprodutos produzidos nos reatores R1(A), com pH inicial igual a 6,8, e R2 (B), com pH inicial igual a 5,5, ao longo do experimento.....	69
Figura 4.4 – Rendimentos dos subprodutos e dos gases produzidos nos reatores R1 (A), pH 6,8, e R2 (B), pH 5,5, ao longo do experimento.....	70
Figura 4.5 – Estruturas do lodo granular do inóculo e ao final da Fase 3 de operação dos reatores 1 (R1) e 2 (R2) analisadas por microscopia eletrônica de varredura.....	74
Figura 4.6 – Estruturas do lodo granular ao final da Fase 4 de operação dos reatores 1 (R1) e 2 (R2) analisadas por microscopia eletrônica de varredura.....	75
Figura 4.7 – Morfologias microbianas do lodo granular ao final da Fase 4 de operação dos reatores 1 (R1) e 2 (R2) analisadas por microscopia eletrônica de varredura.....	76
Figura 4.8 – Geis de DGGE para as comunidades de <i>Bacteria</i> (A) e <i>Archaea</i> (B) ao longo da operação dos reatores UASB 1 e 2.	77

Lista de tabelas

Tabela 3.1 – Composição da solução de macro e micronutrientes utilizada no teste de atividade metanogênica específica e na operação do reator UASB	40
Tabela 3.2 – Parâmetros de caracterização do glicerol bruto	41
Tabela 3.3 – Programa de monitoramento dos parâmetros físico-químicos	43
Tabela 3.4 – Primers específicos da reação em cadeia da polimerase para a amplificação de genes RNAr 16S de <i>Bacteria</i> e <i>Archaea</i>	45
Tabela 3.5 – Caracterização físico-química do glicerol bruto	47
Tabela 3.6 – Valores médios e desvios padrão dos principais parâmetros analisados durante a operação do reator UASB em escala de bancada	48
Tabela 3.7 – Carga orgânica máxima aplicada em diferentes reatores, eficiências de remoção de DQO e produção de metano em experimentos que utilizaram glicerol como substrato para digestão anaeróbia	52
Tabela 3.8 – Concentração e pureza de amostras de DNA do inóculo e lodo do reator UASB	53
Tabela 4.1 – Matriz do delineamento experimental de Plackett-Burman para avaliação dos fatores significativos (X_1 a X_{13}) para a produção de 1,3-propanodiol e hidrogênio por cultura mista	60
Tabela 4.2 – Composição dos diferentes meios utilizados na operação dos reatores UASB ...	62
Tabela 4.3 – Primers específicos da reação em cadeia da polimerase para a amplificação de um fragmento do gene RNAr 16S, de <i>Bacteria</i> e <i>Archaea</i>	64
Tabela 4.4 – Níveis das variáveis e resultados da análise estatística do desenho de Plackett-Burman após 24h da montagem do ensaio	66
Tabela 4.5 – Médias e desvios padrão da carga orgânica de glicerol (CO-G), consumo de glicerol, e rendimentos dos subprodutos e hidrogênio formados nos reatores R1 e R2 durante os 165 dias de experimento	71

SUMÁRIO

Capítulo 1 – Introdução geral	15
Capítulo 2 – Revisão da literatura	17
2.1 Biodiesel	17
2.2 Glicerol	19
2.3 Metabolismo de glicerol por vias anaeróbias	21
2.4 História dos reatores anaeróbios	24
2.5 Desempenho de sistemas anaeróbios usando glicerol bruto como substrato.....	26
2.6 Bioprodutos a partir do glicerol	28
2.7 1,3-propanodiol.....	29
2.8 Fatores que influenciam a produção de 1,3-PDO e H ₂	31
2.9 Design de experimentos.....	33
2.10 Ecologia de micro-organismos	34
2.10.1 Análises de biologia molecular.....	35
2.10.2 Microscopia eletrônica de varredura	36
Capítulo 3 – Digestão anaeróbia de glicerol bruto proveniente da produção de biodiesel	38
3.1 Introdução	38
3.2 Materiais e métodos	39
3.2.1 Caracterização do inóculo	39
3.2.2 Caracterização físico-química do glicerol	41
3.2.3 Operação e monitoramento do reator UASB.....	42
3.2.4 Procedimento analítico	43
3.2.5 Análise da ecologia de micro-organismos.....	45
3.3 Resultados e discussão.....	46
3.3.1 Caracterização do inóculo	46
3.3.2 Caracterização do glicerol bruto.....	47
3.3.3 Operação do reator UASB.....	48
3.3.4 Ecologia de micro-organismos	53
3.4 Conclusão.....	56
Capítulo 4 – Produção de 1,3-propanodiol e hidrogênio a partir de glicerol por cultura mista anaeróbia.....	57
4.1 Introdução	57
4.2 Materiais e métodos	58
4.2.1 Obtenção do inóculo.....	58
4.2.2 Design de Plackett-Burman	59
4.2.3 Ensaio em reatores de batelada	61

4.2.4 Ensaio em reatores de fluxo contínuo.....	61
4.2.5 Métodos analíticos.....	63
4.2.6 Análise da morfologia e diversidade de micro-organismos	63
4.3 Resultados e discussão.....	66
4.3.1 Composição do meio para produção de 1,3-PDO e H ₂	66
4.3.2 Operação dos reatores UASB	67
4.3.3 Ecologia microbiana e estrutura do lodo granular.....	73
4.4 Conclusão.....	78
Capítulo 5 – Conclusão geral	79
Resumen extenso en castellano	80
Referências bibliográficas	90
Apêndice.....	102

Capítulo 1 – Introdução geral

Glicerol, glicerina ou 1,2,3-propanotriol, é um líquido viscoso incolor, inodoro, com um sabor doce, derivado de matérias-primas naturais ou petroquímicas. O glicerol é uma substância química versátil e valiosa, uma vez que constitui ou faz parte do processamento de vários produtos alimentares, cosméticos, produtos de higiene pessoal e medicamentos. O glicerol serve ainda como umectante, edulcorante, solvente ou conservante (PAGLIARO; ROSSI, 2010).

O glicerol derivado de fontes naturais é obtido hidroliticamente a partir de gorduras animais e óleos vegetais durante a fabricação de ácidos graxos e de sabão, e por transesterificação durante a produção do biodiesel. O glicerol produzido a partir de usina de biodiesel é normalmente referido como glicerol bruto. Produtores de biodiesel em grande escala refinam o glicerol bruto produzido em suas instalações e o vendem para as indústrias de alimentos, farmacêuticas e químicas; ou exportam o glicerol bruto para empresas refinadoras chinesas. Os pequenos produtores, porém, não podem arcar com o alto custo da purificação, e enfrentam problemas de disposição ou para encontrar uma utilização viável do glicerol bruto (THOMPSON; HE, 2006).

Uma vez que o glicerol bruto é gerado continuamente pela indústria de biodiesel – para cada 10 kg de biodiesel é produzido 1 kg de glicerol bruto –, surge a necessidade urgente de novas tecnologias comerciais para absorver o volume excedente. De acordo com Pagliaro e Rossi (2010), nos próximos anos, o glicerol será a matéria-prima essencial das biorrefinarias – instalações que utilizam a conversão de biomassa para produzir combustíveis, energia e produtos químicos. Assim, para tornar as usinas de biodiesel mais rentáveis, é desejável converter o glicerol em um produto com preço de venda mais elevado e que tenha mercado para absorvê-lo (JOHNSON; TACONI, 2007).

A conversão biológica de glicerol pode produzir produtos com maior valor agregado. O glicerol pode ser degradado por meio do processo de digestão anaeróbia, resultando na produção de um biogás composto principalmente de metano e dióxido de carbono. Outra opção promissora para a conversão biológica de glicerol está na sua fermentação, visando à produção de 1,3-propanodiol (1,3-PDO) e outros co-produtos, incluindo ácido acético, ácido butírico, etanol e hidrogênio (H₂). Do ponto de vista econômico, o 1,3-PDO produzido por via biológica é interessante uma vez que pode competir com a produção a partir das petroquímicas, em termos de qualidade do produto final e de redução de custos. Ainda, a

biodegradabilidade dos plásticos contendo 1,3-PDO produzido por via biológica é maior em comparação com aqueles de polímeros e poliésteres totalmente sintéticos.

Partindo-se das premissas citadas acima, esse trabalho se baseou na necessidade de aproveitamento do glicerol. O objetivo geral do trabalho foi avaliar a aplicação do glicerol como principal substrato em processos anaeróbios e seu potencial para produção de biogás, especialmente metano, e de subprodutos de maior valor agregado, tais como 1,3-PDO e H_2 .

Capítulo 2 – Revisão da literatura

2.1 Biodiesel

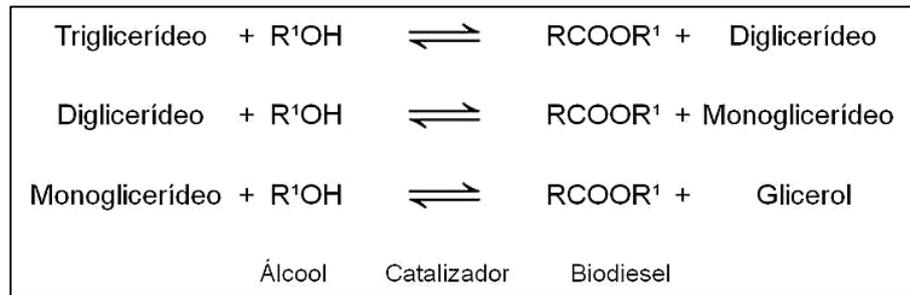
O termo biodiesel aplica-se a combustíveis de origem biológica, geralmente produzidos por esterificação (ésteres metílicos ou etílicos) de ácidos graxos derivados de óleos vegetais (oleaginosas) ou de gorduras animais. O biodiesel é utilizado como combustível, geralmente misturado a produtos de refino de petróleo, em vários tipos de máquinas ou para gerar calor (BRASIL, 2013; MEHER *et al.*, 2006; YUSUF *et al.*, 2011).

A produção mundial de biodiesel cresceu enormemente. Em 2009, a produção mundial foi de 15 bilhões de litros, dos quais 49,8% estavam na Europa. Em 2014, a capacidade de produção europeia estimada foi de 23 milhões de toneladas (EBB, 2015). No Brasil, a Lei nº 11.097, publicada em 13 de janeiro de 2005, introduziu o biodiesel na matriz energética brasileira, sendo fixado em 5% em volume o percentual mínimo obrigatório de adição de biodiesel ao óleo diesel comercializado (BRASIL, 2005). Dessa forma, o país se estabeleceu como um dos maiores produtores e consumidores de biodiesel do mundo, com uma produção anual, em 2013, de 2,9 bilhões de litros e uma capacidade instalada para produzir cerca de 7,9 bilhões de litros (BRASIL, 2015).

A produção de biodiesel ocorre por uma reação conhecida como transesterificação, na qual um triglicerídeo reage com um álcool (etanol ou metanol) em excesso. Geralmente 3 mols de álcool são usados para cada 1 mol de triglicerídeo. A transesterificação de triglicerídeos produz metil ésteres de ácidos graxos, quando o álcool utilizado é o metanol, ou etil ésteres, no caso do etanol, e glicerol. O processo global é normalmente uma sequência de três passos consecutivos, que são reações reversíveis. Diglicerídeos e monoglicerídeos são formados como intermediários na reação de transesterificação. No último passo, é gerado glicerol como subproduto (van GERPEN; KNOTHE, 2005) (Figura 2.1).

Tal processo tem sido amplamente utilizado para reduzir a alta viscosidade dos triglicerídeos, e pode ser acelerado pelo uso de um catalisador, o qual pode ser uma base, um ácido, ou uma enzima (MA; HANNA, 1999), resultando na formação de aproximadamente 10% em peso de glicerol (MEHER *et al.*, 2006).

Figura 2.1 – Reações gerais da transesterificação de triglicerídeos



R¹ = CH₃, se o álcool utilizado for o metanol ou CH₂CH₃ se for utilizado etanol
(adaptado de van GERPEN; KNOTHE, 2005; MEHER *et al.*, 2006)

Dentre as fontes para a produção de biodiesel encontra-se uma grande variedade de matérias-primas, que incluem os óleos vegetais de noz, soja, algodão, canola, amendoim, girassol, coco, palma (*Elaeis guineenses*), mamona (*Ricinus communis L.*), babaçu (*Orbignya phalerata Martius*), linhaça (*Linum usitatissimum L.*), macaúba (*Acrocomia aculeata*), pequi (*Caryocar brasiliense Cambess*), buriti (*Mauritia flexuosa*), gergelim (*Sesamum indicum L.*), pinhão-manso (*Jatropha curcas*), karanja (*Pongamia pinnata*), semente de tabaco (*Nicotiana tabacum L.*), farelo de arroz, mahua (*Madhuca indica*), nim (*Azadirachta indica*), seringueira (*Hevea brasiliensis*), e microalgas (BALAT, 2011; LOPES; STEIDLE NETO, 2011); gorduras animais (MA *et al.*, 1998; ÖNER; ALTUN, 2009), e óleos residuais de cozinha (ZHANG *et al.*, 2003; CHEN *et al.*, 2009). O biodiesel resultante é bastante semelhante ao óleo diesel convencional em suas principais características (MEHER *et al.*, 2006), sendo compatível com os modelos de motores existentes.

No Brasil, o algodão é a terceira matéria prima mais importante para a produção de biodiesel nacional (2-3%), ficando atrás do óleo de soja (76%) e da gordura bovina (21%). As demais matérias primas comumente usadas são óleo de fritura, óleo de palma (dendê), gordura de porco e gordura de frango (ANP, 2015). O óleo de semente de algodão é composto principalmente pelos ácidos linoleico (56%), palmítico (27%) e oleico (17%). Os 4% restantes é composto pelos ácidos mirístico, esteárico, araquidônico, beênico, palmitoleico e linolênico (GUNSTONE *et al.*, 2007). A maior parte das propriedades físicas e químicas do óleo de semente de algodão se assemelha aos dos principais óleos vegetais os quais também contêm triglicerídeos heterogêneos (RASHID *et al.*, 2009).

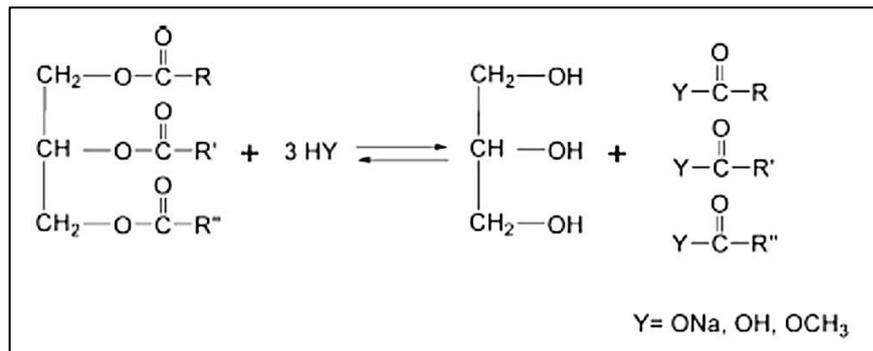
A quantidade de óleo presente na semente de algodão é baixa em relação a outras culturas (18%) (de SOUZA; SILVEIRA, 2011), entretanto o custo para produção de biodiesel a partir dessa matéria-prima é um dos mais baratos do mundo (ROYO, 2010). No Nordeste do Brasil, o algodão tornou-se a oleaginosa mais viável para a produção de biodiesel. Além

disso, o plantio de algodão traz oportunidades de negócio (entrada de pequenos produtores no mercado de energia renovável) e de inclusão social, uma vez que a produção de biodiesel a partir de óleo de semente de algodão trouxe à região uma situação de maior independência, não sendo mais necessária a importação de biodiesel de outras regiões do país (FERREIRA, 2011).

2.2 Glicerol

O glicerol pode ser produzido a partir de gorduras e óleos através do processo de saponificação formando glicerol e sabão (Figura 2.2, Y = ONa), por hidrólise produzindo glicerol e ácidos graxos (Figura 2.2, Y = OH) ou por transesterificação com álcoois produzindo glicerol e ésteres metílicos de ácido graxos (biodiesel) (Figura 2.2, Y = OCH₃) (BEHR *et al.*, 2008).

Figura 2.2 – Esquema da síntese do glicerol a partir de gorduras e óleos



Fonte: BEHR *et al.* (2008)

O glicerol, conforme já citado, é gerado como o principal subproduto da produção de biodiesel. Este glicerol (bruto) possui valor muito baixo devido às impurezas contidas, tais como monoglicerídeos, diglicerídeos e triglicerídeos não convertidos, sais inorgânicos (catalisador residual), álcool (metanol ou etanol) não convertido, pigmentos provenientes da matéria-prima, sabão e biodiesel (MEHER *et al.*, 2006; THOMPSON; HE, 2006). De um modo geral, obtém-se 1 kg de glicerol/10 kg biodiesel produzido.

O glicerol bruto contém ainda uma variedade de elementos provenientes do óleo primário, tais como potássio, fósforo, enxofre, sódio, carbono, nitrogênio e proteína. Diferentes quantidades de Na ou K estão presentes, dependendo do catalisador. Tendo em conta que a tecnologia de processamento de produção de biodiesel afeta as características dos

subprodutos, é esperado que as tecnologias e catalisadores utilizados exercessem influência na composição e utilização do glicerol bruto (SANTIBÁÑEZ *et al.*, 2011).

Embora o glicerol seja usado em diferentes indústrias – farmacêutica, cosmética, tintas, alimentos, explosivos, poliuretanos, etc. – o grande excesso gerado ultrapassa em muito a demanda do mercado e exigiria etapas de purificação dispendiosas para uso destas indústrias (AYOUB; ABDULLAH, 2012). Por isso, a disposição do glicerol bruto pode vir a ser um problema ambiental que requer soluções alternativas (THOMPSON; HE, 2006; VIANA *et al.*, 2012). Vários métodos de disposição e de utilização do glicerol bruto têm sido investigados, como combustão, compostagem, alimentação para animais e conversões termoquímicas ou biológicas.

O glicerol bruto pode ser queimado como combustível com sucesso, promovendo uma chama estável e com oxidação quase completa do glicerol, sem a necessidade de misturas com combustíveis fósseis (BOHON *et al.*, 2011). Entretanto, a queima gera emissões muito elevadas de partículas e acroleína (STEINMETZ *et al.*, 2013), um aldeído insaturado altamente tóxico, gerado pela desidratação do glicerol induzida pelo calor (STEVENS; MAIER, 2008).

O sistema de compostagem pode ser adequado para uma pequena planta de produção de biodiesel, uma vez que é possível realizar o processo com baixos custos iniciais de funcionamento, sem a necessidade de aquisição de tecnologias especiais. A quantidade inicial adequada de glicerol bruto adicionado ao composto foi determinada como sendo de 8% - 20% em peso de glicerol por peso seco de serragem (SADANO *et al.*, 2010).

Glicerol de diferentes purezas pode substituir amidos rapidamente fermentáveis em dietas para ruminantes até concentrações de 10% da matéria seca da dieta sem afetar negativamente o consumo de alimentos e da água, e a degradação ruminal e digestibilidade dos nutrientes (SCHRÖDER; SÜDEKUM, 2015). A eficiência alimentar na dieta de novilhos em confinamento foi melhorada através do aumento do nível de glicerol (60 - 178 g/kg dieta), sem consequências negativas sobre o desempenho da produção (EIRAS *et al.*, 2014).

A geração de gás combustível a partir da conversão termoquímica de glicerol bruto misturado com biomassa foi estudada por Sricharoenchaikul e Atong (2012), indicando que os produtos de co-gaseificação de resíduos mistos da produção de biodiesel podem ser usados para geração de energia. O glicerol bruto também pode ser convertido termoquimicamente em biopolióis, matéria prima para a produção de espumas de poliuretano renováveis,

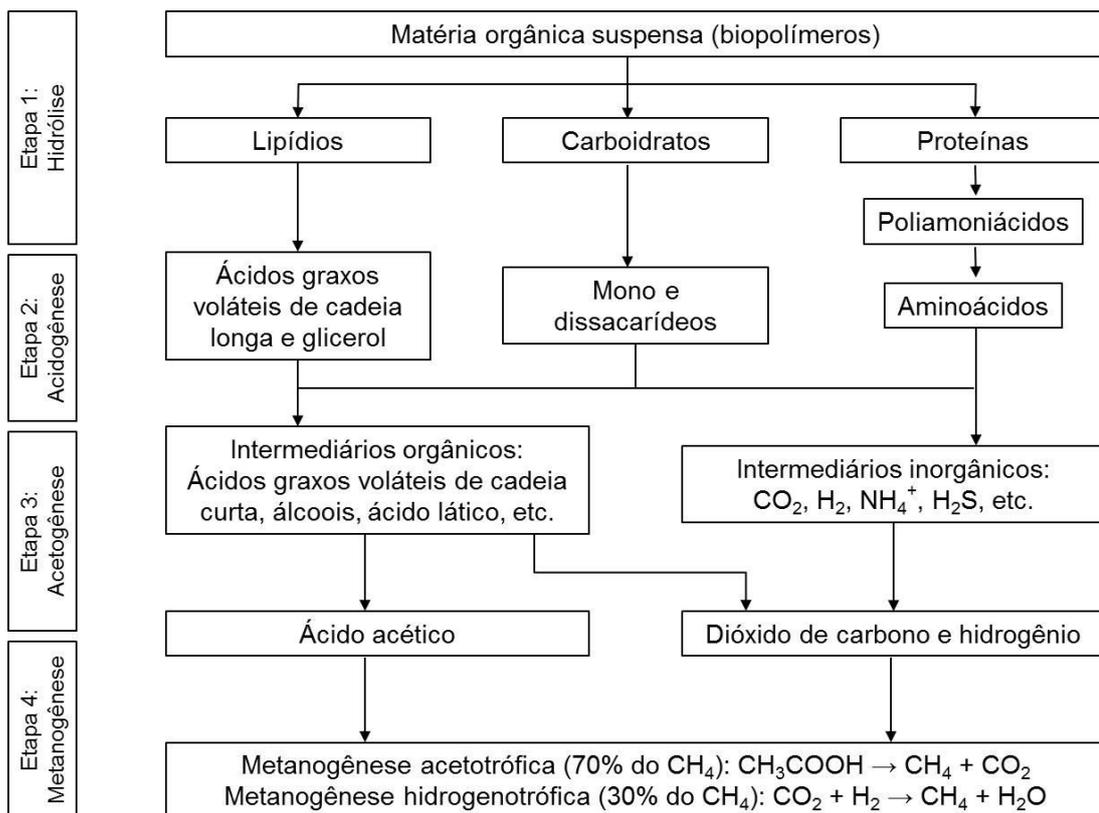
biodegradáveis e mais baratas quando comparadas às espumas obtidas através de processos que utilizam combustíveis fósseis (LUO *et al.*, 2013).

A seguir (tópicos 2.3 e 2.6), as vias biológicas de conversão do glicerol em produtos de valor agregado serão comentadas.

2.3 Metabolismo de glicerol por vias anaeróbias

O processo de digestão anaeróbia é dividido em quatro estágios principais: hidrólise, formação de ácidos ou acidogênese, formação de acetato ou acetogênese e formação de metano ou metanogênese (Figura 2.3). Estes processos contêm diferentes grupos de microorganismos, os quais trabalham em sequência. Dessa forma, os produtos de um grupo tornam-se os substratos para outro grupo (GERARDI, 2003, APPELS *et al.*, 2008).

Figura 2.3 – Esquema da digestão anaeróbia de matéria orgânica complexa



(Adaptado de MADSEN *et al.*, 2011)

A hidrólise é a etapa de solubilização (lise) de compostos orgânicos complexos, executada por bactérias anaeróbias, em substâncias mais simples. A seguir, estes produtos são digeridos por uma diversidade de bactérias anaeróbias, estritas ou facultativas, através de

processos fermentativos. A degradação destes compostos resulta na formação de dióxido de carbono, gás hidrogênio, álcoois, cetonas e ácidos, em sua maioria ácidos orgânicos voláteis (GERARDI, 2003).

Estes produtos serão transformados por bactérias acetogênicas em hidrogênio, dióxido de carbono e ácido acético, os quais serão utilizados diretamente pelos micro-organismos metanogênicos na fase final (GERARDI, 2003).

Na metanogênese, a quarta e última etapa, micro-organismos anaeróbios estritos são responsáveis pela formação do metano a partir do acetato ou do hidrogênio e dióxido de carbono. Ácidos, álcoois e outros compostos que não foram transformados em acetato e H₂ ou não são degradados pelos micro-organismos produtores de metano acumulam-se nos sistemas, tais como reatores, levando a um aumento da demanda química e à queda do pH (GERARDI, 2003).

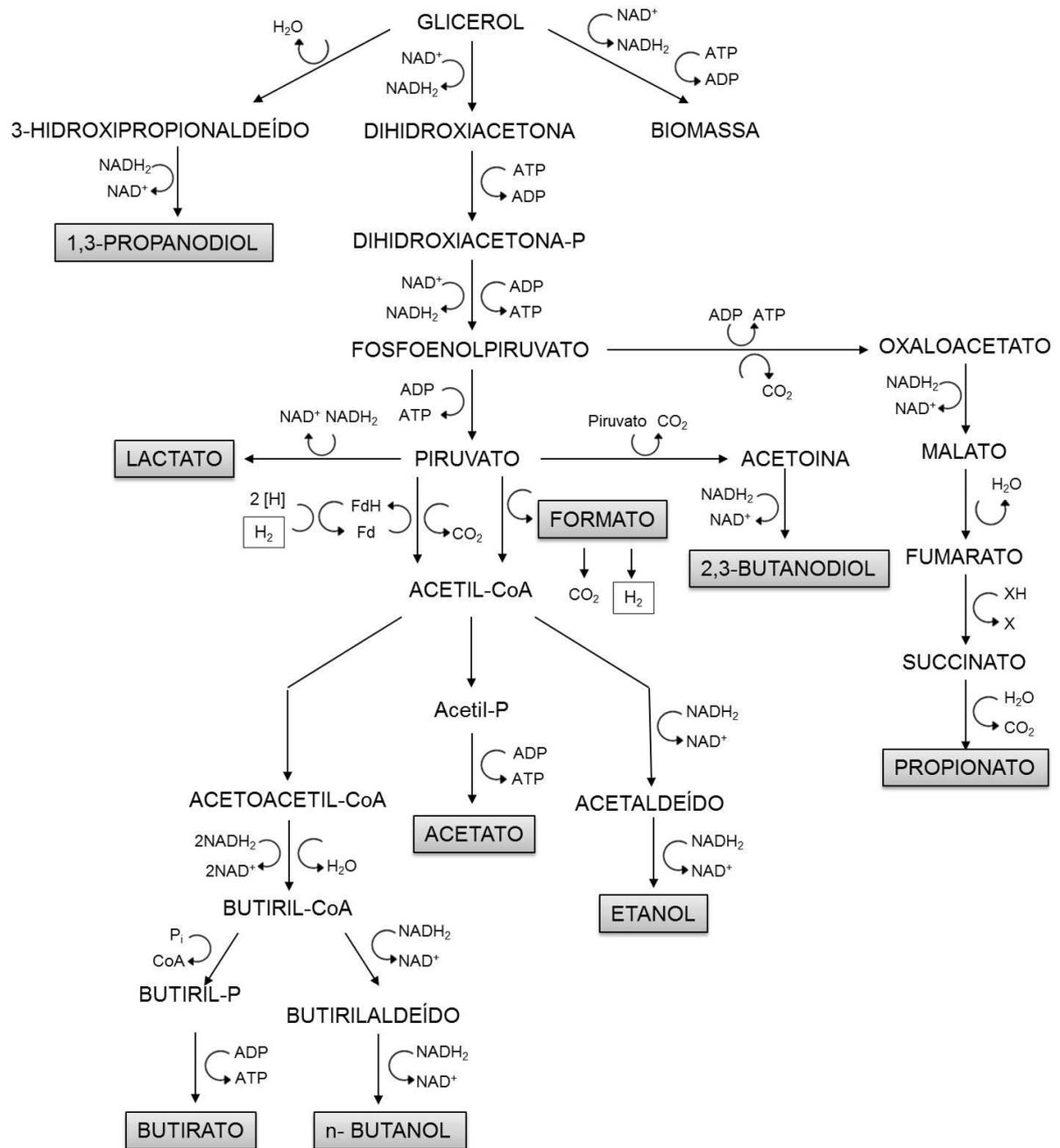
O metabolismo fermentativo de glicerol foi estudado em maiores detalhes para as bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Clostridium* e *Lactobacillus* (BEHR *et al.*, 2008; SAXENA *et al.*, 2009). A Figura 2.4 ilustra as vias bioquímicas para fermentação do glicerol, o qual pode ser metabolizado tanto de maneira redutiva quanto oxidativa. A conversão redutiva de glicerol consiste de uma desidratação mediada pela vitamina B₁₂ a 3-hidroxiacetaldeído e uma redução do aldeído a 1,3-propanodiol. Na via oxidativa, o glicerol é desidrogenado a dihidroxiacetona que, após fosforilação, pode ser convertida em piruvato ou succinato, o qual é subsequencialmente convertido em propionato (BIEBL *et al.*, 1999). A partir do piruvato podem ser gerados compostos, tais como 2,3-butanodiol, lactato, butirato, etanol, formato, acetato, hidrogênio e dióxido de carbono, dependendo das condições ambientais e das enzimas que mediam a reação, ou seja, a formação do produto final irá variar de organismo para organismo (VIANA *et al.*, 2012).

A estequiometria da digestão anaeróbia de glicerol pode ser sintetizada através da Equação 2.1 (LÓPEZ *et al.*, 2009).



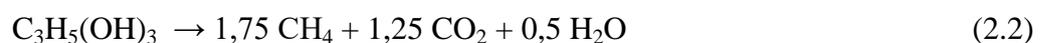
Os produtos da reação são o metano, dióxido de carbono, biomassa e bicarbonato de amônia, onde a, b, c, d, e são coeficientes estequiométricos, que respectivamente assumem os valores de 0,663, 1,648, 0,526, 0,041 e 0,622 mol.

Figura 2.4 – Produtos finais da fermentação do glicerol por diferentes micro-organismos



Adaptado de BIEBL *et al.* (1999); da SILVA *et al.* (2009)

A produção teórica de metano por mol de glicerol também pode ser estimada pela aplicação da Equação 2.2 (BUSWELL; NEAVE, 1930).



Assumindo-se condições ideais de temperatura e pressão (0 °C e 1 atm), o rendimento volumétrico teórico de metano é de 0,426 L CH₄/g glicerol.

O rendimento teórico de CH_4 também pode ser determinado com base na DQO do glicerol. A DQO teórica do glicerol para sua completa oxidação é igual a 1,22 g DQO/g glicerol. Portanto, o rendimento teórico de CH_4 a partir de glicerol com base na DQO é de 0,350 L CH_4 /g DQO.

2.4 História dos reatores anaeróbios

O tratamento anaeróbio foi relatado em meados do século XIX como sendo um método útil para a redução da natureza putrescível do material orgânico suspenso removido de águas residuárias municipais. Desde então a aplicação de tecnologias anaeróbias tem crescido devido à possibilidade de tratamento de uma ampla variedade de resíduos orgânicos agrícolas, industriais e municipais; e pelo fato de gerar como subproduto o gás metano, o qual pode ser usado como combustível para ajudar a compensar a crescente demanda por energia (McCARTY, 1981).

Até a década de 1930, os dois sistemas clássicos mais utilizados eram o tanque séptico e o tanque Imhoff, os quais se caracterizam pelo fluxo horizontal de águas residuárias através do sistema na parte superior, enquanto o lodo anaeróbio descansa/sedimenta na parte inferior dos tanques. Foi também nesta década que o uso de tanques de digestão aquecidos tornou possível o uso do metano produzido no processo anaeróbio (McCARTY, 1981; van HAANDEL *et al.*, 2006).

Após a década de 1930 esses dois sistemas clássicos passam a perder espaço para os sistemas de tratamento aeróbios, tais como o filtro biológico e os lodos ativados. Ambos sistemas ainda são aplicados hoje em muitos países, especialmente para tratamento local de águas residuárias de habitações individuais ou para pequenas comunidades. Outro tipo de reator, neste caso, de fluxo horizontal, é a lagoa anaeróbia, normalmente utilizada associada a outras unidades de lagoas de estabilização de resíduos (van HAANDEL *et al.*, 2006).

Nos anos 1950, dois desenvolvimentos foram de particular importância, um foi a utilização de misturadores em digestores e o outro era o desenvolvimento do processo de contato anaeróbio. Em 1969, Young e McCarty alcançaram longos tempos de retenção da biomassa ao operar um filtro anaeróbio de fluxo ascendente, tratando resíduos orgânicos solúveis de baixa carga provenientes de uma destilaria de rum. Esta nova configuração levou a uma baixa produção de sólidos, minimizando os problemas de manuseio e eliminação de lodos. Outras vantagens oferecidas foram a falta de necessidade de usar misturadores, sistema

de aquecimento ou recirculação, o que resulta em uma instalação de tratamento com baixo consumo de energia e com facilidade de manutenção (YOUNG; MCCARTY, 1969).

Os resultados obtidos até então levaram ao estabelecimento de dois requisitos essenciais para o tratamento anaeróbio de alta capacidade e com alta eficiência: o contato intenso entre substrato e biomassa, e a grande retenção de massa bacteriana no interior dos reatores (van HAANDEL *et al.*, 2006). Assim, Lettinga *et al.* (1980) desenvolveram o reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket* - UASB).

O dispositivo mais característico do reator UASB é o separador de fases, colocado na parte superior, dividindo o reator em uma parte inferior - a zona de digestão -, e uma parte superior - a zona de sedimentação. O efluente é introduzido tão uniforme quanto possível a partir do fundo do reator, passa através do leito de lodo e entra na zona de sedimentação através de aberturas entre os elementos do separador de fases e é sedimentado de maneira uniforme na superfície. O biogás produzido na zona de digestão é capturado pelo separador, de modo que a sedimentação pode ter lugar sem impedimentos na zona superior. Para evitar o bloqueio da saída de biogás e permitir a separação das bolhas de biogás das partículas de lodo, uma câmara de gás é introduzida sob o separador de fases. As partículas de lodo sedimentadas no separador de fases, eventualmente, deslizam de volta para a zona de digestão. Desse modo, o sistema mantém uma grande massa de lodo no interior do reator, enquanto um efluente praticamente isento de sólidos em suspensão é descartado. O contato entre a biomassa e a água residuária (substrato) é promovida pela agitação provocada pela produção de biogás e pelo fluxo afluyente ascendente. A velocidade de fluxo ascendente pode ser aumentada pela aplicação da recirculação do efluente (LETTINGA, 1995).

O reator UASB é de longe o sistema anaeróbio de alta taxa mais amplamente utilizado para o tratamento anaeróbio de águas residuárias, especialmente em condições tropicais ou subtropicais (van HAANDEL *et al.*, 2006). O UASB pode ser aplicado com altas cargas orgânicas ($> 25 \text{ kg DQO/m}^3 \cdot \text{dia}$) para diferentes efluentes industriais variando em DQO desde $1,5 \text{ kg/m}^3$ a mais de 100 kg/m^3 . O processo é viável para águas residuárias solúveis e parcialmente solúveis, de alta carga e carga muito baixa, como por exemplo, esgotos domésticos (LETTINGA, 1995).

Após o desenvolvimento do UASB convencional, algumas versões modificadas de reatores anaeróbios têm sido propostas, visando melhorar certas características ou ampliar sua aplicação. O reator granular de leito expandido (*Expanded Granular Sludge Blanket* - EGSB) foi desenvolvido para superar alguns problemas que podem ocorrer no reator UASB

convencional, tais como fluxos preferenciais, curto-circuitos hidráulicos e zonas mortas no leito de lodo granular. A solução está na aplicação de maior velocidade de fluxo ascendente do líquido afluente, o que pode ser conseguido através de uma adequada relação altura/diâmetro ou através da recirculação do efluente. No sistema EGSB uma fração significativamente maior da biomassa imobilizada é posta em contato com as águas residuárias e participa no processo. Como resultado, cargas orgânicas mais elevadas podem ser aplicadas nesse sistema (LETTINGA, 1995; van HAANDEL *et al.*, 2006).

Outras configurações incluem o reator anaeróbio de leito fixo empacotado (*Anaerobic Packed-Bed Reactor* - APBR), cuja forma de retenção da biomassa se dá por meio de suporte inerte onde se forma um biofilme; o reator anaeróbio de membrana (*Anaerobic Membrane Reactor* - AnMBR), que pode ser operado a tempos de detenção hidráulica muito baixos (< 3 h), retém bactérias de crescimento lento as quais normalmente são lavadas do sistema, produz efluentes livres de sólidos devido a retenção de partículas orgânicas lentamente degradáveis dentro do reator, e ainda possibilita a reciclagem de nutrientes (nitrogênio e fosforo). O reator de mistura completa (*Continuous Stirred-Tank Reactor* - CSTR), por sua vez, é um digestor anaeróbio que tem sido amplamente utilizado em estações de tratamento de águas residuárias para estabilização e redução da matéria orgânica e micro-organismos excedentes presentes em lodos. Os reatores acima citados tiveram seus avanços recentes relatados por Singh e Perna (2009), Stuckey (2012) e Hurtado *et al.* (2015), respectivamente.

2.5 Desempenho de sistemas anaeróbios usando glicerol bruto como substrato

Nos últimos anos, o glicerol residual tem sido amplamente estudado em diferentes sistemas de tratamento anaeróbios. O tratamento anaeróbio de glicerol bruto como substrato orgânico sob condições mesofílicas é possível, apesar dos efeitos de inibição e exigências específicas decorrentes da natureza e da composição do glicerol (LÓPEZ *et al.*, 2009; KOLESÁROVÁ *et al.*, 2011). Siles *et al.* (2010) apontaram algumas vantagens da digestão anaeróbia de glicerol para a redução de custos da fabricação do biodiesel, tais como baixa necessidade de água limpa para diluição e de nutrientes, alta eficiência e produção de metano. A revalorização de glicerol através da digestão anaeróbia utilizando lodo granular alcançou biodegradabilidade de cerca de 100%, enquanto o rendimento de metano foi $0,306 \text{ m}^3 \text{ CH}_4/\text{kg}$ glicerol (LÓPEZ *et al.*, 2009). Além disso, a adição de glicerol bruto em digestores anaeróbios (do tipo CSTR) tratando lodo em estações de tratamento de águas residuárias, leva ao aumento do rendimento de biogás (FOUNTOULAKIS *et al.*, 2010). A acidificação do

glicerol bruto com H_3PO_4 e centrifugação possibilita, ainda, a recuperação do catalisador alcalino (KOH) utilizado na reação de transesterificação como fertilizante agrícola (fosfatos de potássio) (LÓPEZ *et al.*, 2009).

A produção de biogás é uma opção promissora para geração de energia renovável, e muitos dos estudos previamente realizados envolvem a co-digestão do glicerol. Fountoulakis e Manios (2009) avaliaram a produção de metano e hidrogênio a partir de resíduos sólidos urbanos e subprodutos agro-industriais co-digeridos com glicerol bruto. Um reator tratando a fração orgânica de resíduos sólidos urbanos produziu 1,40 L de CH_4/d antes da adição de glicerol e 2,09 L de CH_4/d depois da adição de glicerol; o rendimento de hidrogênio foi de 2,9 mmol H_2/g de glicerol. A taxa de produção de metano passou de 0,48 L/d a 1,21 L/d, após a adição de 1% v/v de glicerol bruto a uma mistura (1:4) de águas residuárias de fábrica de azeitona e de matadouro; e o rendimento de hidrogênio foi igual a 0,7 mmol H_2/g de glicerol. Kacprzak *et al.* (2010) examinaram a co-digestão de silagem de milho, silagem de polpa de beterraba, resíduos de cenoura e soro de queijo com glicerol bruto num biorreator (25 L) operado em modo semi contínuo. Os experimentos demonstraram que a combinação de silagem de milho, soro de queijo e glicerol resultou no maior teor de metano (61%), com taxa de produção de biogás de 1,8 L biogás/L reator por dia. A digestão anaeróbia de glicerol pré-tratado com ácido sulfúrico juntamente com dejetos de suínos foi investigada por Nuchdang e Phalakornkule (2012) na proporção de 80:20 DQO (glicerol:dejetos de suínos). Os resultados foram considerados satisfatórios sob cargas orgânicas entre 1,3, 1,7, 2,9 e 5,0 g DQO/L·d em termos de redução de DQO (> 80%) e teor de metano no biogás (62% em média). Contudo, ao aumentar a carga orgânica, os autores tiveram a taxa de produção de biogás diminuída significativamente, passando de 1,6 L CH_4/d quando a COV era igual a 1,3 e 1,7 g DQO/L·d para 0,94 L CH_4/d quando a COV atingiu 5,0 g DQO/L·d.

Reatores operados sob condições termofílicas também apresentam resultados promissores. Yang *et al.* (2008), por exemplo, alcançaram o rendimento 0,45 litros de metano por grama de carbono orgânico dissolvido adicionado operando um biorreator de leito fixo preenchido com poliuretano sob carga orgânica de 0,70 g/L·d. A co-digestão anaeróbia termofílica de estrume de porco suplementado com 3% de glicerol bruto (p/p) levou a uma produção específica de biogás 180% maior (0,47 $L_{biogás}/g SV_{alimentado}$) do que a obtida pelo digestor que foi alimentado só com estrume de porco (0,17 $L_{biogás}/g SV_{alimentado}$) (ASTALS *et al.*, 2013). De acordo com os autores, a melhora nos resultados estava relacionada com o

aumento da carga orgânica (o dobro), a alta biodegradabilidade do glicerol bruto, a redução da concentração de amônia e a otimização da relação carbono/nitrogênio.

2.6 Bioprodutos a partir do glicerol

O glicerol tem sido direcionado à produção de energia e/ou produtos com valor agregado. A conversão de glicerol em bioenergia (hidrogênio e eletricidade) foi investigada por Sharma *et al.* (2011) usando biorreatores produtores de hidrogênio (*Hydrogen Producing Bioreactors* - HPBs) e células microbianas de combustível. O glicerol pode ser transformado em compostos aditivos para combustíveis (SOUZA *et al.*, 2013), em células de combustível (ZHANG *et al.*, 2013), ou ainda na produção de poliésteres líquido ou sólido (BUENO *et al.*, 2014). Adicionalmente, os polímeros sólidos produzidos a partir de glicerol bruto podem ser usados como adsorvente para purificar o biodiesel obtido na própria usina, tornando o processo global mais econômico (BUENO *et al.*, 2014).

O glicerol pode ser usado para produção dos ácidos succínico (LEE *et al.*, 2001; CARVALHO *et al.*, 2014), lático (MURAKAMI *et al.*, 2015) ou propiônico (DISHISHA *et al.*, 2015). A produção de dióis (1,2-propanodiol (1,2-PDO) e 1,3-PDO) a partir de glicerol tem sido estudada através de processo de hidrogenólise (YUAN *et al.*, 2010; WOŁOSIAK-HNAT *et al.*, 2013), no caso de 1,2-PDO, ou através de crescimentos microbianos de *Citrobacter freundii* (ANAND; SAXENA, 2012; FERREIRA *et al.*, 2012), *Klebsiella pneumoniae* (DURGAPAL *et al.*, 2014; da SILVA *et al.*, 2014a), ou *Clostridium butyricum* (SZYMANOWSKA-POWAŁOWSKA; BIAŁAS, 2014), no caso de 1,3-PDO. A produção de etanol a partir da biotransformação de glicerol bruto (OH *et al.*, 2011) ou analítico (COFRÉ *et al.*, 2012) também tem sido estudada.

O hidrogênio, em muitos aspectos, é o combustível ideal: possui máximo rendimento energético por unidade de peso (122 kJ/g), sua combustão produz apenas água, pode ser utilizado em células de combustível e é facilmente convertido em eletricidade. O hidrogênio pode ser obtido a partir de diferentes processos, tais como reforma a vapor, oxidação parcial, reforma autotermal e reforma supercrítica da água (LEONETI *et al.*, 2012), no entanto estas formas de produção são insustentáveis e poluentes. A partir dos pontos de vista econômico e ambiental, para ser sustentável e aceitável, a produção biológica de H₂ a partir de resíduos orgânicos, através de fotofermentação ou fermentação ácida (fermentação escura), poderia ser a solução (BALAT; KIRTAY, 2010). Mangayil *et al.* (2012) avaliaram o potencial de bioconversão do glicerol bruto em hidrogênio por uma comunidade microbiana enriquecida.

Lo *et al.* (2013), por outro lado, estudaram o potencial de conversão de glicerol bruto por sete cepas de bactérias produtoras de hidrogênio (*Clostridium butyricum*, *C. pasteurianum* e *Klebsiella* sp.). Chookaew *et al.* (2015) investigaram a produção de hidrogênio a partir de glicerol bruto em dois estágios: por fermentação escura usando *Klebsiella* sp. TR17 e fotofermentação usando *Rhodospseudomonas palustris* TN1 em experimentos de batelada, alcançando rendimento total de 6,42 mmol H₂/g DQO_{consumida}.

Alguns estudos têm focado na produção de H₂ associado a outros subprodutos de valor agregado. Ito *et al.* (2005) relatam a produção de H₂ (taxa máxima de produção igual a 63 mmol/L·h) e etanol (0,85 mol/mol glicerol) por *Enterobacter aerogenes* HU-101 a partir de efluentes da indústria de biodiesel, usando reator preenchido com cerâmica porosa como meio de suporte para a biomassa. Em estudo mais recente, Varrone *et al.* (2012) demonstraram que é possível obter altos rendimento e produção de hidrogênio e etanol conjuntamente, utilizando um meio mineral simples, sem uma solução de elementos traço e vitaminas, triptona ou extrato de levedura. A taxa de produção de hidrogênio alcançou 2,2 L H₂/L·d, concomitante com a produção máxima de etanol de cerca de 8 g/L (rendimento de 1 mol de etanol/mol de glicerol), a partir de 15 g/L de glicerol. Este trabalho é um dos poucos, ou talvez o único existente, em que foi estudada a produção conjunta de H₂ e etanol utilizando um cultivo misto como inóculo.

A possibilidade de integração da produção de H₂ e 1,3-propanodiol na produção de biodiesel foi estudada usando culturas mistas, cultivos puros, ou enriquecimento a partir de solos (SELEMBO *et al.*, 2009; KIVISTÖ *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2013). Ambientalmente, isto representa a produção de dois combustíveis limpos e renováveis e a minimização dos fluxos de resíduos. Economicamente, a integração destes bioprocessos levaria à valorização dos fluxos de resíduos, tornando a empresa mais rentável (SELEMBO *et al.*, 2009).

2.7 1,3-propanodiol

O 1,3-propanodiol (1,3-PDO), trimetileno glicol ou polipropileno glicol é um composto alifático linear, líquido, incolor, inodoro, inócuo, miscível em água, álcool e éter (da SILVA *et al.*, 2014b). O 1,3-PDO pode ser sintetizado a partir de produtos petroquímicos através do processo Shell, que consiste na hidroformilação de óxido de etileno a 3-hidroxiopropanol seguido por hidrogenação, formando 1,3-PDO. Ou através do processo Degussa-DuPont, baseado na hidratação da acroleína a 3-hidroxiopropanol seguida por hidrogenação, formando 1,3-PDO (BEHR *et al.*, 2008).

O 1,3-PDO tem inúmeras aplicações em polímeros, cosméticos, alimentos, lubrificantes e medicamentos (CHENG *et al.*, 2007). É usado como monômero para a síntese de diversos poliésteres (politrimetileno tereftalato ou PPT, polipropileno tereftalato ou PTT); como extensor de cadeia para a síntese de poliuretanos, lubrificantes, solventes e como precursor nas indústrias química e farmacêutica, e finalmente, a biodegradabilidade dos plásticos contendo 1,3-PDO é maior em comparação com aqueles de polímeros totalmente sintéticos (BARBIRATO *et al.*, 1998).

Anteriormente, 1,3-PDO possuía mercado insignificante, quando comparado a outros produtos químicos a granel, devido à sua não disponibilidade em quantidade e qualidade suficientes. Nos últimos anos, com o desenvolvimento de processos biológicos atraentes, a produção de 1,3-PDO de alta qualidade comercial derivado de recursos renováveis de baixo custo pode competir com a produção a partir das petroquímicas (SAXENA *et al.*, 2009).

Por via biológica, o 1,3-PDO é altamente específico para a fermentação de glicerol e não pode ser obtido a partir de qualquer outra conversão anaeróbia (DECKWER, 1995). O glicerol, ao ser metabolizado por via reductiva, gera 3-hidroxi-propionaldeído através de uma desidratação mediada pela vitamina B₁₂ e uma redução do aldeído a 1,3-PDO (Figura 2.4) (BIEBL *et al.*, 1999).

Diferentes cepas microbianas, tais como *Clostridium*, *Klebsiella* e *Citrobacter* produzem 1,3-PDO a partir do glicerol como parte do seu metabolismo de regeneração de NADH. Como resultado da fermentação de glicerol por membros da família *Enterobacteriaceae*, geralmente há o acúmulo de dois produtos principais: 1,3-PDO e acetato (DROZDZYNSKA *et al.*, 2011). Por exemplo, quando *Citrobacter freundii* é empregado, a produção de 1,3-PDO pode ser acompanhada pela síntese de ácido acético, ácido láctico, ácido fórmico, ou ácido succínico (FERREIRA *et al.*, 2012; METSOVITI *et al.*, 2013). Entretanto, quando a fermentação se dá por *Klebsiella pneumoniae* e *Klebsiella* sp. HE-2, também pertencentes ao grupo das enterobactérias, os principais metabólitos produzidos são 1,3-PDO, 2,3-butanodiol e etanol (MU *et al.*, 2006; WONG *et al.*, 2011), ou ainda, 1,3-PDO, etanol, ácido láctico e ácido acético (ROSSI *et al.*, 2013). Quando a fermentação é conduzida por *Clostridium butyricum* (família *Clostridiaceae*), 1,3-PDO é o produto principal, seguido de ácido butírico e ácido acético como subprodutos (HIMMI *et al.*, 1999; PAPANIKOLAOU *et al.*, 2000; SZYMANOWSKA-POWAŁOWSKA; BIAŁAS, 2014).

A bioconversão de glicerol bruto em 1,3-PDO utilizando células imobilizadas de *K. pneumoniae* atingiu rendimentos de 0,65 mol 1,3-PDO/mol glicerol em 12 h de cultivo em

batelada; melhor resultado que o obtido em cultivo em batelada utilizando células livres suspensas (0,54 mol 1,3-PDO/mol glicerol em 16 h) (de SOUZA *et al.*, 2014). Quando *K. pneumoniae* foi cultivada em batelada alimentada, 58,0 g/L de 1,3-PDO foram obtidos, com rendimento de 0,35 g/g e produtividade total de 1,3 g/L·h (DURGAPAL *et al.*, 2014). Entretanto, esta era uma cepa mutante (*K. pneumoniae* Δ ldhA) devido à eliminação da síntese de lactato e o glicerol usado não era bruto. As concentrações mais elevadas de 1,3-PDO produzido por *C. butyricum* a partir de glicerol bruto foram 37 g/L em biorreator de 6,6 L em batelada e 71 g/L para operação em batelada alimentada (SZYMANOWSKA-POWAŁOWSKA; BIAŁAS, 2014). Metsoviti *et al.* (2013) alcançaram a produção de 1,3-PDO por *C. freundii* em batelada alimentada igual a 68,1 g/L, com rendimento de aproximadamente 0,40 g/g de glicerol consumido e produtividade de 0,79 g/L·h.

2.8 Fatores que influenciam a produção de 1,3-PDO e H₂

Como em qualquer processo de fermentação, diferentes fatores influenciam a produção de 1,3-PDO e H₂ a partir de glicerol.

(i) **Inóculo.** Tanto culturas puras quanto enriquecidas têm sido utilizadas. Muitos trabalhos sobre a conversão do glicerol em 1,3-PDO e H₂ foram realizados com enterobactérias, tais como *E. coli* modificada (GANESH *et al.*, 2012; PRZYSTAŁOWSKA *et al.*, 2015), e *Klebsiella* (BIEBL *et al.*, 1998; COSTA *et al.*, 2011; WONG *et al.*, 2011; ROSSI *et al.*, 2013). Outros autores optaram por usar culturas mistas, enriquecidas ou adaptadas a partir de diferentes inóculos para fermentar o glicerol: lodo ativado (VARRONE *et al.*, 2013), lodo tratando águas residuárias de destilaria e lodo de tanque acidificação (TEMUDO *et al.*, 2008), ou solo, adubo e lodo de digestor anaeróbico (SELEMBO *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2013). Assim, é possível obter uma comunidade microbiana estável e sem a necessidade de trabalhar sob condições de esterilidade.

A operação de um reator em escala real com espécies puras apresenta uma série de desafios que podem torná-la economicamente inviável: (i) manutenção da cultura axênica, isto é, livre de outros organismos, especialmente quando o substrato não é estéril (impossibilidade de esterilizar o glicerol bruto de partida), (ii) necessidade de suplementar o meio de cultura com uma fonte de material orgânico adicional (tipicamente de extrato de levedura e tripton ou pepton), (iii) potencial patogenicidade de cepas utilizadas (enterobactérias e clostrídios), (iv) manutenção de condições anaeróbias estritas, e (v) muitas das cepas descritas na literatura (por exemplo, *Enterobacter agglomerans* CNCM 1210 e

Clostridium butyricum CNCM 1211 – BARBIRATO *et al.*, 1995; *Klebsiella* sp. TR17 – CHOOKAEW *et al.*, 2014; *K. pneumoniae* J2B – DURGAPAL *et al.*, 2014) foram isolados pelos próprios investigadores e podem ser de difícil acesso.

As culturas enriquecidas apresentam o problema da escolha do inóculo original e da definição das condições de fermentação que conduzam a pressão seletiva para os produtos desejados, com a menor quantidade possível de subprodutos (acetato, butirato, propionato, etc.). Além disso, o processo de enriquecimento pode demorar muito tempo. No entanto, facilitam o trabalho em escala industrial, reduzindo os custos de operação por não exigirem condições estéreis e, aparentemente, são menos exigentes quanto ao meio de cultura.

(ii) **Meio de cultura.** Para cada inóculo particular e glicerol bruto - uma vez que a quantidade e composição das impurezas variam -, se faz necessário otimizar o meio de cultura, a fim de minimizar os custos de produção. De fato, elevados custos de produção costumam ser o principal gargalo na produção de H₂ por fermentação (SARMA *et al.*, 2013). Devem ser considerados o meio mineral base (com ou sem a adição de elementos traço, meios tamponados ou não), a adição de vitaminas ou não, extratos de levedura ou triptona/peptona, para citar os componentes mais comuns.

Himmi *et al.* (1999), trabalhando com *Clostridium butyricum*, utilizaram um meio mineral com baixo teor de nutrientes suplementado com biotina (0,4 µg/l) para alcançar altas concentrações de 1,3-PDO (65,4 g/l ou 0,66 mol/mol). Um meio mínimo também foi usado por Varrone *et al.* (2013). Neste caso, para converter o glicerol bruto em H₂ usando lodo ativado enriquecido. O uso de meios simples favorece um processo de fermentação de baixo custo, um fator importante para a conversão de subprodutos industriais em compostos de valor agregado (HIMMI *et al.*, 1999). Por outro lado, meios minerais mais complexos foram eleitos por Gallardo *et al.* (2014) e de Souza *et al.* (2014)

(iii) **Temperatura e pH.** Ambos são fatores chave para o crescimento de qualquer micro-organismo. No entanto, os micro-organismos envolvidos na fermentação de glicerol a 1,3-PDO e H₂ são enterobactérias e clostrídios, cujas temperaturas ótimas se encontram entre 35-37 °C (organismos mesofílicos). Como exemplo, 37 °C foi a temperatura escolhida para os trabalhos de Varrone *et al.* (2013), Gallardo *et al.* (2014), Jolly *et al.* (2014) e de Souza *et al.* (2014). Independentemente da temperatura na qual se façam os ensaios em laboratório, a economia do processo em escala industrial determinará a temperatura de trabalho, por isso, esta não é considerada como uma variável a ser estudada. Não é assim com o pH inicial,

embora a faixa considerada ideal seja entre 5,5-8,0, dependendo do inóculo utilizado (BARBIRATO *et al.*, 1998; KHANAL *et al.*, 2004; SATTAYASAMITSATHIT *et al.*, 2011).

2.9 Design de experimentos

O design de experimentos (*Design of Experiments* – DOE) é uma abordagem sistemática utilizada para entender como parâmetros de processo afetam as variáveis resposta, tais como, processabilidade, propriedades físicas, ou desempenho de produtos (WAGNER *et al.*, 2014). O DOE é uma ferramenta fundamental no mundo científico e da engenharia. Sua aplicação no início do desenvolvimento do processo permite alcançar melhores rendimentos, variabilidade reduzida, maior conformidade com os requerimentos alvo, economia de tempo e redução de custos. Dessa forma, dados específicos serão coletados e analisados através de ferramentas estatísticas, resultando em conclusões válidas e objetivas (MONTGOMERY, 2008).

Num design experimental, quando se deseja fazer a triagem de um grande número de fatores com o mínimo número de testes e identificar quais fatores são importantes para o processo, é necessário realizar testes de triagem (*screening tests*) (MASON *et al.*, 2003). Plackett e Burman desenvolveram uma classe especial de experimentos fatoriais fracionários em dois níveis (baixo: -1 e alto: +1), disponíveis para um número de testes igual a um múltiplo de quatro, isto é, 8, 12, 16, 20, 24 e 32. Tais experimentos são baseados em modelos de primeira ordem (Equação 2.3), onde Y é a resposta, β_0 é o ponto de interseção do modelo, β_i é o coeficiente linear e X_i é o nível da variável independente, isto é, da variável a ser testada (PLACKETT; BURMAN, 1946).

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i \quad (\text{Eq. 2.3})$$

Para permitir a estimativa do erro experimental, é recomendado que o design possua, no mínimo, seis testes a mais que o número de fatores incluídos no experimento. Para minimizar os erros, a sequência do teste experimental deve ser aleatória (MASON *et al.*, 2003).

Após a obtenção dos dados, é feita uma análise de variância (ANOVA). A ANOVA é uma ferramenta estatística usada como teste de diagnóstico. Esta ferramenta irá estimar diferentes tipos de variabilidade nos dados de resposta, e, em seguida, irá comparar estas estimativas umas com as outras por meio do teste Fisher (F). O teste F, por sua vez, avalia a significância do modelo. Testes de significância, tais como o teste F, *t student* e *t* pareado,

consistem na comparação dos valores de um conjunto de resultados com o valor verdadeiro ou com os valores de outros conjuntos de resultados, permitindo assim verificar a acurácia e a precisão do modelo. Adicionalmente, o teste F é avaliado através da análise dos valores de probabilidade (p). Quando $p < 0,05$, este teste é satisfeito, isto é, o modelo é estatisticamente significativo, ao nível α de significância escolhido (ERIKSSON *et al.*, 2008).

Alguns estudos tem reportado o uso de DOE para otimizar a produção de hidrogênio e/ou 1,3-PDO, no entanto a maioria dos mesmos se refere a culturas puras ou enriquecidas. Guo *et al.* (2009) estudaram a otimização das condições de cultivo para produção de hidrogênio por *Ethanoligenens harbinense* B49 utilizando o design de Plackett-Burman, seguido do design de Box-Behnken. Rossi *et al.* (2013) investigaram a influência de 11 variáveis para otimizar a bioconversão de glicerol residual da síntese de biodiesel em 1,3-PDO por uma nova estirpe de *Klebsiella pneumoniae* utilizado design de Plackett-Burman e design fatorial fracionário. Mangayil *et al.* (2015) analisaram a produção de hidrogênio a partir de glicerol bruto por cultura microbiana enriquecida (com predomínio de *Clostridium* sp.) através dos designs de Plackett-Burman, Box-Behnken e Composto Central (*Central Composite Design – CCD*).

Poucos estudos foram encontrados sobre a bioconversão de glicerol em 1,3-PDO ou H₂ através de culturas mistas por meio de análises de DOE. Sittijunda e Reungsang (2012) investigaram a produção de hidrogênio a partir de glicerol residual e lodo anaeróbio por culturas mistas, utilizando a metodologia de superfície de resposta (*Response Surface Methodology – RSM*) com CCD. O DOE foi aplicado para melhorar a capacidade de uma cultura microbiana mista (lodo enriquecido) em converter glicerol bruto em hidrogênio e etanol, através da aplicação dos designs de Plackett-Burman e Box-Behnken, seguidos de RSM (VARRONE *et al.*, 2012).

2.10 Ecologia de micro-organismos

A Ecologia Microbiana é definida como o estudo das relações entre os micro-organismos que habitam um ecossistema e suas relações entre si e com o meio ambiente. Este campo da ciência busca entender como funcionam os ciclos biogeoquímicos, o papel de micro-organismos em processos de biorremediação e como os micro-organismos podem contribuir no fornecimento de fontes de energia alternativas (MEHROTRA, 2009).

Os métodos em ecologia microbiana incluem métodos clássicos como cultivo, isolamento e enriquecimento de micro-organismos; métodos de coloração, voltados à

quantificação ou à avaliação da viabilidade celular; ou métodos de detecção a partir da análise de genes, utilizados como medida da biodiversidade. Duas das principais técnicas empregadas nesse tipo de análise de comunidades microbianas (análises de Ecologia molecular microbiana) são a eletroforese em gel de gradiente desnaturante (*Denaturant Gradient Gel Electrophoresis* – DGGE) e a clonagem molecular, seguidas pelo sequenciamento e análise do DNA (MADIGAN *et al.*, 2010). Ambas requerem como passo prévio a reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* – PCR). Entretanto, análises microscópicas podem fornecer dados complementares sobre a morfologia da comunidade microbiana dos lodos durante os processos anaeróbios (DÍAZ *et al.*, 2006; FERNÁNDEZ *et al.*, 2008; SI *et al.*, 2015).

2.10.1 Análises de biologia molecular

Vários genes são utilizados nos estudos de filogenia molecular dos micro-organismos. Os mais amplamente utilizados e úteis para a definição de relações são os genes que codificam o RNA ribossomal da subunidade menor (RNAr 16S). Carl Woese foi o primeiro a usar o RNAr 16S em estudos filogenéticos, no início da década de 1970. Woese estabeleceu a nova classificação dos micro-organismos em três domínios (*Bacteria*, *Archaea* e *Eukaria*) e, utilizando catálogos de oligonucleotídeos, estabeleceu o grau de semelhança entre sequências homólogas como critérios taxonômicos entre distintos organismos (MADIGAN *et al.*, 2010).

Em uma análise de comunidade, o DNA total é extraído de uma amostra de um habitat microbiano. O DNA obtido é uma mistura do DNA genômico de todos os micro-organismos presentes na amostra. A partir dessa mistura, é feita uma PCR para amplificar o gene de interesse. A PCR baseia-se numa série de ciclos, cada um dos quais envolve reações, efetuadas a temperaturas diferentes, de desnaturação de DNA, anelamento de *primers* (ou iniciadores) e alongamento (ou síntese) de DNA por uma enzima polimerase termoestável (MEHROTRA, 2009). Cada ciclo demora alguns minutos e o resultado final é a grande amplificação das sequências de DNA delimitadas pelos dois *primers* usados na reação (WAGES, 2005). O RNAr 16S é uma molécula altamente conservada ao longo da evolução, e abundante em todos os seres vivos, embora possua algumas regiões altamente variáveis (SANZ; KÖCHLING, 2007). A amplificação dos genes que codificam para o RNAr 16S permite a comparação de organismos dentro do mesmo domínio, bem como a diferenciação das estirpes de uma mesma espécie, uma vez que cada espécie presente apresentará sua própria sequência peculiar de DNA (MADIGAN *et al.*, 2010).

Após a amplificação, estas sequências devem ser separadas. A DGGE é um método de separação, que resulta na presença de bandas em um gel, as quais correspondem a fragmentos de genes de um mesmo tamanho, mas que possuem diferentes perfis de desnaturação devido às distinções em sua sequência primária de bases (MUYZER *et al.*, 1993). É utilizado um gel de poliacrilamida, contendo um gradiente linear de agentes desnaturantes (uma mistura de uréia e formamida). Os fragmentos de DNA de diferentes sequências terão um comportamento diferenciado de desnaturação, e irão parar sua migração em diferentes posições do gel (MUYZER; SMALLA, 1998). Para prevenir a dissociação completa das bandas de DNA, uma calda (também conhecida como “grampo”) com alto conteúdo de GC é adicionada na extremidade 5’ de um dos *primers* (SCHÄFER; MUYZER, 2001).

Esta técnica permite a análise simultânea de amostras múltiplas, permitindo assim o monitoramento da complexa dinâmica das comunidades microbianas (MUYZER, 1999). Sendo assim, a DGGE é muito adequada para detectar alterações na composição microbiana ao longo do tempo, ou para comparar a composição microbiana de diferentes biorreatores. Além disso, diferentes tipos de informação podem ser obtidos a partir da análise do padrão de bandas do DGGE, como o número, posição (presença ou ausência de uma banda em particular) e a intensidade relativa das bandas (SCHÄFER; MUYZER, 2001). Uma vez realizada a DGGE, as bandas podem ser excisadas, sequenciadas e analisadas filogeneticamente, o que pode fornecer uma boa visão geral da composição da comunidade microbiana (SANZ; KÖCHLING, 2007).

Dessa forma, DGGE tem sido usada para comparar a estrutura da comunidade microbiana em dois reatores anaeróbios inoculados com diferentes lodos (KIM *et al.*, 2013), para investigar as mudanças na população microbiana em reator EGSB (GALLARDO *et al.*, 2014; CISNEROS-PÉREZ *et al.*, 2015), ou ainda para determinar a diversidade de populações redutoras de sulfato (SANTEGOEDS *et al.*, 1998; DAR *et al.*, 2007).

2.10.2 Microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) pode ser empregada quando se deseja observar as características externas, como a topografia da superfície de um espécime; ou examinar os micro-organismos residentes em nichos ecológicos, como por exemplo, lodo granular (DÍAZ *et al.*, 2006) e biofilmes (FERNÁNDEZ *et al.*, 2008; SI *et al.*, 2015). Na MEV o espécime é previamente fixado e desidratado para prevenir o colapso das células quando forem submetidas ao vácuo no interior do microscópio eletrônico de varredura. As

amostras já desidratadas são cobertas com uma camada fina de um metal pesado, como ouro ou platina. O feixe de elétrons do microscópio eletrônico de varredura, dispersos pelo metal, são coletados, ativando um écran que gera uma imagem tridimensional em preto e branco (MEHROTRA, 2009; MADIGAN *et al.*, 2010).

Capítulo 3 – Digestão anaeróbia de glicerol bruto proveniente da produção de biodiesel

3.1 Introdução

A produção de energia a partir de combustíveis fósseis não renováveis não é ambientalmente adequada. Uma boa fonte de energia alternativa é o biodiesel, especialmente porque é renovável. Outras vantagens do biodiesel em relação aos combustíveis fósseis não renováveis são menores concentrações de enxofre e de substâncias aromáticas, maior biodegradabilidade e sua não toxicidade.

Atualmente, muitos países ao redor do mundo têm explorado o uso comercial de misturas de biodiesel em veículos, incluindo os EUA, Argentina, União Europeia, Japão, Índia e Tailândia (EUROPEAN PARLIAMENT, 2009; YUSUF *et al.*, 2011). No Brasil, o uso de biodiesel misturado ao diesel está crescendo devido à legislação sobre combustível. A princípio, o mandato para o uso de biodiesel foi de 5% (B5) (BRASIL, 2005) e desde 2014 o Conselho Nacional de Política Energética aumentou para 7% (B7) o percentual obrigatório de mistura de biodiesel ao óleo diesel (BRASIL, 2015).

A produção de biodiesel gera aproximadamente 10% (em peso produzido) de glicerol como produto secundário da reação de transesterificação. Embora o glicerol tenha muitos usos nas indústrias farmacêuticas, químicas ou de alimentos, sua forma bruta tem baixo valor comercial devido às impurezas. Tais impurezas dependem do tipo de catalisador e do óleo (vegetal ou animal) utilizado para a produção de biodiesel (VIANA *et al.*, 2012, YANG *et al.*, 2012). Devido ao crescimento exponencial da demanda e produção de biodiesel, a utilização do glicerol bruto tem se tornado um tema importante, uma vez que a perspectiva é de que a grande quantidade gerada ultrapasse a demanda do mercado (AYOUB; ABDULLAH, 2012).

Com o objetivo de proporcionar uma alternativa atraente para o uso do glicerol bruto, a digestão anaeróbia tem sido investigada como tecnologia para agregar valor a esse resíduo, através da produção de energia (metano ou hidrogênio). Na maioria das pesquisas recentes, o glicerol é co-digerido com lodo de esgoto para melhorar a produção de metano em sistemas anaeróbios (NGHIEM *et al.*, 2014; ATHANASOULIA *et al.*, 2014). A co-digestão com biomassa de microalgas também foi recentemente relatada (SANTOS-BALLARDO *et al.*, 2015).

O glicerol também pode ser usado como a única fonte de carbono para a produção de metano. Neste caso, a aplicação da carga orgânica é geralmente limitada pelo acúmulo de sais

nos sistemas anaeróbios. Metanol e sais de cálcio, magnésio e fósforo são os principais compostos inibitórios encontrados no glicerol bruto (CASTRILLÓN *et al.*, 2011; JENSEN *et al.*, 2014). Outro aspecto importante diz respeito à escolha da configuração do reator. Vlassis *et al.* (2013), operaram dois tipos de reatores usando glicerol analítico: no reator anaeróbio intermitente compartimentado (PABR), alcançaram uma boa eficiência de remoção de DQO através da aplicação de carga orgânica volumétrica (COV) de até 3,0 kg DQO/m³·d, a qual foi muito mais elevada que a COV máxima aplicada (0,25 kg DQO/m³·d) em um reator de tanque agitado contínuo (CSTR). Quando um reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB) convencional foi operado por longo período com glicerol bruto, a COV suportada pelo sistema foi de até 4,3 kg DQO/m³·d (HUTŇAN *et al.*, 2013).

O óleo de semente de algodão é a terceira matéria-prima mais importante e a mais barata para a produção de biodiesel no Brasil (de SOUZA; SILVEIRA, 2011). Por isso, o objetivo deste estudo foi avaliar a aplicação de glicerol bruto, gerado na produção de biodiesel a partir do óleo de semente de algodão, como substrato direto em um reator UASB. Técnicas de biologia molecular foram utilizadas para avaliar as mudanças de diversidade microbiana durante as fases operacionais do biorreator.

3.2 Materiais e métodos

3.2.1 Caracterização do inóculo

A biomassa utilizada como inóculo foi obtida de reator UASB empregado no tratamento de esgoto doméstico da Estação de Tratamento de Esgotos (ETE) Mangueira, no município de Recife – PE. Para a caracterização do inóculo foram feitas as determinações dos sólidos suspensos totais (SST) e sólidos suspensos voláteis (SSV), segundo o *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2012), e a análise de atividade metanogênica específica (AME).

O teste de AME foi realizado em triplicata, em garrafas reatores de borosilicato de 250 ml (volume útil de 200 ml). Os reatores foram mantidos a 30 °C em sala com temperatura controlada. As concentrações de biomassa (lodo anaeróbio floculento) e a quantidade de solução nutriente, cuja composição se encontra na Tabela 3.1, foram iguais a 3 g SSV/L e 20% do volume útil do reator, respectivamente. O substrato utilizado foi uma solução de ácidos graxos voláteis (ácidos acético, propiônico e butírico) com concentração igual a 3 g DQO/L. Foi adicionado bicarbonato de sódio (1:1 gNaHCO₃:gDQO) de forma a manter a capacidade tampão do sistema. A cada 24 h era feita a agitação manual e medição de metano.

Tabela 3.1 – Composição da solução de macro e micronutrientes utilizada no teste de atividade metanogênica específica e na operação do reator UASB

Solução	Reagente	Concentração (g/L)
Macronutrientes	NH ₄ Cl	0,280
	K ₂ HPO ₄	0,252
	MgSO ₄ .7 H ₂ O	0,100
	CaCl ₂	0,007
	Extrato de levedura	0,100
	Solução de micronutrientes	1 ml/L
Micronutrientes	FeCl ₂ .4H ₂ O	2,000
	ZnCl ₂	0,050
	MnCl ₂ .4H ₂ O	0,500
	NiCl ₂ .6H ₂ O	0,142
	H ₃ BO ₃	0,050
	CuCl ₂ .2H ₂ O	0,038
	CoCl ₂ .6H ₂ O	2,000
	AlCl ₃ .6H ₂ O	0,090
	(NH ₄) ₆ .Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0,050
	EDTA	1,000
	Resazurina	0,200
	HCl 36%	1 ml/L

(FLORENCIO, 1994)

A medição do metano produzido foi feita através do método de deslocamento de líquido: uma mangueira de PVC (tipo cristal) foi interligada entre o frasco reator e uma garrafa de Marriote invertida, contendo solução de hidróxido de sódio 3% (m/v). Esta solução é usada para absorver o CO₂ produzido no biogás. Em seguida, o volume de solução de hidróxido deslocado pelo gás lavado foi medido através de pesagem do líquido coletado em recipiente plástico com capacidade de 1 L.

O cálculo da AME foi feito de acordo com Equação 3.1, a seguir:

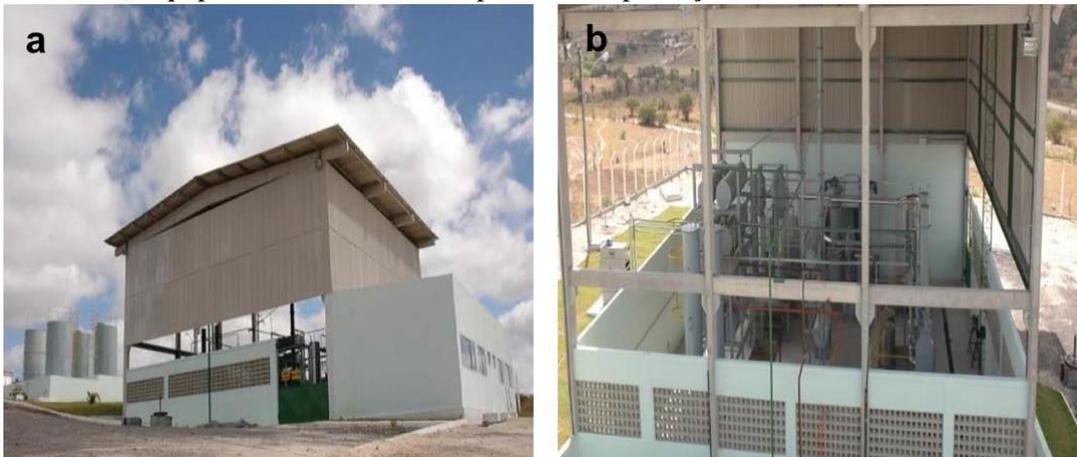
$$AME = \frac{g \text{ CH}_4}{t} \times \frac{1}{F \times V \times SSV} \quad (3.1)$$

onde: (g CH₄/t) é a máxima taxa de produção diária (a partir da máxima inclinação da curva de produção acumulada de metano); F é o fator de conversão de CH₄ para DQO (1g DQO corresponde a 405 g CH₄-úmido); V é o volume útil do reator em litros; SSV é a concentração da biomassa (determinada após a análise de sólidos).

3.2.2 Caracterização físico-química do glicerol

O glicerol bruto utilizado na presente pesquisa foi procedente da planta industrial (escala piloto) de produção de biodiesel localizada no município de Caetés, no agreste de Pernambuco (Figura 3.1). A unidade opera em regime de batelada, com capacidade de produção de 600.000 L/ano, utilizando o processo de transesterificação metálica do óleo de semente de algodão e hidróxido de sódio como catalisador.

Figura 3.1 – Usina piloto de produção de biodiesel (Caetés-PE). a) Vista geral da unidade; b) Equipamentos utilizados no processo de produção de biodiesel



Fonte: Wamberto R. da Silva Jr.

Os parâmetros de caracterização do glicerol bruto são apresentados na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 – Parâmetros de caracterização do glicerol bruto

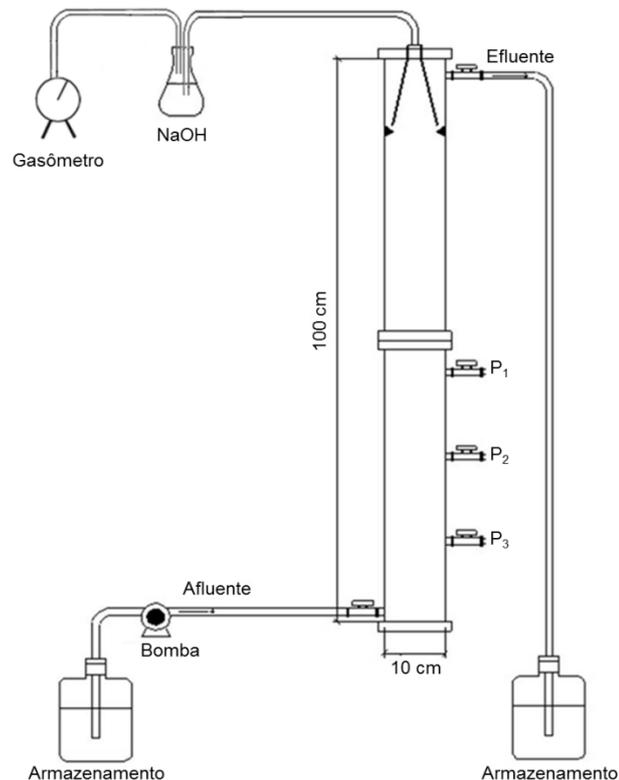
Parâmetro	Método
Temperatura (°C)	Potenciométrico
pH	Potenciométrico
Densidade (g/mL)	Picnométrico
Condutividade (µS/cm)	Potenciométrico
Potencial redox (mV)	Potenciométrico
DQO (g O ₂ /L)	Colorimétrico
Cloretos (g/L)	Cromatografia de íons
Sódio (g/L)	Cromatografia de íons
Potássio (g/L)	Cromatografia de íons
Magnésio (g/L)	Cromatografia de íons
Cálcio (g/L)	Cromatografia de íons
Amônio (g/L)	Cromatografia de íons
Carbono (%)	Analisador elementar
Hidrogênio (%)	Analisador elementar
Nitrogênio (%)	Analisador elementar
Enxofre (%)	Analisador elementar

As determinações analíticas seguiram as metodologias descritas no *Standard Methods* (APHA, 2012). A densidade do glicerol foi determinada no laboratório de análises do Centro de Bioenergia do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), em Caetés – PE.

3.2.3 Operação e monitoramento do reator UASB

Foi operado um reator do tipo UASB em escala de bancada com as seguintes características: 1 metro de altura e 9,5 centímetros de diâmetro interno (volume total de 7,0 L), confeccionado em acrílico. O reator foi dividido em dois módulos, com três pontos coletores de amostras de lodo (Figura 3.2). O P₁ (ponto de coleta 1) situava-se a 43 cm de altura, o P₂ (ponto de coleta 2) a 26 cm de altura e o P₃ (ponto de coleta 3) a 12 cm de altura em relação ao fundo do reator.

Figura 3.2 – Esquema do reator anaeróbios de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB)



Fonte: a autora

O reator UASB foi preenchido com aproximadamente 2,5 L de inóculo, o que corresponde a 33,7 g SSV/L. O afluente do reator era mantido em um recipiente, sendo a

vazão afluyente controlada por bomba peristáltica. A solução afluyente era composta pelo glicerol bruto diluído em solução contendo macro e micro nutrientes (Tabela 3.1) e NaHCO_3 .

As COVs foram aumentadas gradativamente de 0,5 a 8,0 kg DQO/m³·d, configurando diferentes fases operacionais. A mudança de fase no reator era efetuada quando o sistema estava adaptado ao regime de alimentação, isto é, quando os valores de pH, alcalinidade e eficiência de remoção de DQO se apresentavam estáveis.

Durante a operação do UASB, as composições físico-químicas do afluyente e efluente líquido, bem como a biomassa e biogás gerados foram acompanhadas através do monitoramento dos parâmetros constantes na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 – Programa de monitoramento dos parâmetros físico-químicos

Parâmetros	Frequência	Método
pH	3x/semana	Potenciométrico
Potencial redox (mV)	3x/semana	Potenciométrico
Alcalinidade (mg CaCO_3 /L)	3x/semana	Titulométrico
DQO total (mg O_2 /L)	3x/semana	Colorimétrico
DQO filtrada (mg O_2 /L)	3x/semana	Colorimétrico
AGV (mg/L)	3x/semana	Cromatografia gasosa
Cloretos e cátions (mg/L)	1x/semana	Cromatografia de íons
Série de Sólidos (mg/L)	eventual	Gravimétrico
Biogás (ml CH_4)	diária	Gasométrico
Diversidade microbiana	mudanças de fase	PCR/DGGE

3.2.4 Procedimento analítico

Os teores de carbono, hidrogênio, nitrogênio e enxofre do glicerol bruto foram determinados em analisador elementar CHNS-O (CE Instruments, modelo EA 1110). A amostra foi pesada em cápsula de estanho e introduzida em reator de combustão através de amostrador automático. Após a combustão, os gases produzidos foram transportados por corrente de hélio através da superfície de cobre do interior do reator, separados por coluna de cromatografia gasosa e finalmente detectados por condutividade térmica (TCD). A análise foi realizada no Laboratório de Química Analítica, do Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco – DQF/UFPE.

A quantificação de ânions (íon cloreto) foi realizada em cromatógrafo modelo ICS-2100 (Dionex Sunnyvale, CA). A coluna analítica incluía uma pré-coluna IonPac AG23 (25x2 mm), e uma coluna analítica IonPac AS23 (250x2 mm). A detecção foi realizada por um detector de condutividade por supressão. A condutividade do eluente foi suprimida através do

supressor aniônico Dionex ASRS (2 mm), aplicando-se uma corrente ao supressor de 7 mA. O eluente utilizado (fluxo de 0,25 mL/min) foi uma mistura de carbonato de sódio 4,5 mM e bicarbonato de sódio 0,8 mM. Os cátions (sódio, potássio, magnésio, cálcio e amônio) foram quantificados em cromatógrafo modelo ICS-1100 (Dionex Sunnyvale, CA). A coluna analítica incluía uma pré-coluna IonPac CG12A (50x2 mm), e uma coluna analítica IonPac CS12A (250x2 mm). A detecção foi realizada por um detector de condutividade por supressão. A condutividade do eluente foi suprimida através do supressor catiônico Dionex CSRS (2 mm), 15 mA. O eluente foi ácido sulfúrico 11 mM, num fluxo de 0,25 mL/min. O volume de injeção das amostras era de 10 µL. A aquisição e tratamento de dados foram feitos através do software Chromeleon (Dionex).

A determinação de pH, potencial redox, alcalinidade e ácidos graxos voláteis (AGV) era realizada imediatamente após a coleta das amostras do reator UASB. As determinações de alcalinidade, DQO, e sólidos foram feitas de acordo com os métodos 2320-B, 5220-D, 2540-G, do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2012). A eficiência de remoção de DQO foi baseada na DQO bruta afluyente e a DQO solúvel efluente (após filtração em membrana 1,2 µm de fibra de vidro). A eficiência de remoção de DQO medida como metano foi calculada através da conversão da produção de metano (mL/dia) em DQO-CH₄ (kg DQO/dia) usando a relação estequiométrica da massa de oxigênio necessária para oxidar completamente a massa de metano. O resultado foi dividido pela DQO efluente total (kg/dia). Depois disso, este dado foi comparado com a eficiência total de remoção de DQO (kg DQO total afluyente/dia - kg DQO total efluente/dia). A comparação de ambos resulta na fração de DQO total removida convertida em metano.

A quantificação de AGVs foi feita usando um cromatógrafo a gás (Agilent 7890A GC) acoplado a coluna *Thermo Scientific™ TRACE™ TR-WAX* (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm). A detecção foi feita por detector de ionização de chama (FID). Os parâmetros usados na análise foram: hidrogênio como gás de arraste num fluxo de 1,34 mL/min, temperatura do injetor de 250 °C, temperatura do detector e do forno foram 300 °C, volume de injeção da amostra de 1 µL, taxa *split* de 10:1 (MORAES *et al.*, 2000).

A medição do biogás produzido foi realizada através de gasômetro Ritter (Alemanha), modelo MGC-1 V3.1 PMMA. Para a aquisição de dados de volume e fluxo de gás foi usado software Rigamo (Ritter). Com a finalidade de controlar a pressão de gás no separador de três fases (*headspace*) do reator e para remover o dióxido de carbono do biogás gerado, antes do gasômetro foi instalado um selo hídrico contendo 10% (p/p) de hidróxido de sódio (NaOH).

3.2.5 Análise da ecologia de micro-organismos

Para análise da ecologia microbiana presente no inóculo e nas amostras coletadas durante as mudanças de fase de operação do UASB foram utilizadas as técnicas de PCR/DGGE. As amostras foram lavadas em tampão PBS 1X, centrifugadas a 6000 rpm por 10 minutos a 4 °C e mantidas a -20 °C até o momento da realização das análises.

Extração de DNA

A extração de DNA foi executada a partir de 0,5 g de lodo previamente lavado com PBS utilizando o kit comercial *PowerSoil™ DNA Isolation Kit* (Mobio Laboratories, Califórnia - EUA). A pureza do DNA foi avaliada por espectrofotometria (relação 260/280) usando um instrumento Nanodrop (*Thermo Scientific*).

PCR

Os *primers* (iniciadores) utilizados para amplificação do DNAr 16S de *Bacteria* e *Archaea* estão listados na Tabela 3.4. O mix para amplificação para bactérias teve um volume final de 50 µL, contendo tampão da enzima *Taq* DNA polimerase 1X, MgCl₂ 2 mM, desoxirribonucleotídeos trifosfatados 0,2 mM cada, *primers* 968F-GC e 1392R 0,2 µM cada, enzima *Taq* DNA polimerase 1U e aproximadamente 10 ng do DNA extraído.

A reação de PCR começou com um período inicial de desnaturação de 4 min a 94 °C, seguido por 34 ciclos de 94 °C por 30 s, 48 °C por 30 s, 68 °C por 1 min, uma extensão final a 68 °C por 5 min em termociclador modelo *MyCycler Thermal Cycler* (*Bio-Rad Laboratories*, Califórnia - EUA).

Tabela 3.4 – *Primers* específicos da reação em cadeia da polimerase para a amplificação de genes RNAr 16S de *Bacteria* e *Archaea*

Primer	Sequência do primer (5'-3')	Referência
968F	†AACGCGAAGAACCTTAC	Nielsen <i>et al.</i> (1999)
1392R	ACGGGCGGTGTGTAC	
1100F	††AACCGTCGACAGTCAGGYAACGAGCGAG	Kudo <i>et al.</i> (1997)
1400R	CGGCGAATTTCGTGCAAGGAGCAGGGAC	

† Grampo GC adicionado à extremidade 5' do *primer*: CGCCCGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGG

††Grampo GC: CGCCCGCCGCGCGCGGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGG

A amplificação do DNA para *Archaea* foi realizada com 50 µL do mix de reação sob as seguintes condições: desoxirribonucleotídeos trifosfatos 0,2 mM cada, MgCl₂ 1,5 mM, *Taq* DNA polimerase 1 U, *primers* 1100F-GC e 1400R 0,2 µM cada, tampão PCR 1X e aproximadamente 10 ng de DNA. A PCR foi realizada em termociclador, usando o seguinte

programa: desnaturação do DNA a 94°C por 4 min, seguido por 34 ciclos a 94°C por 30 s, 55°C por 30 s, 68°C por 1 min, com 7 min a 68°C para a extensão no final. Todos os reagentes usados na PCR foram produzidos pela Invitrogen (*Life Technologies*).

Um controle negativo sem DNA foi incluído para confirmar a não contaminação dos reagentes da amplificação. Os produtos finais da PCR foram visualizados sob luz UV (transiluminador UV 302nm, UVP - Analitika Jena - Alemanha) em gel de agarose 1,8% após tratamento com brometo de etídio (5µg/mL).

DGGE

O produto da reação de PCR foi separado em bandas em gel com gradiente desnaturante. Cada banda obtida no gel de acrilamida representa, teoricamente, um micro-organismo diferente. A eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) foi realizada em aparelho D-Code (*Bio-Rad Laboratories*, Califórnia, EUA) com ligeiras modificações do método descrito por Muyzer *et al.* (1993). Isto é, os produtos de PCR correram em gel de poliacrilamida 8% (peso/volume), em TAE (80 mM Tris base, 2,0 mM EDTA, 40 mM acetato de sódio, pH 7,4) usando gradientes desnaturantes variando de 45 a 65% (onde 100% desnaturante contém 7 M de uréia e formamida a 40%). A eletroforese foi realizada sob tensão de 220 V por 4,5 h. O tampão de eletroforese (TAE) foi mantido a 60°C. Os géis foram corados com brometo de etídio, visualizados em um transiluminador UV (UVP - Analitika Jena - Alemanha) e fotografados (câmera Canon PowerShot A640).

3.3 Resultados e discussão

3.3.1 Caracterização do inóculo

O lodo utilizado nos experimentos do presente estudo foi do tipo flocculento, com uma concentração de sólidos suspensos voláteis igual a 94,4 g SSV/L. A análise da atividade metanogênica específica resultou em 0,18 g DQO-CH₄/g SSV·d (72,5 mL CH₄/g SSV·d).

Este lodo possui uma quantidade significativa de sólidos inertes (FLORENCIO *et al.*, 2001). A entrada de areia na rede coletora associada à eficiência insatisfatória da caixa de areia existente na ETE Mangueira levou ao acúmulo de sólidos inertes no interior do reator. Por sua vez, isso ocasiona maior percentual de sólidos fixos em relação aos sólidos voláteis (MORAIS, 2011). O presente estudo obteve resultado de AME similar aos relatados anteriormente: 0,18 - 0,25 g DQO/g SSV·d (FLORENCIO *et al.*, 2001), e 0,15 g DQO/g SSV·d (SOUZA, 2013).

3.3.2 Caracterização do glicerol bruto

Os resultados obtidos na caracterização físico-química do glicerol bruto utilizado nesta pesquisa encontram-se na Tabela 3.5.

Tabela 3.5 – Caracterização físico-química do glicerol bruto

Parâmetro	Valor
Temperatura (°C)	27,5
pH	9,7
Densidade (g/mL)	1,05
Condutividade (µS/cm)	351,0
Potencial redox (mV)	-186,7
DQO (g O ₂ /L)	1636,0
Cloretos (g/L)	11,6
Sódio (g/L)	31,6
Potássio (g/L)	2,0
Magnésio (g/L)	2,9
Cálcio (g/L)	6,5
Amônio (g/L)	n.d.
Carbono (%)	51,2
Hidrogênio (%)	9,8
Nitrogênio (%)	0,0
Enxofre (%)	0,0

n.d.: abaixo do limite de detecção

A análise elementar do glicerol bruto foi similar à relatada por Ayoub e Abdullah (2012), em seu artigo de revisão. Segundo os referidos autores, os maiores constituintes elementares do glicerol bruto são carbono, hidrogênio e oxigênio, sendo a análise elementar típica composta por 52,77% de carbono, 11,08% de hidrogênio, 36,15% de oxigênio e menos de 0,0001% da massa correspondente a nitrogênio.

Algumas das características físico-químicas do glicerol bruto utilizado por Hutňan *et al.* (2009) ao operar um reator UASB inoculado com biomassa suspensa sob COV de 4,0 kg glicerol bruto/m³·d também foram similares às encontradas no presente estudo: DQO 1600 g/L, pH 10,4, densidade 1052 kg/m³, N_{total} 2,06 g/L e P_{total} 0,72 g/L. Estes autores alcançaram uma produção estável de 979 ml de biogás (em média, 61% de metano) por ml de glicerol.

Tais dados sugerem que o glicerol bruto pode ser usado como uma fonte renovável de energia e que o mesmo pode ser facilmente decomposto, com alta produção de biogás, por ser um composto com elevado teor de carbono.

3.3.3 Operação do reator UASB

Os valores médios e desvios padrão da COV aplicada, a eficiência de remoção de DQO e a remoção de DQO medida como CH₄ são mostrados na Tabela 3.6 e Figura 3.3. O experimento foi conduzido em seis fases operacionais, com o reator sendo operado sob temperatura média de 26,5 °C ± 1,5 °C pelo período total de 280 dias.

Tabela 3.6 – Valores médios e desvios padrão dos principais parâmetros analisados durante a operação do reator UASB em escala de bancada

Etapa	Operação (dias)	COV (kg DQO/m ³ ·d)	pH	Remoção de DQO (%)	Remoção de DQO-CH ₄ (%)	Produção de CH ₄ (L CH ₄ /g DQO _{removida})
I	44	0,50±0,16	7,3±0,3	86,1±15,3	67,2±14,3	0,261±0,070
II	35	1,48±0,11	6,9±0,1	90,1±4,4	68,0±4,0	0,264±0,025
III	70	2,65±0,24	6,8±0,1	92,5±2,3	67,1±4,4	0,261±0,012
IV	16	5,72±0,59	7,3±0,3	85,9±7,8	53,8±4,4	0,209±0,032
V	40	4,09±0,52	7,3±0,2	81,2±9,7	54,6±7,7	0,215±0,025
VI	75	8,06±0,55	7,6±0,7	92,0±4,5	64,7±6,0	0,251±0,018

A COV foi gradualmente aumentada desde a etapa I (0,50 kg DQO/m³·d) até a etapa VI (8,06 kg DQO/m³·d), resultando numa eficiência média de remoção de DQO de cerca de 89%.

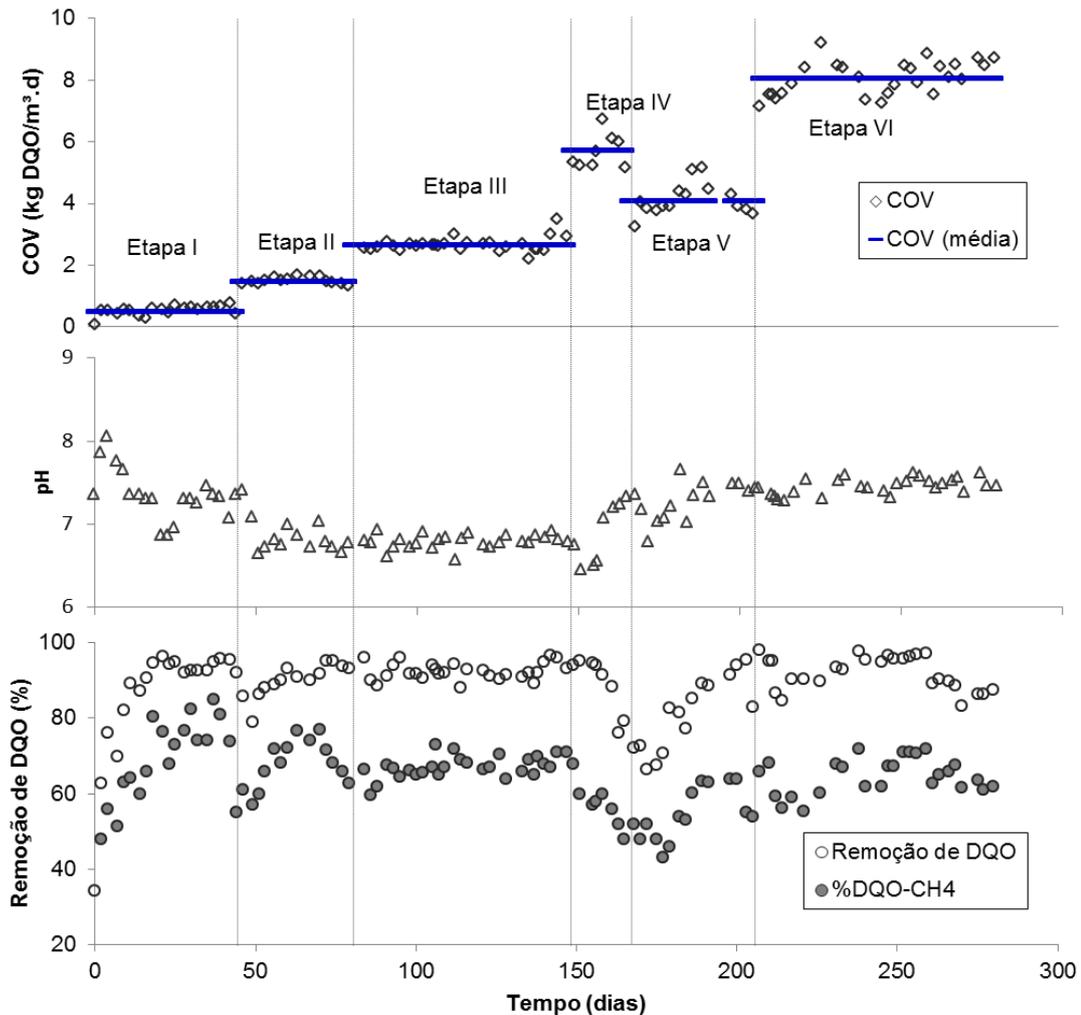
Durante a Etapa I, o objetivo era adaptar a biomassa ao meio contendo glicerol bruto. Nesta fase, a eficiência média de remoção de DQO do reator UASB foi de 86%. Nas Etapas II e III, as eficiências de remoção de DQO alcançaram 90% e 92%, respectivamente, quando a COV foi aumentada até 2,65 kg DQO/m³·d (Tabela 3.6).

Na Etapa IV (5,72 kg DQO/m³·d) o reator apresentou desempenho instável, possivelmente devido ao aumento dos valores de AGV causado pela baixa capacidade de tamponamento do sistema (alcalinidade total inferior a 1000 mg/L). O reator apresentou formação de espumas, perda de lodo, queda da eficiência de remoção de DQO para valores de 66,4% (Figura 3.3), e queda no pH até o valor mínimo de 6,1 (Figura 3.3). As concentrações de AGVs e DQO efluentes aumentaram para 420 mg Ac⁻/L e 520 mg O₂/L, respectivamente.

Para evitar mais problemas operacionais, a COV foi intencionalmente reduzida para 4,09 kg DQO/m³·d na etapa V. Além disso, 4 g NaHCO₃/L passaram a ser acrescentados ao reator para aumentar a capacidade tampão. Finalmente, depois de 205 dias de operação, a COV foi aumentada para 8,06 kg DQO/m³·d (etapa VI), como inicialmente previsto para a

operação do reator. Nessa etapa, o reator atingiu o valor máximo de COV de todo o período experimental, apresentando também uma alta eficiência de remoção de DQO (92%).

Figura 3.3 – Variação da COV aplicada, pH, eficiência de remoção de DQO e produção de CH₄ ao longo do tempo de operação do reator UASB



Em relação à influência de sais presentes na solução afluente contendo glicerol bruto, observou-se que o aumento da COV resultou em aumento das concentrações de cloreto e de de sódio, bem como dos valores de condutividade, com valores máximos de 300 mg/L, 727 mg/L e 3027 μ S/cm, respectivamente. Os íons cloreto e sulfato contidos no glicerol bruto normalmente advêm dos ácidos clorídrico ou sulfúrico que podem ser usados durante o passo de neutralização da produção de biodiesel. Já os íons sódio ou potássio são provenientes dos catalizadores usados no processo de transesterificação, geralmente hidróxidos de sódio ou potássio (VIANA *et al.*, 2012). Concentrações de sódio de 5, 10, e 14 g de Na⁺/L causaram inibição de 10, 50 e 100%, respectivamente, na atividade acetoclástica metanogênica

(RINZEMA *et al.*, 1988). Sódio e potássio podem inibir seriamente o crescimento microbiano durante a degradação anaeróbia de glicerol em concentrações de 8 g de Na⁺/L ou 12 g de K⁺/L (VIANA *et al.*, 2012). A concentração de cloretos necessária para causar inibição do processo de metanogênese está entre 4 e 9 g/L, porém, se o inóculo for devidamente aclimatado, é possível operar reatores alimentados com glicerol cru contendo concentrações de cloretos acima de 14 g Cl⁻/L (VIANA, 2011). Hutňan *et al.* (2013) operando um reator UASB alimentado com glicerol bruto relataram uma falha repentina depois de 440 dias de operação, o que foi atribuído ao teor de sais inorgânicos dissolvidos, que chegou a 30 g/L. No presente estudo, é improvável que a inibição por sais inorgânicos tenha ocorrido devido à diluição do glicerol afluente. O fato de que a produção de metano tenha permanecido estável durante o período experimental confirma o efeito não inibitório destes sais. A eficiência de remoção de DQO medida como metano variou 64,7% a 68,0%, exceto nas fases IV e V, quando estes valores diminuíram para 53,8% e 54,6% (Tabela 3.6 e Figura 3.3). A produção média de metano para o período total de operação do reator UASB foi de 0,248±0,039 L CH₄/g DQO aplicado.

Comparando-se a remoção de DQO e a COV aplicada durante o período experimental do presente estudo com os trabalhos prévios similares, os resultados desta pesquisa podem ser considerados de sucesso, especialmente quando se leva em consideração o uso de glicerol bruto. Vlassis *et al.* (2012) estudaram a digestão anaeróbia utilizando um CSTR. Quando a COV ultrapassou os apenas 0,25 kg DQO/m³·d aplicados, o desempenho do reator decaiu devido ao acúmulo de AGVs e à diminuição do pH. Os autores obtiveram uma produção máxima de metano de 0,30±0,04 L CH₄/g DQO. Yang *et al.* (2008) utilizaram um biorreator de leito fixo preenchido com espuma de poliuretano alimentado com água residuária sintética e glicerol sob condições mesofílicas e operação semi-contínua. Os autores obtiveram eficiência de remoção de DQO de 73,8%, com produção de metano máxima de aproximadamente 0,26 L CH₄/g DQO. No entanto, a máxima COV estudada foi de apenas 0,70 kg DQO/m³·d. Kolesárová *et al.* (2011) relataram problemas similares aos do presente estudo (flotação de lodo, formação de espuma, e aumento das concentrações de DQO e AGV efluentes). A COV máxima estudada pelos referidos autores foi igual a 2,17 kg DQO/m³·d. Quando o glicerol bruto foi usado como único substrato, o reator (tipo CSTR) alcançou a produção específica média de biogás de 0,76 m³/L de glicerol. Ainda assim, os autores concluíram que o tratamento anaeróbio de glicerol bruto como único substrato orgânico é

possível, apesar dos efeitos de inibição e exigências específicas decorrentes da natureza e da composição do glicerol.

Em outros trabalhos, boas eficiências de remoção de DQO e maiores COV foram alcançadas, mas depois de algum pré-tratamento do glicerol bruto. Nuchdang e Phalakornkule (2012) obtiveram eficiência de remoção de DQO total de 86% e teor de metano de 54% com um reator UASB alimentado com glicerol bruto proveniente de óleo de cozinha usado, entretanto o glicerol foi previamente tratado e acidificado (para remover óleos e gorduras). Os valores aplicados de COV variaram entre 1,3 e 2,6 kg DQO/m³·d. Hutňan *et al.* (2013) observaram uma boa eficiência de remoção de DQO e produção de biogás estável com alto teor de metano (até 70%), ao operar um reator UASB com COV de até 12 kg DQO/m³·d durante longo período. Entretanto, este valor elevado pode ser explicado pela utilização de glicerol pré-tratado por acidificação, o que resultou num teor mais elevado de glicerol afluente (80%) e quantidades mínimas de ácidos graxos de cadeia longa.

Estes estudos anteriores, os quais podem ser comparados na Tabela 3.7, corroboram os resultados do presente trabalho, demonstrando a viabilidade da digestão anaeróbia de glicerol bruto para a produção de metano, com boa eficiência de remoção de DQO e alta COV aplicada. No entanto, a alimentação deve ser cuidadosamente regulada, a fim de se evitar condições de sobrecarga.

Tabela 3.7 – Carga orgânica máxima aplicada em diferentes reatores, eficiências de remoção de DQO e produção de metano em experimentos que utilizaram glicerol como substrato para digestão anaeróbia

Substrato	COV máxima aplicada (kg DQO/m ³ ·d)	Tipo de reator	Eficiência de remoção de DQO	Produção máxima de metano	Autor
Glicerol puro	0,25	CSTR	94%	0,30 L CH ₄ /g DQO _{aplicado}	Vlassis <i>et al.</i> (2012)
Glicerol puro	0,25	CSTR	94%	0,0074 L CH ₄ /L·d	Vlassis <i>et al.</i> (2013)
Glicerol puro	3,00	PABR	95%	0,993 L CH ₄ /L·d	Vlassis <i>et al.</i> (2013)
Água residuária sintética contendo glicerol puro	0,70	Reator de leito fixo preenchido com espuma de poliuretano	74%	0,26 L CH ₄ /g DQO _{aplicado}	Yang <i>et al.</i> (2008)
Glicerol bruto acidificado	2,60	UASB	86%	0,32 L CH ₄ /g DQO _{removido}	Nuchdang e Phalakornkule (2012)
Glicerol bruto acidificado	12,0	UASB	n.i.	0,36 L CH ₄ /g DQO _{aplicado}	Hutňan <i>et al.</i> (2013)
Glicerol bruto	2,17	CSTR	n.i.	0,40 L CH ₄ /g DQO _{aplicado}	Kolesárová <i>et al.</i> (2011)
Glicerol bruto	8,06	UASB	89%	0,33 L CH ₄ /g DQO _{removido}	Presente estudo

n.i.: não informado

3.3.4 Ecologia de micro-organismos

A extração de DNA das amostras de lodo resultou nas concentrações apresentadas na Tabela 3.8.

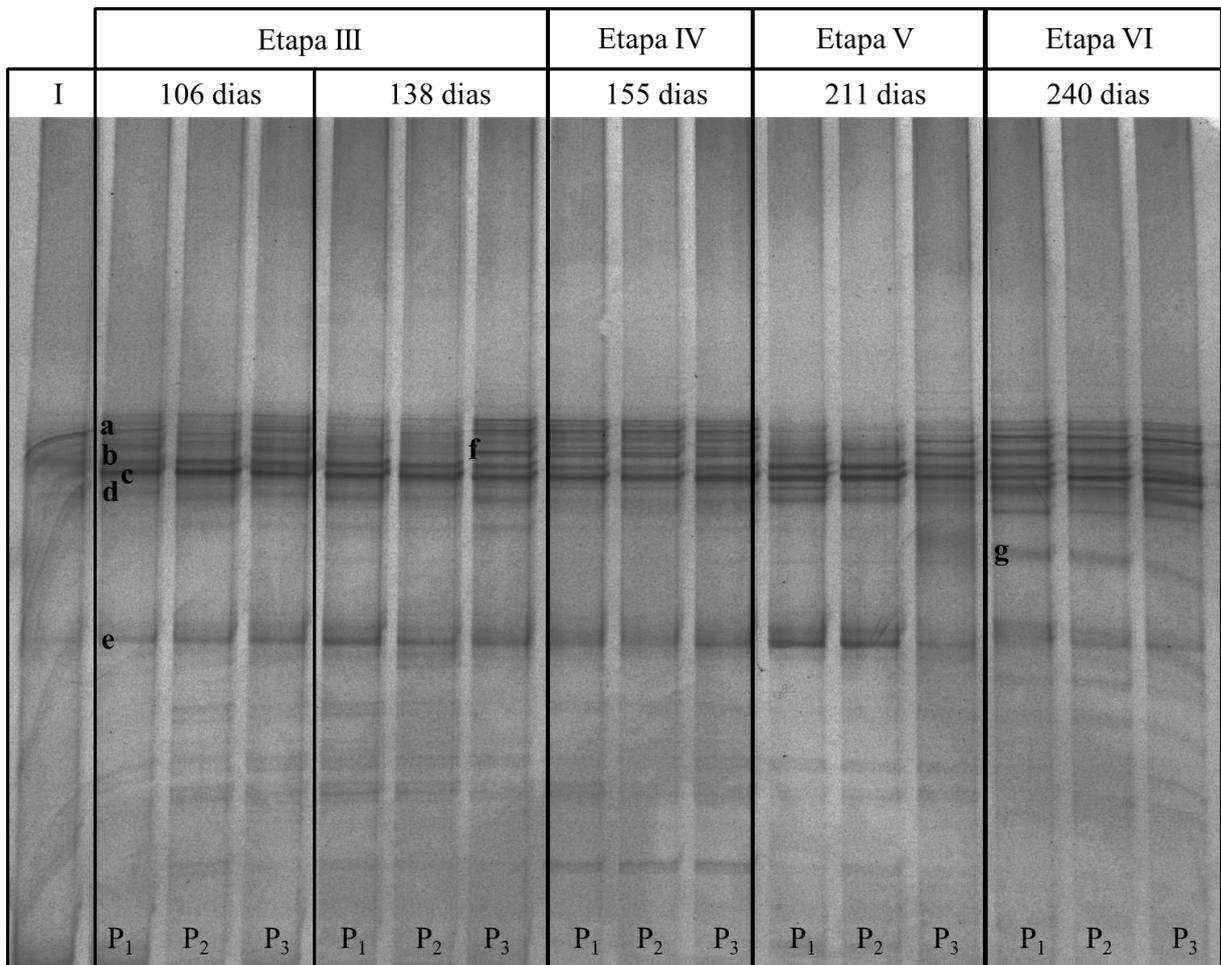
Tabela 3.8 – Concentração e pureza de amostras de DNA do inóculo e lodo do reator UASB

Tempo ^a	Amostra	DNA ^e	Relação 260/280
0	Inóculo	14,7	1,7
106	P ₁ ^b	11,1	1,9
	P ₂ ^c	16,2	1,6
	P ₃ ^d	14,2	1,8
138	P ₁	13,5	2,0
	P ₂	11,7	2,0
	P ₃	11,7	2,2
155	P ₁	10,7	2,2
	P ₂	9,8	1,8
	P ₃	8,8	1,8
211	P ₁	8,3	2,0
	P ₂	8,0	2,3
	P ₃	13,7	2,3
240	P ₁	17,0	1,9
	P ₂	14,9	2,1
	P ₃	13,9	2,2

^a tempo acumulado (dias); ^b ponto de coleta 1 situado a 43 cm de altura em relação ao fundo do reator; ^c ponto de coleta 2 situado a 26 cm de altura em relação ao fundo do reator; ^d ponto de coleta 3 situado a 12 cm de altura em relação ao fundo do reator; ^e concentração de DNA em ng/μL

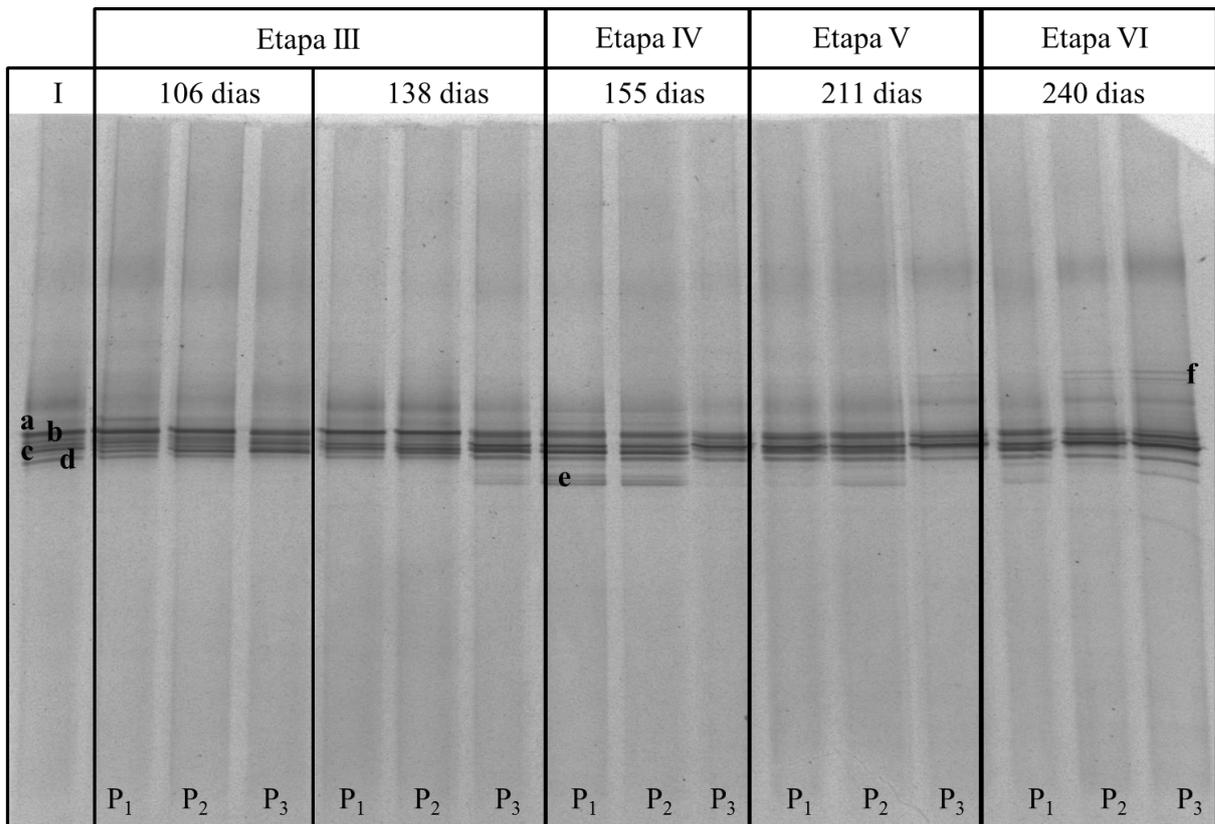
A razão entre 260/280 nm é utilizada para estimar a pureza das amostras de DNA e também de RNA. Uma amostra de DNA considerada pura apresenta razão de aproximadamente 1,8. Para uma razão de aproximadamente 2,0 considera-se que a amostra é pura para RNA. Se esta razão for menor do que estes valores, possivelmente há contaminação com proteínas, fenol ou outros contaminantes que absorvem fortemente em 280 nm (*Thermo Scientific*). Uma maior razão 260/280 se dá devido à maior proporção presente no RNA de uracila em comparação com a de timina (*NanoDrop Technologies*, 2007). Conforme observado na Tabela 3.8, as amostras de DNA extraídas do inóculo e do reator UASB apresentaram uma pureza satisfatória, apesar da baixa concentração de alguns pontos.

A amplificação do material genético através do uso de *primers* universais para os domínios *Bacteria* e *Archaea* foi alcançada com êxito para todas as amostras. A partir dos produtos de PCR, foi feita a análise da diversidade de micro-organismos através da técnica de DGGE. Os resultados podem ser observados nas Figuras 3.4 e 3.5.

Figura 3.4 – Gel de DGGE para o domínio *Bacteria* do reator UASB

I: inóculo, **P₁:** ponto de coleta 1 situado a 43 cm de altura em relação ao fundo do reator; **P₂:** ponto de coleta 2 situado a 26 cm de altura em relação ao fundo do reator; **P₃:** ponto de coleta 3 situado a 12 cm de altura em relação ao fundo do reator

O perfil de bandas do gel referente ao domínio *Bacteria* sugeriu pequenas alterações na comunidade bacteriana durante a operação do reator (Figura 3.4). É possível ver numerosas bandas comuns a diferentes pontos de amostragem e em diferentes dias de operação (bandas a, b, c, d, e, f). Isto indica (i) bom grau de mistura no interior do reator, uma vez que o padrão é praticamente o mesmo em todos os três pontos de amostragem; (ii) a 106 dias de operação o reator já se mostrava adaptado. A única mudança na comunidade bacteriana é vista na coleta realizada no 240º dia (Etapa VI), quando é possível observar a presença de algumas bandas (banda g), as quais representam o surgimento de bactérias que não estavam presentes nas etapas anteriores de operação do reator UASB.

Figura 3.5 – Gel de DGGE para o domínio *Archaea* do reator UASB

I: inóculo, **P₁:** ponto de coleta 1 situado a 43 cm de altura em relação ao fundo do reator; **P₂:** ponto de coleta 2 situado a 26 cm de altura em relação ao fundo do reator; **P₃:** ponto de coleta 3 situado a 12 cm de altura em relação ao fundo do reator

Quanto à comunidade de arqueias (Figura 3.5), parece não haver mudanças na diversidade desde o inóculo até o final da operação do reator UASB (bandas a, b, c, d), exceto por nova banda que surge na etapa III e alcança a máxima intensidade na etapa IV (banda e). No entanto, quando o reator se recuperou, esta banda reduziu sua intensidade, e pode estar relacionada com arqueias mais adaptadas a altas concentrações de AGV. Uma boa candidata seria *Methanosarcina* cujas constantes cinéticas (menor afinidade pelo acetato, porém com maior velocidade máxima de crescimento) faz com que este micro-organismo predomine sobre *Methanosaeta*, outra metanogênica acetoclástica que é dominante no lodo granular de um reator que opera corretamente, isto é, onde as concentrações de AGV se mantêm baixas (DÍAZ *et al.*, 2003; CONKLIN *et al.*, 2006; DWORKIN, 2006). Na etapa VI, há uma ligeira mudança na comunidade com o surgimento de novas bandas (representadas pela letra f).

Dinh *et al.* (2014) foram possivelmente os únicos investigadores que estudaram as alterações na comunidade microbiana (*Bacteria* e *Archaea*) durante os estágios de aclimação de lodo granular usado como inóculo para o tratamento de glicerol em escala

laboratorial (reator em bateladas repetidas) visando à produção de metano. De acordo com os perfis de DGGE observados por estes autores, as mudanças das comunidades bacterianas foram mais significativas nas primeiras fases de fermentação, antes da introdução do glicerol e logo após a introdução de uma solução contendo glicose, acetato de sódio e lactato (solução GAL). As comunidades de arqueias, por outro lado, mudaram gradualmente ao longo do processo de aclimatação. Entretanto, assim como aconteceu no presente estudo, a comunidade bacteriana não mudou muito durante os estágios intermediários de aclimatação, isto é, quando o teor de glicerol foi aumentado de forma gradual na solução afluyente até a total substituição da solução GAL. A falta de mudanças na comunidade bacteriana poderia estar relacionada com a ausência de mudanças significativas nas rotas metabólicas durante o período de operação do reator.

3.4 Conclusão

Diante dos dados obtidos, pode-se concluir que:

O glicerol bruto proveniente da produção de biodiesel pode ser usado como substrato único para produção de biogás, aplicando-se cargas orgânicas de até 8,1 kg DQO/m³.d.

A eficiência média de remoção de DQO alcançou 89%, com uma produção máxima de metano igual a 0,330 L CH₄/g DQO.

A alimentação do reator deve incluir alcalinidade suficiente para evitar a acidificação do sistema, a formação de espumas ou a flotação da biomassa e a redução da eficiência de remoção de DQO.

Poucas mudanças ocorreram nas comunidades microbianas em relação aos domínios *Bacteria* e *Archaea*.

Capítulo 4 – Produção de 1,3-propanodiol e hidrogênio a partir de glicerol por cultura mista anaeróbia

4.1 Introdução

Os biocombustíveis (biodiesel, bioetanol, bio-hidrogênio, metano) tornaram-se uma fonte de energia alternativa ao petróleo por serem renováveis, gerar menos emissões de resíduos e reduzir o efeito estufa (DEMIRBAS, 2008). A produção mundial de biodiesel teve um crescimento exponencial entre os anos de 2006 e 2011. O aumento no preço do diesel convencional estava entre as principais razões para o crescimento na produção e demanda do biodiesel (QUISPE *et al.*, 2013). Em 2011, houve um forte declínio na produção de biodiesel, entretanto países como Brasil, Indonésia, Tailândia e Malásia foram capazes de manter a tendência de aumento de produção dos anos anteriores (UNITED NATIONS, 2014). Atualmente, a estimativa global de produção de biodiesel é alcançar 41 bilhões de litros em 2022 e a União Europeia está prevista para ser a maior produtora, com 45%, seguida pelos EUA e o Brasil com 15% e 8%, respectivamente (UNITED NATIONS, 2014).

O glicerol, um subproduto da produção de biodiesel, tem se acumulado massivamente, tornando o mercado saturado (TAN *et al.*, 2013). Uma possível solução é converter o glicerol residual em outros compostos de alto valor econômico através do processo de fermentação anaeróbia, levando à produção de produtos tais como 1,3-propanodiol (1,3-PDO) e hidrogênio (H₂) (PACHAURI; HE, 2006; SELEMBO *et al.*, 2009). O 1,3-PDO pode ser aplicado nas indústrias de polímeros, cosméticos, alimentos, lubrificantes, solventes e medicamentos, enquanto o H₂ é utilizado como combustível ou nos processos de produção de ácido clorídrico, de amoníaco e de combustíveis fósseis.

A produção microbiana do 1,3-PDO tem recebido muita atenção, por ser um processo mais simples, sem intermediários tóxicos e que contém menos impurezas em relação ao 1,3-PDO sintetizado quimicamente (da SILVA *et al.*, 2014b), além de ser altamente específica para a fermentação de glicerol (DECKWER, 1995). A produção biológica de H₂ a partir de glicerol tem sido apontada como a solução mais sustentável e aceitável dos pontos de vista econômico e ambiental (BALAT; KIRTAY, 2010).

Muitos dos estudos envolvendo a produção de 1,3-PDO ou H₂ a partir de glicerol tem utilizado cultivos puros, especialmente enterobactérias. Barbirato *et al.* (1995) obtiveram 0,61 mol 1,3-PDO/mol glicerol quando utilizaram *Enterobacter agglomerans* para converter glicerol em 1,3-PDO. Rossi *et al.* (2013), por sua vez, usaram *Klebsiella pneumoniae*,

alcançando rendimento máximo de 0,46 mol 1,3-PDO/mol glicerol em experimentos em batelada sob condições de pH controladas (pH 7,0). No estudo de Jolly *et al.* (2014), os rendimentos de 1,3-PDO alcançados se aproximaram ao valor teórico (1 mol/mol glicerol consumido) usando *Lactobacillus reuteri*. Em relação à produção de H₂, Lo *et al.* (2013) alcançaram rendimento de 0,77 mol H₂/mol glicerol ao operar um reator do tipo CSTR usando *Clostridium pasteurianum* e glicerol bruto como substrato. Entretanto, ainda são poucos os trabalhos desenvolvidos estudando a conversão de glicerol em 1,3-PDO ou H₂ utilizando culturas mistas (SEIFERT *et al.*, 2009; SELEMO *et al.*, 2009; SITTIJUNDA; REUNGSANG, 2012; KIVISTÖ *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2013).

A operação de sistemas em escala real contendo culturas puras pode ser economicamente inviável devido à necessidade de usar meios minerais mais complexos e de trabalhar em condições de esterilidade (GALLARDO *et al.*, 2014; de SOUZA *et al.*, 2014; SHARMA *et al.*, 2011). Por outro lado, culturas mistas podem ter uma grande biodiversidade, mas apenas um número limitado de micro-organismos, os que melhor se adaptarem às condições impostas, é predominante. Sendo assim, um dos maiores desafios deste estudo era fazer com que o inóculo – uma cultura mista proveniente do lodo de uma estação de tratamento de efluentes anaeróbia – produzisse como principais metabólitos finais 1,3-PDO e H₂. Este trabalho objetivou adaptar lodo anaeróbio à fermentação de glicerol com produção de 1,3-PDO e H₂, bem como definir as condições operacionais de reator tipo UASB para alcançar rendimentos máximos dos produtos desejados.

4.2 Materiais e métodos

Um fluxograma pode ser consultado no Apêndice (Figura A1), visando facilitar o entendimento das etapas experimentais descritas a seguir.

4.2.1 Obtenção do inóculo

Em todos os experimentos, foi usado como inóculo um lodo granular anaeróbio, obtido a partir do fundo de um reator UASB industrial tratando águas residuárias da cervejaria Mahou - San Miguel SA (Madri, Espanha). O lodo foi elutriado e mantido a 4 °C até o momento de seu uso. Análises de sólidos suspensos voláteis (SSV) resultaram em 59 g SSV/L.

4.2.2 Design de Plackett-Burman

Para determinar os fatores que apresentam efeito significativo na produção de 1,3-PDO e H₂, foi realizado um planejamento experimental do tipo Plackett-Burman (PB). O teste de PB foi realizado em frascos reatores, em batelada, conforme descrito no item 4.2.3, a seguir. Foram avaliadas doze variáveis quantitativas e uma variável qualitativa (lodo com ou sem pré-tratamento térmico) em 20 ensaios montados de forma aleatória. Cada variável foi testada nos níveis baixo (-1) e alto (+1), em duplicata. A matriz do planejamento é apresentada na Tabela 4.1. Os valores dos níveis foram selecionados de acordo com registros na literatura referentes à produção de H₂ e/ou 1,3-PDO a partir de culturas puras ou enriquecidas (CHOOKAEW *et al.*, 2014; ROSSI *et al.*, 2013; VARRONE *et al.*, 2013). As respostas obtidas foram rendimento de 1,3-PDO e de H₂ (mol/mol de glicerol consumido). Uma análise de variância (ANOVA) foi realizada para achar as variáveis que possuem efeito significativo nas respostas (quando $p < 0,05$) após 24 h de experimento. O pré-tratamento térmico foi executado fervendo-se o lodo previamente elutriado a 100 °C por 15 minutos, com o objetivo de inibir os micro-organismos metanogênicos presentes.

Tabela 4.1 – Matriz do delineamento experimental de Plackett-Burman para avaliação dos fatores significativos (X_1 a X_{13}) para a produção de 1,3-propanodiol e hidrogênio por cultura mista

Ensaio	X_1 Glicerol g/L	X_2 pH	X_3 Ext. de levedura g/L	X_4 Triptona g/L	X_5 Peptona g/L	X_6 $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ g/L	X_7 KH_2PO_4 g/L	X_8 $(NH_4)_2SO_4$ g/L	X_9 NH_4Cl g/L	X_{10} $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ g/L	X_{11} $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ mg/L	X_{12} $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ mg/L	X_{13} Tratamento térmico
1	40 (+1)	5 (-1)	5 (+1)	5 (+1)	0 (-1)	1 (-1)	1 (-1)	1 (-1)	5 (+1)	0,4 (+1)	5 (+1)	0 (-1)	Com (+1)
2	40 (+1)	8 (+1)	0 (-1)	5 (+1)	5 (+1)	1 (-1)	1 (-1)	1 (-1)	0 (-1)	0,4 (+1)	0 (-1)	5 (+1)	Sem (-1)
3	5 (-1)	8 (+1)	5 (+1)	0 (-1)	5 (+1)	7 (+1)	1 (-1)	1 (-1)	0 (-1)	0,4 (+1)	5 (+1)	0 (-1)	Com (+1)
4	5 (-1)	5 (-1)	5 (+1)	5 (+1)	0 (-1)	7 (+1)	5 (+1)	1 (-1)	0 (-1)	0,4 (+1)	0 (-1)	5 (+1)	Sem (-1)
5	40 (+1)	5 (-1)	0 (-1)	5 (+1)	5 (+1)	1 (-1)	5 (+1)	2 (+1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	Com (+1)
6	40 (+1)	8 (+1)	0 (-1)	0 (-1)	5 (+1)	7 (+1)	1 (-1)	2 (+1)	5 (+1)	0,4 (+1)	0 (-1)	0 (-1)	Sem (-1)
7	40 (+1)	8 (+1)	5 (+1)	0 (-1)	0 (-1)	7 (+1)	5 (+1)	1 (-1)	5 (+1)	0,4 (+1)	0 (-1)	0 (-1)	Sem (-1)
8	40 (+1)	8 (+1)	5 (+1)	5 (+1)	0 (-1)	1 (-1)	5 (+1)	2 (+1)	0 (-1)	0,4 (+1)	5 (+1)	0 (-1)	Sem (-1)
9	5 (-1)	8 (+1)	5 (+1)	5 (+1)	5 (+1)	1 (-1)	1 (-1)	2 (+1)	5 (+1)	0 (-1)	5 (+1)	5 (+1)	Sem (-1)
10	40 (+1)	5 (-1)	5 (+1)	5 (+1)	5 (+1)	7 (+1)	1 (-1)	1 (-1)	5 (+1)	0,4 (+1)	0 (-1)	5 (+1)	Com (+1)
11	5 (-1)	8 (+1)	0 (-1)	5 (+1)	5 (+1)	7 (+1)	5 (+1)	1 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	5 (+1)	0 (-1)	Com (+1)
12	40 (+1)	5 (-1)	5 (+1)	0 (-1)	5 (+1)	7 (+1)	5 (+1)	2 (+1)	0 (-1)	0 (-1)	5 (+1)	5 (+1)	Sem (-1)
13	5 (-1)	8 (+1)	0 (-1)	5 (+1)	0 (-1)	7 (+1)	5 (+1)	2 (+1)	5 (+1)	0,4 (+1)	0 (-1)	5 (+1)	Com (+1)
14	5 (-1)	5 (-1)	5 (+1)	0 (-1)	5 (+1)	1 (-1)	5 (+1)	2 (+1)	5 (+1)	0,4 (+1)	0 (-1)	0 (-1)	Com (+1)
15	5 (-1)	5 (-1)	0 (-1)	5 (+1)	0 (-1)	7 (+1)	1 (-1)	2 (+1)	5 (+1)	0 (-1)	5 (+1)	0 (-1)	Sem (-1)
16	5 (-1)	5 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	5 (+1)	1 (-1)	5 (+1)	1 (-1)	5 (+1)	0 (-1)	5 (+1)	5 (+1)	Sem (-1)
17	40 (+1)	5 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	7 (+1)	1 (-1)	2 (+1)	0 (-1)	0 (-1)	5 (+1)	5 (+1)	Com (+1)
18	40 (+1)	8 (+1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	1 (-1)	5 (+1)	1 (-1)	5 (+1)	0 (-1)	5 (+1)	5 (+1)	Com (+1)
19	5 (-1)	8 (+1)	5 (+1)	0 (-1)	0 (-1)	1 (-1)	1 (-1)	2 (+1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	5 (+1)	Com (+1)
20	5 (-1)	5 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	1 (-1)	1 (-1)	1 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	Sem (-1)

4.2.3 Ensaios em reatores de batelada

O teste de PB foi realizado através da montagem de um experimento em batelada, utilizando biorreatores (frascos de soro de 35 mL). Cada reator continha volume útil de 20 mL. A composição do meio, o pH inicial e o pré-tratamento dado ao lodo (inóculo) variaram de acordo com o design experimental descrito na Tabela 4.1. Como substrato foi utilizado glicerol quimicamente puro (85%, grau Ph Eur - Merck). O ajuste do pH foi realizado com NaOH ou HCl 1 M.

Os frascos de soro foram fechados com rolhas de borracha butílica e lacrados com tampas de alumínio. Em seguida foram autoclavados por 15 min a 1 atm. Após esfriamento do meio, foram inoculados 5 g de lodo granular em cada reator. O lodo utilizado no inóculo foi previamente filtrado em gaze estéril, visando à remoção do excesso de água. Os frascos foram purgados com N₂:CO₂ 80:20 por 3 minutos. A incubação foi estática, na ausência de luz, em câmara termostática a 30 °C. As amostras para análise das fases líquida (glicerol, 1,3-PDO e outros produtos de fermentação) e gasosa (H₂, CH₄ e CO₂) foram coletadas após 24h e após 5 dias da montagem inicial do experimento. Com base nos resultados obtidos, foram ajustados os parâmetros para a etapa seguinte.

4.2.4 Ensaio em reatores de fluxo contínuo

Nesta fase foram utilizados dois reatores do tipo UASB em acrílico, denominados R1 e R2 (Figura 4.1), cada um com volume total de 5,4 L, trabalhando com tempo de detenção hidráulica médio de 20 h. A inoculação dos reatores se deu através do preenchimento de 1/3 de seu volume total com lodo previamente elutriado (aproximadamente 18 g SSV/L reator).

A carga de glicerol foi aumentada gradativamente (de 5 a 15 g glicerol/L·d) até alcançar a carga orgânica de glicerol (CO-G) máxima admissível pelo sistema. O monitoramento dos reatores foi feito através de análises de suas fases líquidas e gasosas, de duas a três vezes por semana. Os reatores foram mantidos numa sala termostatizada a 30 °C. Para cada reator, o afluente era mantido em refrigerador, em recipientes de volume compatível com o volume necessário para dois a três dias de alimentação, sendo a vazão afluente controlada por bomba peristáltica.

A solução afluente era composta por glicerol diluído em solução contendo macro e micro nutrientes. Para reduzir o custo operacional de tratamento de águas residuárias, é desejável não adicionar qualquer suplemento. Sendo assim, a operação dos reatores foi inicialmente realizada com um meio mineral simples baseado em Varrone *et al.* (2013),

modificado (Tabela 4.2 - Meio 1). O pH afluente foi de 6,8 (R1) e 5,5 (R2). Após 83 dias de operação o meio mineral foi substituído pelo Meio 2 (Tabela 4.2), visando o aumento da produção de 1,3-PDO.

Figura 4.1 – Fotografia dos reatores tipo UASB operados durante 165 dias de experimento



Foto: a autora

Tabela 4.2 – Composição dos diferentes meios utilizados na operação dos reatores UASB

Meio 1 ¹ (g/L)	Meio 2 ² (g/L)	Solução micronutrientes ² (mg/L)
3,4 K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	0,28 NH ₄ Cl	2,0 FeCl ₂ ·4H ₂ O
1,3 KH ₂ PO ₄	0,25 K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	0,05 ZnCl ₂
2,0 (NH ₄) ₂ SO ₄	0,328 KH ₂ PO ₄	0,5 MnCl ₂ ·4H ₂ O
0,2 MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1 MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,142 NiCl ₂ ·6H ₂ O
0,02 CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,01 CaCl ₂ ·H ₂ O	0,05 H ₃ BO ₃
0,005 FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,1 extrato de levedura	0,038 CuCl ₂ ·2H ₂ O
0,1 extrato de levedura	1 mL/L solução micronutrientes	2,0 CoCl ₂ ·6H ₂ O
		0,09 AlCl ₃ ·6H ₂ O
		0,05 (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O
		1,0 EDTA
		0,2 resazurina

¹ VARRONE *et al.*, 2013 + extrato de levedura; ² FLORENCIO, 1994

4.2.5 Métodos analíticos

As análises de SSV, demanda química de oxigênio (DQO) e alcalinidade foram determinadas segundo os métodos 2540-E, 5220-D e 2320-B respectivamente, descritos no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2012).

Para quantificação dos gases foi utilizado cromatógrafo de gases *Bruker Serie Bypass* 450-GC, equipado com um injetor *on column* a 150 °C, duas colunas a 50 °C (1ª: CP2056 0,6 m x 1/8" *Ultimetal Cromosorb* GHP 100-120 mesh; 2ª: CP81073 0,5 m x 1/8" *Ultimetal Hayesep* Q80-100 mesh), um detector de condutividade térmica (TCD) a 200 °C para a determinação de CO₂ e H₂ e um detector de ionização de chama (FID) a 250 °C para o CH₄. Como gás de transporte se utilizou N₂. A produção total de biogás nos reatores UASB foi determinada mediante gasômetros (*Schlumberger* ou *Ritter*).

O glicerol, 1,3-PDO e outros produtos da fermentação anaeróbia foram quantificados através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (*Agilent* 1200 Infinity Series), composto por coluna *Agilent* MetaCarb 67H 300 x 6.5 mm e um detector de índice de refração (*Agilent* 1260 Infinity Refractive Index Detector - RID) operado a 40 °C, com fluxo isocrático de 0,65 ml/min de H₂SO₄ a 0,05% como solvente transportador. O volume de injeção da amostra foi de 20 µl e a identificação de picos foi efetuada por comparação do tempo de retenção entre a amostra e os compostos padrão, através do software *OpenLab* 1260 (*Agilent*). Todas as amostras injetadas foram previamente centrifugadas por 10 minutos a 14000 rpm, a fim de remover as células em suspensão.

Para a montagem do delineamento experimental de PB e a análise estatística dos dados foi utilizado o software estatístico *Design-Expert*® versão 6 (DX6), *Stat-Ease Inc.* (Minneapolis, USA).

4.2.6 Análise da morfologia e diversidade de micro-organismos

Microscopia de varredura

Amostras de lodo granular do inóculo e dos reatores UASB foram analisadas quanto à sua integridade estrutural e morfologia de micro-organismos em microscópio eletrônico de varredura (MEV). Para preservar a estrutura dos grânulos, as amostras foram previamente fixadas em glutaraldeído 2,5% por 2 h. Em seguida, foram lavadas, sob agitação suave, com cacodilato sódico (0,2 M, pH 7,1) por 30 min. Os próximos passos compreendem a desidratação das amostras em etanol 10%, 30%, 50%, 70% e 90%, por 20 min em cada solução. As amostras foram armazenadas em etanol P.A.

Previamente às análises em microscópio, modelo *Hitachi S-3000N* com analisador *INCAx-sight (Oxford Instruments)*, as amostras foram submetidas a dióxido de carbono líquido para secagem em ponto crítico (*K850 Critical Point Dryer*) e metalizadas em banho de ouro (*Quorum Technologies, Q150T S*).

Extração de DNA e PCR

A extração de DNA das amostras de lodo granular correspondentes ao inóculo e às coletas dos reatores UASB foi realizada com *PowerSoil™ DNA Isolation Kit (Mobio Laboratories, California, USA)*.

Para amplificação do fragmento de DNAr 16S e sua posterior análise por DGGE, foram utilizados os conjuntos de *primers* (iniciadores) 341F-GC e 907R, para o domínio *Bacteria*, e 622F-GC e 1100R, para o domínio *Archaea* (Tabela 4.3). O mix para amplificação teve um volume final de 50 µL, contendo tampão 1X (sem MgCl₂), MgCl₂ 2 mM, desoxirribonucleotídeos trifosfatados 0,25 mM cada, *primer* F (0,5 µM), *primer* R (0,5 µM), enzima *Taq* DNA polimerase (1U/reacção) e 0,4 µL do DNA extraído. O volume foi completado para 50 µL com água ultrapura estéril. Cada amostra foi feita em duplicata. Os 100 µL totais de produtos de PCR foram concentrados em até 35 µL, utilizando-se equipamento *Eppendorf Concentration plus*. Após esse procedimento, as amostras foram carregadas no gel de DGGE. Um controle negativo sem DNA foi incluído para confirmar a não contaminação dos reagentes da amplificação. O tamanho do produto de PCR foi estimado por eletroforese em gel de agarose 1% após tratamento com brometo de etídio (1µg/mL), utilizando o conjunto de marcadores de peso molecular φ-29/HindIII.

Tabela 4.3 – *Primers* específicos da reação em cadeia da polimerase para a amplificação de um fragmento do gene RNAr 16S, de *Bacteria* e *Archaea*

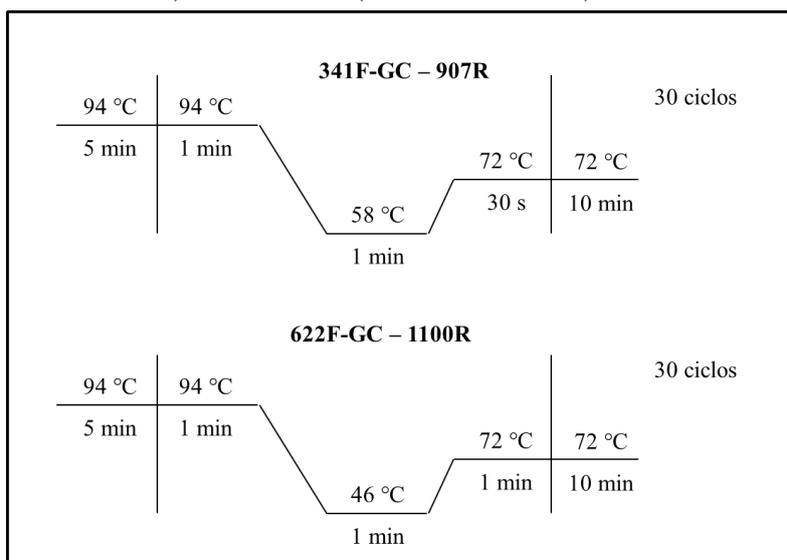
Primer	Sequência do primer (5'-3')	Referência
341F-GC	†CCTACGGGAGGCAGCAG	Muyzer <i>et al.</i> (1993)
907R	CCGTCAATTCMTTGTGAGTTT	Chan <i>et al.</i> (2001)
622F-GC	†TGAAATCYRRTAATCCC	Chan <i>et al.</i> (2001)
1100R	GGGTTGCGCTCGTTG	Lane (1991)

Código IUB (*Internacional Union of Biochemistry*): M = A, C; Y = T, C

†Grampo GC, 5'-GCCCCGCCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGG-3', adicionado à extremidade 5' do *primer*

Os programas de PCR impostos ao termociclador (modelos *GeneAmp PCR System 2400 - Applied Biosystems, USA* e *T100™ Thermal Cycler - Bio-Rad Laboratories, USA*) podem ser vistos na Figura 4.2.

Figura 4.2 – Conjuntos de *primers* e programas utilizados para a amplificação de genes RNAr 16S, de *Bacteria* (341F-GC – 907R) e de *Archaea* (622F-GC – 1100R)



DGGE

O produto da reação de PCR foi separado em bandas em gel com gradiente desnaturante. A DGGE foi realizada conforme método descrito por Muyzer *et al.* (1993), em aparelho *D-Code* (*Bio-Rad Laboratories*, Califórnia, USA). Isto é, os produtos de PCR correram em gel de acrilamida/bis-acrilamida (37,5:1) 8% (peso/volume), em tampão TAE (40 mM Tris base, 1,0 mM EDTA, 20 mM acetato de sódio, pH 7,4) usando gradientes desnaturantes variando de 40 a 70% (onde 100% desnaturante contém 7 M de uréia e formamida a 40%). A eletroforese foi realizada sob tensão de 240 V por 4 h a 60°C. Os géis foram corados com brometo de etídio, visualizados em um transiluminador UV e fotografados.

Sequenciamento

As bandas de DGGE foram excisadas, reamplificadas por PCR, purificadas com polietilenoglicol (10g PEG6000 em 50 ml NaCl 2,5M) e sequenciadas pelo serviço de sequenciamento do *Centro de Astrobiología* – INTA-CSIC (Madrid). As sequências foram analisadas utilizando a base de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) e a ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), disponível através do site <<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>.

4.3 Resultados e discussão

4.3.1 Composição do meio para produção de 1,3-PDO e H₂

A influência de 13 variáveis nos rendimentos de 1,3-PDO e hidrogênio (mol/mol de glicerol consumido) é apresentada na Tabela 4.4. A análise de variância mostrou que o modelo para produção de 1,3-PDO foi significativo ($p = 0,0127$). O coeficiente de determinação (R^2) – uma medida de ajustamento do modelo estatístico linear em relação aos valores observados – foi igual a 0,94. Isso quer dizer que 94% dos valores observados no experimento de PB são explicados pelo modelo.

Tabela 4.4 – Níveis das variáveis e resultados da análise estatística do desenho de Plackett-Burman após 24h da montagem do ensaio

Variável	Nível		1,3-PDO (mol 1,3-PDO/mol glicerol)			H ₂ (mol H ₂ /mol glicerol)		
	-1	+1	Coefficiente	F	<i>p</i>	Coefficiente	F	<i>p</i>
Glicerol (g/L)	5	40	-0,07	19,88	0,004*	-0,08	1,53	0,26
pH	5	8	0,03	3,00	0,13	0,03	0,25	0,64
Extrato de levedura (g/L)	0	5	0,05	8,96	0,02*	0,06	0,92	0,37
Triptona (g/L)	0	5	-0,05	8,25	0,03*	0,06	0,90	0,38
Peptona (g/L)	0	5	0,04	5,02	0,07	0,005	0,005	0,94
K ₂ HPO ₄ (g/L)	1	7	-0,01	0,61	0,46	-0,009	0,023	0,88
KH ₂ PO ₄ (g/L)	1	5	0,009	0,33	0,58	-0,05	0,58	0,47
(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	0	5	0,01	0,72	0,43	0,02	0,067	0,80
NH ₄ Cl (g/L)	0	5	-0,03	2,59	0,16	0,05	0,60	0,47
MgSO ₄ (g/L)	0	0,4	0,05	8,41	0,03*	-0,05	0,57	0,48
FeSO ₄ (mg/L)	0	5	-0,02	1,94	0,21	0,02	0,14	0,72
CaCl ₂ (mg/L)	0	5	-0,04	6,47	0,04*	0,04	0,41	0,54
Tratamento térmico	sem	com	0,08	24,45	0,003*	-0,09	2,09	0,20

Coefficiente: coeficiente linear do modelo; F: o valor F provém do teste Fisher de significância; *Variáveis significativas ($p < 0,05$)

Seis variáveis apresentaram efeitos significativos (valor de $p < 0,05$) ao rendimento de 1,3-PDO: concentração de glicerol, extrato de levedura, triptona, MgSO₄, CaCl₂ e tratamento térmico do lodo (Tabela 4.4). O rendimento de 1,3-PDO variou entre 0,0 (reatores que não produziram 1,3-PDO) e 0,5 mol/mol glicerol degradado (Apêndice – Tabela A1).

As variáveis extrato de levedura, MgSO₄, e tratamento térmico mostraram efeitos positivos sobre o rendimento de 1,3-PDO, isso quer dizer que a influência destes fatores é maior quando estes estão em seus níveis altos (+1). Por outro lado, a concentração de

glicerol, triptona e CaCl_2 parecem ter efeitos negativos, isto é, possuem maior influência no rendimento de 1,3-PDO quando estes estão em seus níveis baixos (-1) (Tabela 4.4).

Com base nos resultados obtidos no experimento de PB, decidiu-se operar dois reatores UASB (R1 e R2), utilizando-se um meio mineral simples contendo, entre outros compostos, MgSO_4 , CaCl_2 e extrato de levedura em sua composição (Tabela 4.2 - Meio 1). O fato de que a concentração de glicerol mostrou efeito negativo no rendimento de 1,3-PDO sugeria que o inóculo deveria ser adaptado ao glicerol como substrato, e, portanto, a operação dos reatores iniciaria com concentrações baixas de glicerol (5 g gli/L). Para inibir a atividade metanogênica, um dos reatores (R2) foi operado com pH inicial ácido (5,5), uma vez que os reatores montados para o experimento de PB demonstraram que, apesar do pré tratamento térmico do lodo, houve uma pequena produção de metano após 5 dias.

Quanto ao rendimento de hidrogênio, o modelo linear não foi significativo ($p = 0,62$). Há uma chance de 78% de que este modelo poderia ocorrer devido ao ruído, isto é, devido a uma sequência de erros aleatórios. Neste caso, não há termos significativos do modelo.

4.3.2 Operação dos reatores UASB

Visando a adaptação do lodo anaeróbio ao glicerol, dois reatores UASB foram operados inicialmente com carga orgânica (CO-G) igual a 5 g glicerol/L·d usando meio mineral mínimo (Tabela 4.2 - Meio 1) e pH inicial igual a 6,8 (R1) e 5,5 (R2).

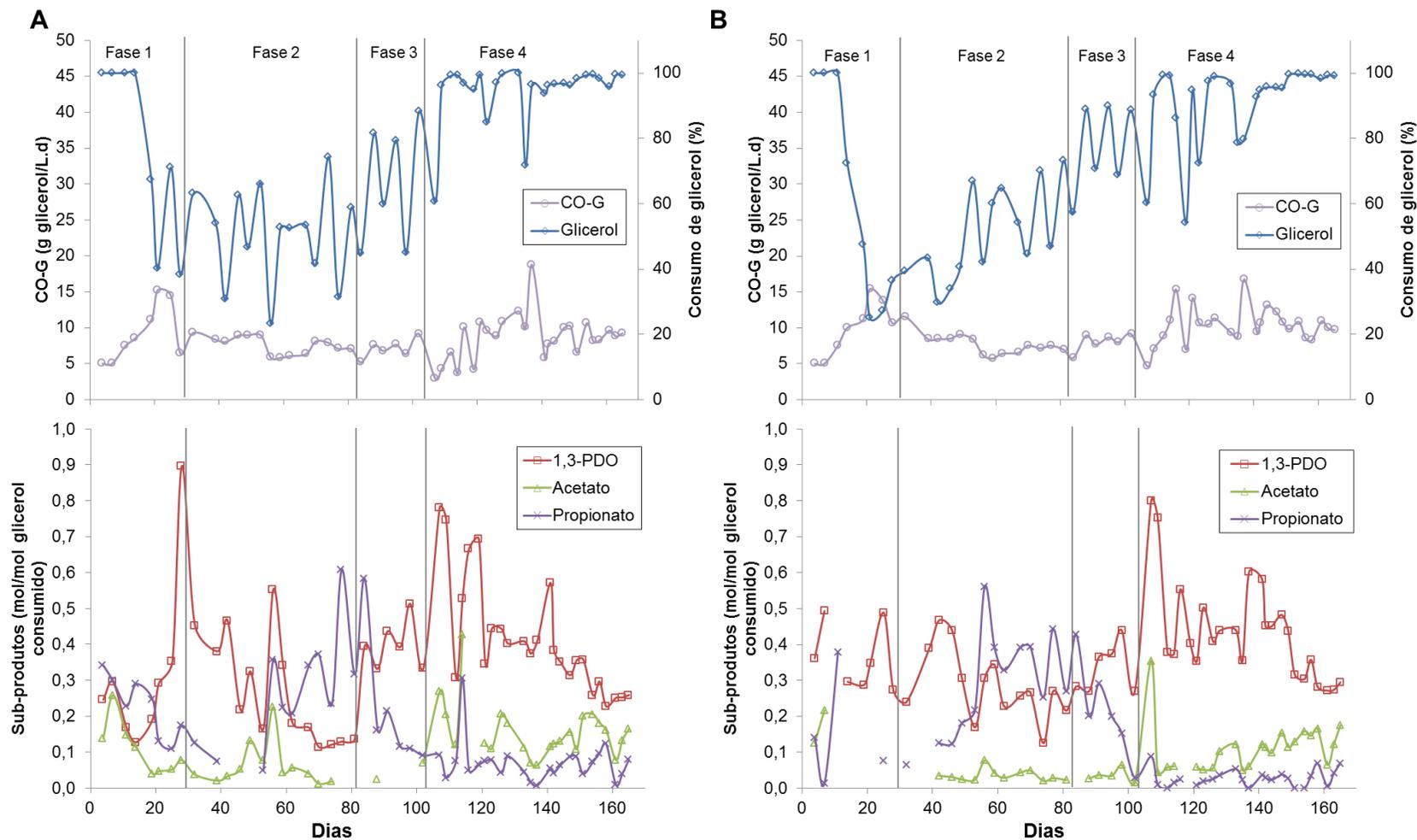
A Figura 4.3 mostra que o consumo de glicerol nos primeiros dias é de 100%, dessa forma, a carga orgânica foi gradativamente aumentada até alcançar 15 g glicerol/L·d (Fase 1). Isso levou a uma redução drástica nas eficiências de remoção (consumo de glicerol), de modo que, após 30 dias de operação, tentou-se ajustar a CO-G a 8 g glicerol/L·d (Fase 2 – Figura 4.3 e Tabela 4.5); e passou-se a ser adicionada uma solução de micronutrientes (Tabela 4.2).

Com o passar do tempo, o consumo de glicerol aumentou gradativamente no R2 (Figura 4.3). No entanto, as mudanças ocorridas na Fase 2 levaram a um ligeiro aumento no rendimento de propionato e uma diminuição no rendimento de 1,3-PDO (Tabela 4.5 e Figura 4.3). Finalmente, no dia 83, o meio utilizado foi alterado para o Meio 2 (Tabela 4.2). A mudança do meio mineral utilizado (Fase 3) levou a uma diminuição no propionato produzido ($<0,2$ mol propionato/mol glicerol) e um aumento no rendimento de 1,3-PDO (Figura 4.3 e Tabela 4.5).

O pH médio efluente entre as Fases 1 e 3 foi igual a 3,9 (R1) e 3,6 (R2). Diferentes cepas microbianas, tais como *Clostridium*, *Klebsiella* e *Citrobacter* produzem 1,3-PDO a partir do glicerol como parte do seu metabolismo de regeneração de NADH. O pH ótimo para a produção de 1,3-PDO por estes micro-organismos se encontra entre 5,5 e 7,0 (SAXENA *et al.*, 2009). Sendo assim, a partir do dia 105 de operação passou-se a adicionar 0,3 g de bicarbonato de sódio (NaHCO_3)/g DQO afluente, visando o aumento da alcalinidade (Fase 4). O que se provou ser eficaz, uma vez que o consumo de glicerol atingiu valores superiores a 90% em ambos reatores e o glicerol voltou a ser convertido principalmente em 1,3-PDO (Figura 4.3 e Tabela 4.5). Nesta fase, o pH efluente foi de aproximadamente 5, em ambos reatores. O rendimento máximo de 0,8 mol 1,3-PDO/mol glicerol foi alcançado, nos dois reatores, mas apenas nos dias 107 e 109. Além disso, também foram detectadas pequenas quantidades de etanol (0,01-0,07 para R1 e 0,01-0,05 mol etanol/mol glicerol para R2).

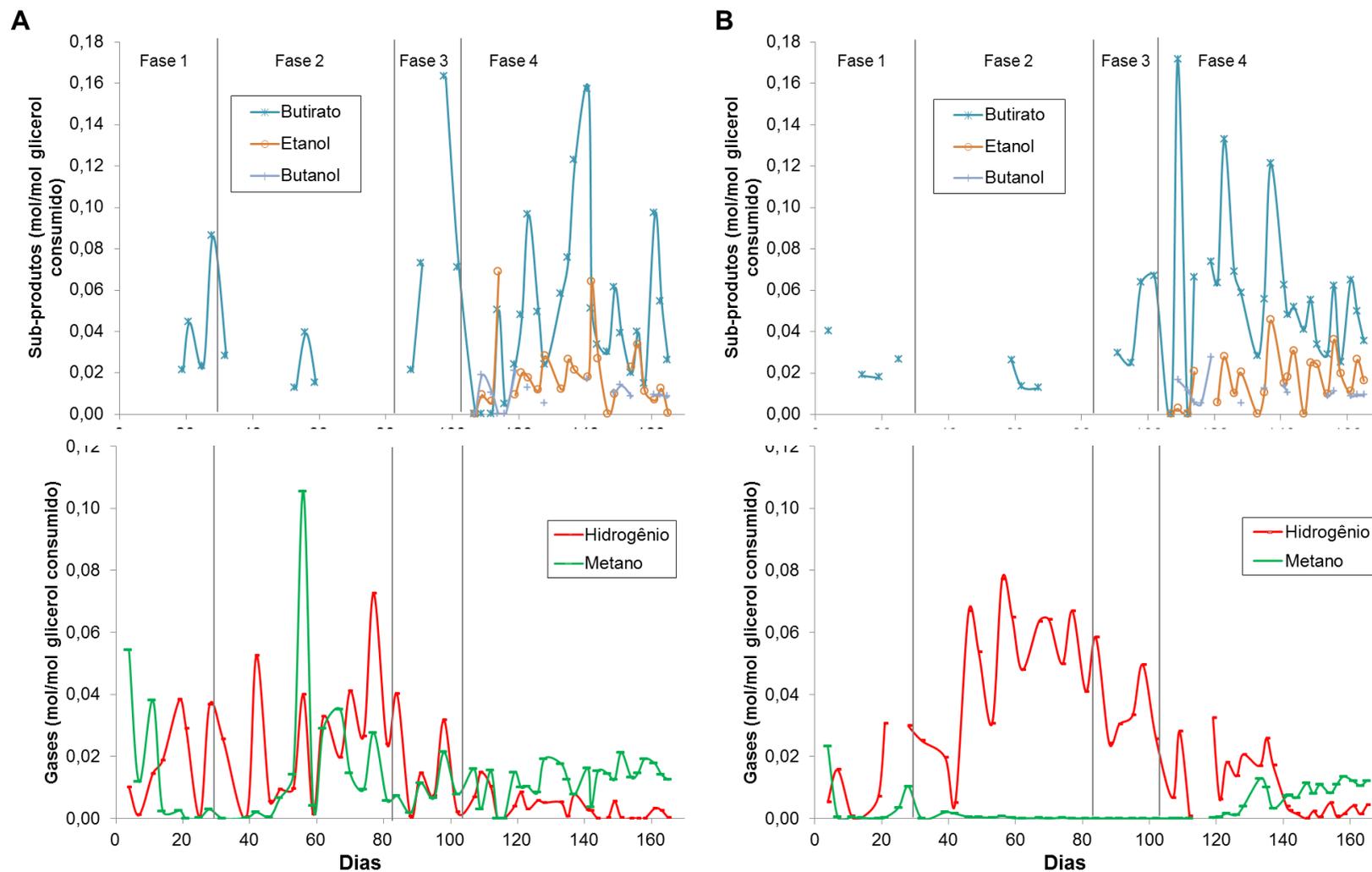
A análise da composição do biogás mostrou que para R1 o rendimento médio de metano foi de 0,01 mol CH_4 /mol glicerol ao longo de todo o experimento. No R2, não houve produção de metano durante os primeiros 104 dias de operação, nos quais o pH inicial era ácido (Figura 4.4B). Após a adição de NaHCO_3 (Fase 4), nota-se um ligeiro aumento na produção de CH_4 (rendimento máximo de 0,01 mol CH_4 /mol glicerol). A produção de H_2 oscilou entre 0,01 e 0,07 mol H_2 /mol glicerol para R1 e 0,01 e 0,08 mol H_2 /mol glicerol para R2. Vale salientar que a produção de H_2 e de 1,3-PDO são rotas que competem em termos de redução equivalentes (GALLARDO *et al.*, 2014).

Figura 4.3 – Carga orgânica de glicerol (CO-G), consumo de glicerol (%) e rendimentos dos subprodutos produzidos nos reatores R1(A), com pH inicial igual a 6,8, e R2 (B), com pH inicial igual a 5,5, ao longo do experimento



Fase 1: Meio mineral 1, Fase 2: Meio mineral 1 + micronutrientes, Fase 3: Meio mineral 2 + micronutrientes, Fase 4: Meio mineral 2 + micronutrientes + bicarbonato de sódio

Figura 4.4 – Rendimentos dos subprodutos e dos gases produzidos nos reatores R1 (A), pH 6,8, e R2 (B), pH 5,5, ao longo do experimento



Fase 1: Meio mineral 1, Fase 2: Meio mineral 1 + micronutrientes, Fase 3: Meio mineral 2 + micronutrientes, Fase 4: Meio mineral 2 + micronutrientes + bicarbonato de sódio

Tabela 4.5 – Médias e desvios padrão da carga orgânica de glicerol (CO-G), consumo de glicerol, e rendimentos dos subprodutos e hidrogênio formados nos reatores R1 e R2 durante os 165 dias de experimento

	Reator UASB 1 (R1)				Reator UASB 2 (R2)			
	Fase 1	Fase 2	Fase 3	Fase 4	Fase 1	Fase 2	Fase 3	Fase 4
CO-G (g gli/L·d)	9,2±4,0	7,6±1,2	7,1±1,3	8,6±3,2	9,8±3,8	7,7±1,5	8,0±1,2	10,4±2,6
Consumo (%)	77±27	51±15	66±19	95±9	64±34	51±14	77±14	91±13
1,3-PDO (mol/mol)	0,32±0,24	0,27±0,15	0,40±0,07	0,42±0,16	0,36±0,09	0,29±0,10	0,33±0,07	0,43±0,14
Propionato (mol/mol)	0,23±0,08	0,26±0,16	0,21±0,19	0,07±0,06	0,15±0,16	0,29±0,15	0,22±0,13	0,03±0,02
Acetato (mol/mol)	0,11±0,07	0,06±0,06	0,05±0,03	0,16±0,08	0,17±0,06	0,04±0,02	0,04±0,02	0,11±0,07
Butirato (mol/mol)	0,04±0,03	0,02±0,01	0,08±0,06	0,05±0,04	0,03±0,01	0,02±0,01	0,05±0,02	0,06±0,04
Etanol (mol/mol)	n.d.	n.d.	n.d.	0,02±0,02	n.d.	n.d.	n.d.	0,02±0,01
Butanol (mol/mol)	n.d.	n.d.	n.d.	0,01±0,01	n.d.	n.d.	n.d.	0,01±0,01
H₂ (mol/mol)	0,02±0,01	0,03±0,02	0,02±0,02	0,00±0,00	0,01±0,01	0,05±0,02	0,04±0,01	0,01±0,01

n.d.: não detectado

No presente estudo, o rendimento médio de 1,3-PDO foi de 0,35 mol/mol glicerol. Durgapal *et al.* (2014) alcançaram rendimento de 0,42 mol 1,3-PDO/mol glicerol quando *K. pneumoniae* foi cultivada em batelada alimentada (alimentações sucessivas). Metsoviti *et al.* (2013) alcançaram rendimento de aproximadamente 0,48 mol 1,3-PDO/mol de glicerol consumido usando *C. freundii* em batelada alimentada. Jolly *et al.* (2014) usaram *Lactobacillus reuteri* em estudos de batelada alimentada com a co-alimentação de glicose e glicerol na proporção molar de 1,5, alcançando rendimento de 0,97 1,3-PDO mol/mol glicerol consumido, valor muito próximo do teórico (1 mol/mol). Como pode ser visto, todos utilizaram cultivos puros. O uso de organismos geneticamente modificados também foi relatado. Przysłałowska *et al.* (2015), por exemplo, avaliaram o uso de *E. coli* recombinante, alcançando 0,4 mol 1,3-PDO/mol glicerol durante experimento de fermentação em batelada. Neste caso, o fator limitante seria a remoção do meio de crescimento, evitando assim o acúmulo de metabólitos (acetato e outros) que podem inibir o crescimento da *E. coli*.

Poucos estudos utilizaram cultivos mistos ou condições de não esterilidade. Gallardo *et al.* (2014) obtiveram o rendimento máximo de 0,52 mol 1,3-PDO/mol glicerol ao operar reator EGSB inoculado com lodo granular obtido a partir de um reator UASB usado para o tratamento de águas residuárias de cervejaria. Selembo *et al.* (2009) alcançaram 0,69 mol 1,3-PDO/mol glicerol e 0,28 mol H₂/mol glicerol usando culturas mistas (a partir de solos, adubo e lodo anaeróbio); entretanto, neste último estudo, o inóculo utilizado foi pré-aquecido, o que favorece a predominância de espécies de *Clostridium*, conhecidas produtoras de 1,3-PDO (BIEBL *et al.*, 1999). Kivistö *et al.* (2013) relataram valor igual a 0,66 mol 1,3-PDO/mol glicerol ao trabalhar com cultivos não estéreis de *Halanaerobium saccharolyticum* (bactéria halofílica) e *Clostridium butyricum*; porém, estes autores forneceram vitamina B₁₂ (500 µg/L) durante todo o processo de fermentação, favorecendo assim, a rota metabólica para produção de 1,3-PDO por estes micro-organismos. Porém, esta prática geraria altos custos de produção caso fosse adotada em maior escala.

A diversidade de produtos finais gerada durante o processo de fermentação de glicerol está diretamente relacionada com a flexibilidade metabólica da biomassa. A fermentação de glicerol por enterobactérias resulta comumente no acúmulo de dois produtos principais, 1,3-PDO e acetato, enquanto que os produtos secundários (lactato, formato, succinato e etanol) são produzidos diferencialmente de acordo com as condições de cultivo. Quando a fermentação do glicerol se dá por *C. butyricum*, são produzidos 1,3-PDO como composto principal, dois ácidos (butirato e acetato) como produtos secundários

e CO₂ e H₂ como produtos gasosos (BARBIRATO *et al.*, 1998). No presente estudo, foi gerado 1,3-PDO como principal subproduto, e propionato e acetato como principais produtos secundários, seguidos de discretas quantidades de butirato, etanol e butanol (Figura 4.4 e Tabela 4.5).

Apesar do rendimento médio de 1,3-PDO de 0,35 mol/mol glicerol relatado aqui, a produção de 1,3-PDO por culturas mistas se mostra vantajosa, uma vez que a fermentação em condições de não esterilidade representa uma potencial redução de custos (GALLARDO *et al.*, 2014). Entretanto, estudos complementares são necessários, buscando-se aprimorar as condições operacionais que conduzam a maiores rendimentos dos produtos desejados.

4.3.3 Ecologia microbiana e estrutura do lodo granular

Na análise da estrutura do lodo granular, feita por MEV, foi possível observar células em formas, especialmente, de bacilo e filamento. Nas Figuras 4.5 e 4.6, pode-se observar a estrutura de grânulos inteiros na primeira coluna; de grânulos cortados, para verificação da estrutura interna, na segunda coluna; e na terceira coluna, detalhes dos cortes. As Fig. 4.5a e 4.5b ilustram amostras do inóculo. As Fig. 4.5c a 4.5e e 4.5f a 4.5h correspondem aos grânulos amostrados no R1 e no R2, no final da Fase 3, respectivamente. As Figuras 4.6a a 4.6c e 4.6d a 4.6f correspondem, respectivamente, aos grânulos amostrados no R1 e no R2, no final da Fase 4.

Nota-se, pela análise das Figuras 4.5e e 4.5h a ocorrência, em ambos reatores R1 e R2, de células filamentosas densamente amontoadas no interior dos grânulos ao final da Fase 3, e, em alguns casos, também presentes em sua superfície (Fig. 4.5f). Por outro lado, ao final da Fase 4, nota-se a ocorrência, no interior dos grânulos, de células alongadas com as extremidades rompidas, o que indica que estão mortas, e que conservam-se apenas as paredes celulares (Fig. 4.6c e 4.6f). Dada a morfologia das mesmas, sugere-se que se trata de *Methanosaeta*, muito abundantes no lodo granular metanogênico, mas que ao estar submetidas a condições não metanogênicas acabam morrendo.

Figura 4.5 – Estruturas do lodo granular do inóculo e ao final da Fase 3 de operação dos reatores 1 (R1) e 2 (R2) analisadas por microscopia eletrônica de varredura. a, c, f: grânulo inteiro; b, d, g: corte longitudinal; e, h: detalhes do grânulo cortado

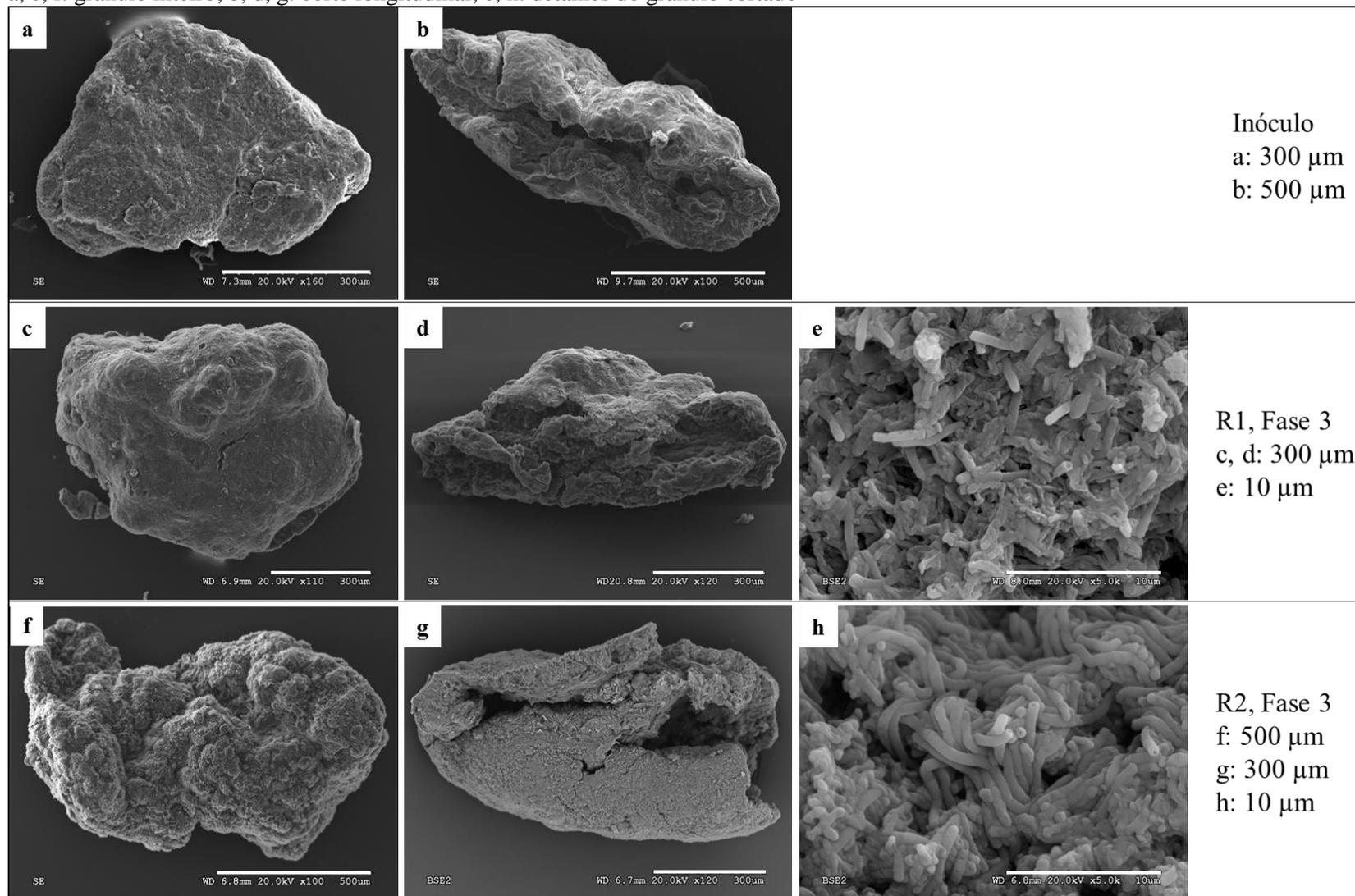
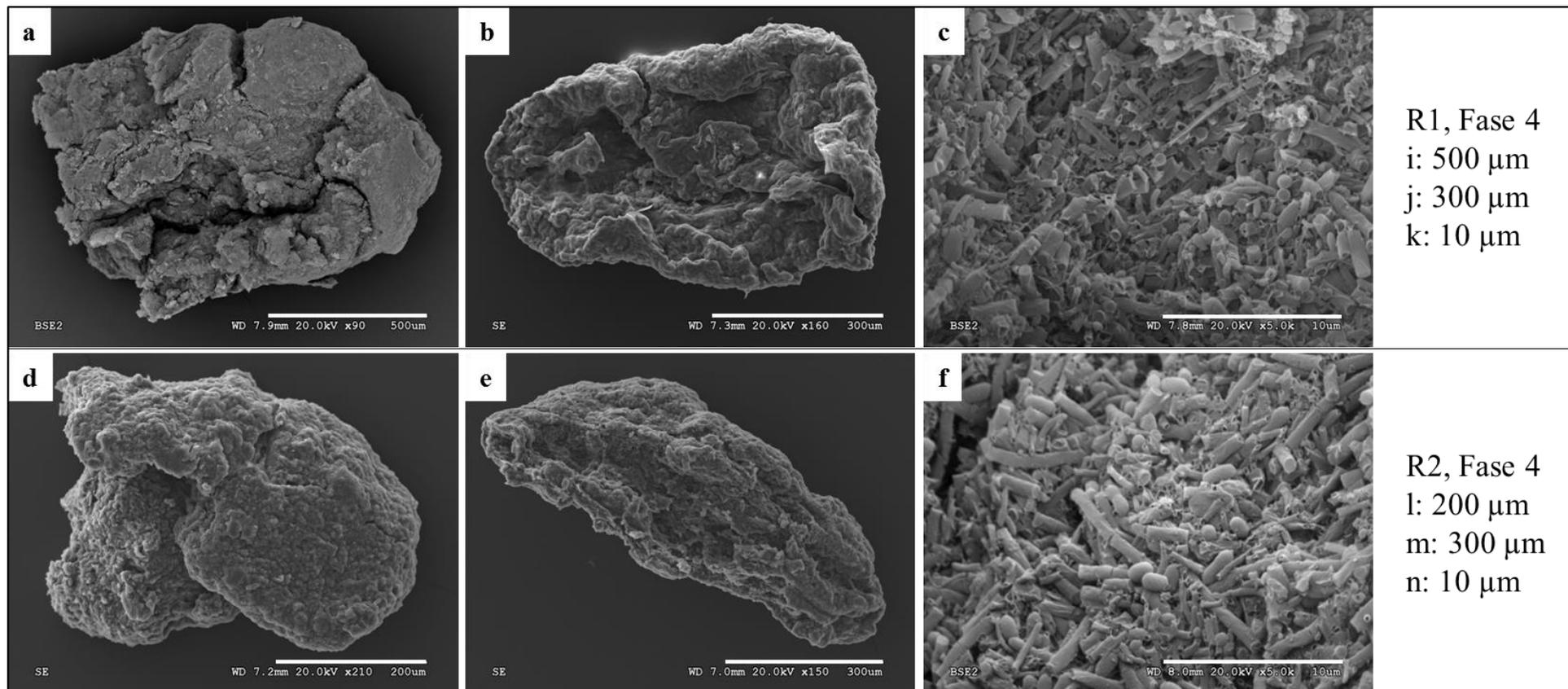


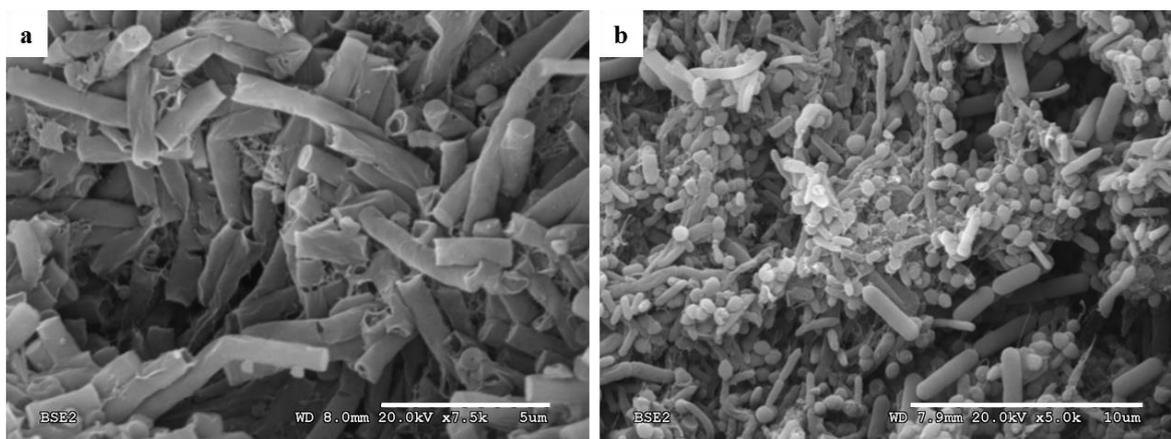
Figura 4.6 – Estruturas do lodo granular ao final da Fase 4 de operação dos reatores 1 (R1) e 2 (R2) analisadas por microscopia eletrônica de varredura. a, d: grânulo inteiro; b, e: corte longitudinal; c, f: detalhes do grânulo cortado



Segundo Díaz *et al.* (2006), micro-organismos filamentosos como *Methanosaeta* são responsáveis pela ocorrência de áreas vazias e canais que penetram o interior dos grânulos mais antigos presentes num reator em operação. Ainda de acordo com estes autores, lodos granulares metanogênicos possuem três estágios de maturação dos grânulos: grânulos pretos, cinzas e marrons. Neste último caso, os grânulos correspondem a grânulos velhos. No presente estudo, observou-se a ocorrência de muitos grânulos marrons, de formato alongado e macio, os quais apresentavam, em especial ao final da operação dos reatores (Fase 4), características aproximadas às descritas por Díaz *et al.* (2006).

A Figura 4.7a mostra em detalhes os prováveis filamentos de *Methanosaeta* mortos. Por outro lado, na Fig. 4.7b é possível observar uma alta diversidade de células com forma de cocos, cocobacilos e bacilos que são, hipoteticamente, as adaptadas às condições operacionais impostas.

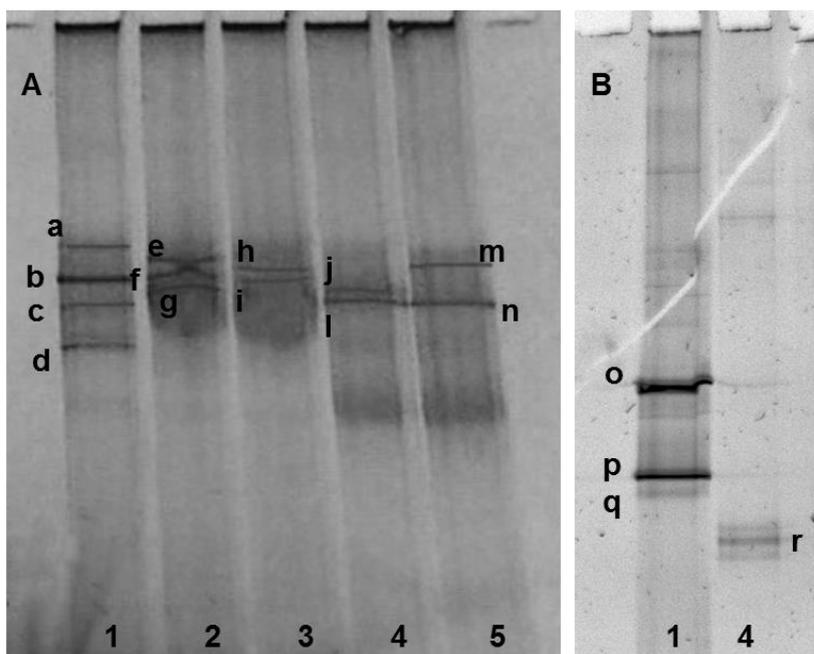
Figura 4.7 – Morfologias microbianas do lodo granular ao final da Fase 4 de operação dos reatores 1 (R1) e 2 (R2) analisadas por microscopia eletrônica de varredura. a: filamentos com extremidades rompidas com forma similar à *Methanosaeta* (escala: 5 μm); b: diversidade de células possivelmente adaptadas às condições de operação (escala: 10 μm)



As análises de PCR/DGGE sugerem uma baixa diversidade bacteriana, mesmo no inóculo, uma vez que ao iniciar a operação dos reatores, apenas 4 bandas foram detectadas (Figura 4.8A - 1). A banda **b** foi relacionada, com 95% de similaridade, a *Syntrophobacter* sp. não cultivado. Tang *et al.* (2015) relatam em seu artigo de revisão a presença de espécies relacionadas a *Syntrophobacter* em comunidades microbianas de reatores CSTR voltados para produção de metano. Espécies relacionadas a este gênero são oxidadoras de propionato (formando acetato e CO_2), e seu crescimento ocorre por metabolismo sintrófico com micro-organismos consumidores de H_2 e/ou ácido fórmico; ou utilizando sulfato como acceptor de elétrons (GARRITY, 2005). A banda **d**, por sua vez, foi relacionada com 99% de similaridade a uma bactéria da família *Nitrospiraceae* não

cultivada (NCBI KJ127962), cuja sequência foi obtida a partir de amostras de lodo de uma máquina de papel na China. Dado que a família *Nitrospiraceae* inclui os gêneros *Nitrospira*, *Leptospirillum*, *Magnetobacterium* e *Thermodesulfovibrio*, cuja presença não é esperada em um lodo granular metanogênico, pode-se pensar que se trate de um novo gênero não descrito, mas que deve desempenhar um papel metabólico importante no lodo anaeróbio.

Figura 4.8 – Geis de DGGE para as comunidades de *Bacteria* (A) e *Archaea* (B) ao longo da operação dos reatores UASB 1 e 2.



1: inóculo, 2: amostra referente ao reator 1 no final da Fase 3 de operação, 3: amostra referente ao reator 2 no final da Fase 3 de operação, 4: amostra referente ao reator 1 no final da Fase 4 de operação, 5: amostra referente ao reator 2 no final da Fase 4 de operação, a, ..., r: bandas cortadas para posterior sequenciamento.

A comunidade bacteriana dos reatores 1 e 2 ao final da Fase 3 são representadas pelas bandas **e**, **f**, **g** (R1), e **h** e **i** (R2), respectivamente. Nesta fase, todos os microorganismos sequenciados correspondem ao gênero *Pseudomonas*: *Pseudomonas* sp. (banda **e**), *P. veronii* (banda **f**), e *P. fluorescens* (bandas **g**, **h**, **i**). O gênero *Pseudomonas* compreende espécies capazes de utilizar uma ampla variedade de compostos orgânicos e inorgânicos e de viver sob diversas condições ambientais, sendo conhecido pela sua versatilidade metabólica e sua capacidade de se adaptar às condições adversas (DWORKIN, 2006). As bandas **j** e **k** representam a comunidade de bactérias no R1, e as bandas **m** e **n** representam a comunidade bacteriana no R2 ao final da operação dos reatores (final da Fase 4). A identificação das mesmas não foi possível. Nota-se que para

cada condição operacional a estrutura da comunidade microbiana dos reatores apresenta um padrão diferenciado.

No que se refere à comunidade de arqueias, ainda que o lodo granular utilizado como inóculo apresente uma alta diversidade, como era de se esperar de um lodo metanogênico (Figura 4.8B - 1), com duas bandas correspondentes a *Methanobacterium* (bandas **p** e **q**) e uma banda intensa correspondente a *Methanosaeta concilii* (banda **o**), após mais de 100 dias de operação em condições desfavoráveis para as arqueias metanogênicas, a presença das mesmas foi praticamente indetectável. As espécies de *Methanobacterium* crescem utilizando $H_2 + CO_2$ como substrato para metanogênese, e variam amplamente em comprimento, sendo comuns as formas filamentosas. O gênero *Methanosaeta* inclui células em forma de bastonetes que utilizam apenas acetato como um substrato para a metanogênese (DWORKIN, 2006). Apenas ao final da Fase 4, no R1, observou-se a ocorrência de uma nova banda (Figura 4.8B - 4, **r**) que não pode ser identificada.

4.4 Conclusão

A partir dos resultados obtidos é possível concluir que:

A produção contínua de 1,3-PDO a partir de glicerol em reatores UASB por culturas mistas é viável, com rendimento de 1,3-PDO variando entre 0,3 e 0,8 mol 1,3-PDO/mol glicerol.

A produção de hidrogênio e metano foi baixa durante a operação dos reatores.

A substituição do meio mineral 1 pelo meio 2 e a adição de alcalinidade levaram a aumento na produção de 1,3-PDO como principal subproduto da fermentação do glicerol.

Havia baixa diversidade de micro-organismos nos reatores após 100 dias de operação. As condições restritivas impostas durante a operação dos reatores, tais como a alimentação exclusiva com glicerol e os baixos pHs de operação dos mesmos, levaram à morte das arqueias metanogênicas.

Capítulo 5 – Conclusão geral

A partir dos resultados obtidos na primeira etapa do presente trabalho conclui-se que:

- O glicerol bruto proveniente da produção de biodiesel pode ser degradado eficientemente através de digestão anaeróbia, alcançando altos rendimentos de metano.
- É importante que a carga orgânica do reator seja cuidadosamente regulada de forma a evitar a sobrecarga do sistema e perda de eficiência.
- As comunidades microbianas de bactérias e arqueias de um reator operado em condições metanogênicas alimentado com glicerol bruto se mantem estáveis.

Dos resultados obtidos na segunda etapa do presente trabalho, pode-se concluir que:

- A produção contínua de 1,3-PDO a partir de glicerol em reatores UASB com lodo granular é viável.
- O meio mineral 2 com adição de bicarbonato de sódio favoreceu a produção de 1,3-PDO como principal subproduto da fermentação do glicerol, sendo detectadas ainda pequenas quantidades de etanol.
- Durante a fermentação do glicerol em reatores operando em condições não metanogênicas (pH baixo), a produção de hidrogênio e metano é muito baixa.
- As condições restritivas impostas durante a operação dos reatores levou à morte das arqueias metanogênicas presentes no inóculo.

Por fim, para elucidar as comunidades microbianas envolvidas no tratamento anaeróbio de glicerol utilizando culturas mistas, é sugerida a utilização de métodos de sequenciamento massivo em estudos futuros.

Resumen extenso en castellano

1. Introducción

El glicerol, glicerina o 1,2,3-propanotriol, es un líquido viscoso incoloro, inodoro, de sabor dulce, derivado de materias primas naturales o petroquímicas. Se genera en grandes cantidades, a partir de proceso de trans-esterificación de grasas animales o aceites vegetales, como subproducto de la producción de biodiesel, siendo llamado glicerol crudo. En 2014, la capacidad estimada de producción europea fue de 23 millones de toneladas de biodiesel (EBB, 2015). En Brasil, uno de los mayores productores y consumidores de biodiesel en el mundo, la producción anual en 2013 fue de 2,9 billones de litros, si bien el país tiene una capacidad instalada para producir aproximadamente 7,9 billones de litros (BRASIL, 2015).

Puesto que el glicerol crudo se genera de forma continua por la industria del biodiesel (10% p/p), existe la necesidad urgente de nuevas tecnologías comerciales para absorber el volumen excesivo, ya que la purificación para su uso por las industrias - farmacéutica, cosmética, alimentos, etc. - es un proceso costoso. Se han investigado diferentes métodos de eliminación y uso de glicerol crudo, como son combustión, compostaje, nutrición animal o conversiones termoquímica y biológica. En este último caso, el glicerol crudo es utilizado como un sustrato para la producción de energía (biogás) mediante digestión anaerobia, o para la producción de productos con valor económico añadido a través del proceso de fermentación anaerobia.

Las investigaciones más recientes relativas a la producción de metano (biogás) a partir de glicerol crudo implican la co-digestión del glicerol con otros residuos: lodos de depuradora (NGHIEM *et al.*, 2014; ATHANASOULIA *et al.*, 2014); residuos sólidos urbanos y subproductos agroindustriales (FOUNTOULAKIS; MANIOS, 2009); o con biomasa de microalgas (SANTOS-BALLARDO *et al.*, 2015). Cuando el glicerol crudo es la única fuente de carbono, la aplicación de la carga orgánica en general está limitada por las sales acumuladas en los sistemas anaerobios. Metanol y sales de calcio, magnesio y fósforo son los principales compuestos inhibidores que se encuentran en el glicerol crudo (CASTRILLÓN *et al.*, 2011; JENSEN *et al.*, 2014).

Hay varios productos que se pueden obtener a partir del glicerol en los procesos de fermentación, tales como ácidos succínico, láctico o propiónico, etanol, 1,3-propanodiol (1,3-PDO) e hidrógeno (H₂) (CARVALHO *et al.*, 2014; MURAKAMI *et al.*, 2015; DISHISHA *et al.*, 2015; SUZUKI *et al.*, 2014; DURGAPAL *et al.*, 2014; CHOOKAEW *et al.*, 2015). Entre los productos mencionados, la producción microbiana de 1,3-PDO ha

recibido mucha atención debido a que es un proceso más simple, sin productos intermedios tóxicos y con bajo contenido en impurezas en comparación con 1,3-PDO sintetizado químicamente (da SILVA *et al.*, 2014b), además de ser altamente específica para la fermentación de glicerol (DECKWER, 1995). La producción biológica de H₂ a partir de glicerol ha sido propuesta como la solución más sostenible y aceptable desde el punto de vista económico y ambiental (BALAT; KIRTAY, 2010). Sin embargo, en la mayoría de los estudios recientes relativos a la producción de 1,3-PDO y H₂ a partir de glicerol se utilizan cultivos puros. Rossi *et al.* (2013) investigaran la bioconversión de glicerol crudo en 1,3-PDO usando *Klebsiella pneumoniae*, alcanzando un rendimiento máximo de 0,46 mol 1,3-PDO/mol glicerol en condiciones controladas de pH (pH 7,0). En el estudio de Jolly *et al.* (2014), los rendimientos de 1,3-PDO obtenidos se acercaron al valor teórico (1 mol/mol glicerol consumido) utilizando *Lactobacillus reuteri*. En la producción de H₂, Lo *et al.* (2013) lograron 0,77 mol H₂/mol glicerol tras operar un reactor CSTR usando *Clostridium pasteurianum* y glicerol crudo como sustrato.

Hay pocos trabajos publicados en los que se haya estudiado la conversión de glicerol a 1,3-PDO o H₂ utilizando cultivos mixtos (SEIFERT *et al.*, 2009; SELEMBO *et al.*, 2009; SITTIJUNDA; REUNGSANG, 2012; KIVISTÖ *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2013). El uso de cultivos mixtos puede representar un ahorro debido a la posibilidad de utilizar medios minerales de menor complejidad y por el hecho de trabajar en condiciones no estériles (GALLARDO *et al.*, 2014; de SOUZA *et al.*, 2014; SHARMA *et al.*, 2011).

Teniendo en cuenta lo anterior, el presente estudio tuvo como objetivo evaluar el uso de glicerol mediante procesos anaeróbios para generar subproductos con valor agregado, utilizando como inóculo cultivos mixtos complejos procedentes de depuradoras. El estudio se dividió en dos etapas. La primera etapa del trabajo fue evaluar la aplicación de glicerol crudo generado en la producción de biodiesel a partir de aceite de semilla de algodón como sustrato directo en un reactor UASB para la producción de biogás. Eso es porque el aceite de algodón es la tercera materia prima más importante y más barata para la producción de biodiesel en Brasil (de SOUZA; SILVEIRA, 2011) y representa una oportunidad de negocio (ingreso de los pequeños productores en el mercado de la energía renovable) y de inclusión social de los pequeños productores de algodón de la región Nordeste del país (FERREIRA, 2011).

En la segunda etapa del trabajo fueron evaluadas 13 variables, utilizando el diseño multifactorial de Plackett-Burman, para definir la composición adecuada del medio de cultivo para la producción de 1,3-PDO y/o H₂. Esta metodología se usa cuando se desea

evaluar un gran número de factores con un número mínimo de pruebas e identificar qué factores son los más importantes para el proceso (MASON *et al.*, 2003). Posteriormente, un análisis de la varianza (ANOVA) y un análisis de significación de Fisher (F) determinan si el modelo es estadísticamente significativo (ERIKSSON *et al.*, 2008). Posteriormente, se operaron dos reactores UASB utilizando glicerol analítico como sustrato con el fin de adaptar la biomasa (lodo granular) a la fermentación anaerobia de glicerol y obtener las condiciones de funcionamiento ideales para alcanzar rendimientos máximos de los productos deseados. En ambas etapas se utilizaron técnicas de biología molecular para evaluar la diversidad microbiana durante las fases operacionales de los biorreactores operados.

2. Materiales e métodos

2.1 Etapa 1

2.1.1 Caracterización del glicerol crudo

El glicerol crudo utilizado en la primera etapa del estudio se obtuvo de una planta (escala piloto) que produce biodiesel mediante el proceso de trans-esterificación de aceite de semilla de algodón con hidróxido de sodio como catalizador. Los valores medios de caracterización del glicerol crudo fueron: 1636 g/L de DQO, 448,3 mg/L de carbono orgánico total, pH 9,7, densidad de 1050 kg/m³, 31,6 g/L de sodio, 2,0 g/L de potasio, 2,9 g/L de magnesio y 6,5 g/L de calcio.

2.1.2 Operación del reactor UASB

Un reactor UASB (escala de laboratorio) fue operado en temperatura ambiente (26,5±1,5 °C) medida en el efluente del reactor durante el período experimental (280 días). El reactor estaba hecho de acrílico (diámetro 95 mm y altura 1,0 m) y tenía un volumen de trabajo total de 7,0 L. El reactor UASB se llenó con aproximadamente 2,5 L de inóculo (lodo floculento tratando aguas residuales domésticas), correspondiente a 33,7 g SSV/L. La actividad metanogénica específica máxima fue de 0,18 g DQO-CH₄/SSV·d. El glicerol bruto se diluyó en una solución influente para proporcionar concentraciones de DQO de 0,5 a 8,0 g/L (que corresponde cargas orgánicas volumétricas aplicadas (COV) de 0,50 a 8,06 kg DQO/m³·d, respectivamente). Esta solución contenía los siguientes macronutrientes (en g/L): 0,28 NH₄Cl, 0,252 K₂HPO₄, 0,1 MgSO₄·7H₂O, 0,007 CaCl₂, extracto de levadura 0,1 y 1 ml/L de solución de micronutrientes. Esta solución de micronutrientes contenía los siguientes compuestos (en mg/L): 2,0 FeCl₂·4H₂O, 0,05

ZnCl₂, 0,5 MnCl₂·4H₂O, 0,142 NiCl₂·6H₂O, 0,05 H₃BO₃, 0,038 CuCl₂·2H₂O, 2,0 CoCl₂·6H₂O, 0,09 AlCl₃·6H₂O, 0,05 (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O, 1,0 EDTA y 0,2 resazurina (FLORENCIO, 1994).

2.1.3 Análisis

Las determinaciones analíticas se realizaron de acuerdo con *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2012). La eficiencia de eliminación de la DQO se basó en la DQO afluyente bruta y la DQO efluente soluble (en filtro de 1,2 µm de fibra de vidrio). Los ácidos grasos volátiles (AGV) se cuantificaron utilizando un cromatógrafo de gases Agilent 7890A con una columna *Thermo Scientific*TM TRACETM TR-WAX (30m x 0,25 mm x 0,25 mm) con un detector de ionización de llama (FID). Las concentraciones de cloruro y de cationes (sodio, potasio, magnesio, calcio y amonio) se determinaron utilizando la cromatografía de iones *Thermo Scientific*TM DionexTM (modelos ICS-2100 y ICS 1100, respectivamente). La detección se realizó mediante la supresión del detector de conductividad. Mediciones de biogás se realizaron con *Ritter Miligasmeters*, modelo MGC-1 V3.1 PMMA (Alemania). Para controlar la presión del gas en el espacio superior del reactor y para eliminar el CO₂ a partir del biogás, un sello de agua con 10% (p/p) de hidróxido sódico fue instalado antes del medidor de gas.

2.1.4 Análisis de biología molecular

Las muestras para análisis de ADNr 16S se tomaron del inóculo y de muestras de los días 106, 138, 155, 211 y 240 de experimento. Para el análisis del ADN genómico total de las muestras se tomaron 0,5 g de lodo centrifugados previamente usando el kit comercial *PowerSoil*TM DNA Isolation (*Mobio Laboratories*, California, USA). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó tras desnaturalización del ADN a 94 °C por 4 min, seguidos por 34 ciclos de 94 °C por 30 s, 48 °C por 30 s (*Bacteria*) o 55 °C (*Archaea*), 68 °C por 1 min, y una extensión final a 68 °C por 5 min. Los cebadores universales para el dominio *Bacteria* fueron 968F-GC y 1392R (NIELSEN *et al.*, 1999). Los cebadores universales para el dominio *Archaea* fueron 1100F-GC y 1400R (KUDO *et al.*, 1997). Los productos de PCR se separaron por electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE) de acuerdo con Muyzer *et al.* (1993) utilizando gradientes desnaturalizantes de formamida-urea que van desde 45% a 65%. La electroforesis se realizó a 220 V durante 4,5 h en equipo D-Code (*Bio-Rad Laboratories*, California, USA). Los geles se tiñeron con bromuro de etidio y visualizados en un transiluminador UV.

2.2 Etapa 2

2.2.1 Inóculo y optimización del medio de cultivo

Para la segunda etapa del estudio, se obtuvieron muestras de lodo granular (59 g SSV/L) de un reactor UASB de cervecera (Mahou-San Miguel SA, España). La composición del medio para la degradación de glicerol y la producción de 1,3-PDO y H₂ fue investigada por un diseño de Plackett-Burman. 13 factores fueron considerados en dos niveles (-1 para bajo y +1 para alto): glicerol, pH, extracto de levadura, triptona, peptona, K₂HPO₄, KH₂PO₄, (NH₄)₂SO₄, NH₄Cl, MgSO₄, FeSO₄, CaCl₂ y pre-tratamiento térmico del lodo. Glicerol 85% (Merck, Alemania) fue utilizado como sustrato. El tratamiento térmico se hizo calentando el lodo en baño de agua hirviendo durante 15 min, y después se enfrió antes de la inoculación.

2.2.2. Reactores UASB

Dos reactores UASB (R1 y R2) a escala de laboratorio fueron operados en condiciones mesófilas ($\cong 30$ °C). Los reactores eran de acrílico y tenían un volumen total de 5,4 L. El flujo de entrada se controló mediante una bomba peristáltica y el tiempo medio de retención hidráulica era 20 h. La carga de glicerol fue aumentada gradualmente (desde 5 hasta 15 g glicerol/L·d) hasta alcanzar la carga orgánica de glicerol (CO-G) máxima admisible. La solución afluyente consistió en una solución diluida de glicerol con macro y micronutrientes. Para reducir los costos de operación es conveniente no agregar suplementos. Por lo tanto, el funcionamiento del reactor se llevó a cabo primero utilizando un medio mineral simple basado en Varrone *et al.* (2013), modificado (0,1 g/L extracto de levadura) (Medio 1). El pH del afluyente fue inicialmente de 6,8 (R1) y 5,5 (R2). Después de 83 días de operación de los reactores, el medio mineral fue sustituido por el medio siguiente (g/l): 0,28 NH₄Cl, 0,25 K₂HPO₄·3H₂O, 0,328 KH₂PO₄, 0,1 MgSO₄·7H₂O, 0,01 CaCl₂·H₂O, 0,1 extracto de levadura y 1 ml/L de solución de micronutrientes (Medio 2). A partir del día 103, 0,3 g NaHCO₃/g DQO fueran añadidos en los reactores.

2.2.3 Análisis

La producción de gases se midió mediante gasómetros Schlumberger y Ritter. Las concentraciones de CO₂ y H₂ se determinaron por cromatografía de gases (Bruker 450-GC) con un detector de conductividad térmica, y la concentración de CH₄ se determinó con un detector FID. Las concentraciones de glicerol y sus subproductos se midieron utilizando un

sistema de HPLC (*Agilent 1260 Infinity Technologies*) con un detector de índice de refracción. Los SSV y la determinación de DQO se realizaron de acuerdo con *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2012). El diseño Plackett-Burman y los análisis estadísticos se realizaron con el software *Design Expert®*, versión 6 (DX6).

2.2.4 Análisis de ecología de microorganismos

Se analizaron muestras de lodo granular del inóculo y de los reactores UASB en un microscopio electrónico de barrido (MEB) y mediante PCR/DGGE. Para la amplificación del fragmento ADN_r 16S y posterior análisis por DGGE, se utilizaron los conjuntos de cebadores 341F-GC y 907R (MUYZER *et al.*, 1993; CHAN *et al.*, 2001), para el dominio *Bacteria*, y 622F-GC y 1100R (CHAN *et al.*, 2001; LANE, 1991), para el dominio *Archaea*. La DGGE se realizó a un voltaje de 240 V durante 4 h a 60 °C. Las bandas de DGGE fueron extraídas, re-amplificadas por PCR, purificadas con polietilenglicol (10 g PEG6000 en 50 ml 2,5M NaCl) y se secuenció por el servicio de secuenciación del Centro de Astrobiología - INTA-CSIC (Madrid). Las secuencias se analizaron mediante la base de datos NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) y la herramienta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), disponible en la página web <<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>.

3. Resultados y discusión

3.1 Etapa 1

3.1.1 Desempeño del reactor UASB

Durante la operación del reactor UASB pueden distinguirse seis etapas en las que la COV fue gradualmente aumentada desde 0,50 kg DQO/m³·d (Etapa I) hasta 8,06 kg DQO/m³·d (Etapa VI), con una eficiencia media de remoción de DQO igual a 89%.

Durante la Etapa I, el objetivo era adaptar la biomasa al medio con glicerol crudo. En esta etapa, la eficiencia media de remoción de DQO del reactor UASB fue del 86%. En las Etapas II y III, las eficiencias de remoción de DQO alcanzaron 90% y 92%, respectivamente, cuando la COV se aumentó hasta 2,65 kg DQO/m³·d. En la Etapa IV (5,72 kg DQO/m³·d) el reactor tuvo un rendimiento inestable, posiblemente debido a una acumulación de AGV causada por baja alcalinidad (de menos de 1000 mg/L). Para evitar problemas de operación, la COV se redujo intencionalmente a 4,09 kg DQO/m³·d en la Etapa V. Además, se añadieron al reactor 4 g de NaHCO₃/L para aumentar la capacidad de

tamponamiento. Finalmente, después de 205 días de funcionamiento, la COV se aumentó a 8,06 kg DQO/m³·d (etapa VI). En este paso, el reactor alcanzó el valor máximo de COV, y una alta eficiencia de remoción de DQO (92%).

Al comparar la remoción de DQO y la COV aplicada durante el período del presente estudio con trabajos previos similares, se pueden considerar los resultados de esa investigación un éxito, sobre todo si se tiene en cuenta el uso del glicerol crudo. Vlassis *et al.* (2012) no lograron operar con una COV mayor que 0,25 kg DQO/m³·d. La COV máxima estudiada por Yang *et al.* (2008) fue de 0,70 kg DQO/m³·d. Esos autores obtuvieron eficiencia de remoción de DQO de 73,8%, con una producción máxima de metano de aproximadamente 0,26 L CH₄/g DQO. Kolesárová *et al.* (2011) relataron de flotación de lodos, la formación de espuma y concentraciones de DQO y AGV efluentes aumentadas. La COV máxima de su estudio fue igual a 2,17 kg DQO/m³·d.

3.1.2 Ecología de microorganismos

El perfil de las bandas del gel de DGGE relativas al dominio *Bacteria* sugirió pocos cambios en la comunidad bacteriana durante el funcionamiento del reactor. Aparecen muchas bandas comunes a diferentes puntos de muestreo y diferentes días de operación. Esto indica (i) una buena mezcla dentro del reactor, una vez que el patrón es muy semejante en los tres puntos de muestreo; (ii) ya a los 106 días de operación del reactor, los microorganismos se mostraron adaptados.

En cuanto a la comunidad de arqueas, parece que no hay cambio en la diversidad desde la inoculación hasta el final de la operación del reactor UASB, excepto por una nueva banda que aparece en la Etapa III y llega a la máxima intensidad en la Etapa IV. Sin embargo, cuando se recuperó el reactor, esta banda disminuye su intensidad, y puede ser relacionada con arqueas adaptadas a altas concentraciones de AGV. Un buen candidato sería *Methanosarcina* cuya constante cinética (menor afinidad por el acetato pero mayor velocidad máxima de crecimiento) hace que este microorganismo predomine sobre *Methanosaeta*, otra metanogénica acetoclástica que es dominante en el lodo granular de un reactor que funciona correctamente, es decir, donde las concentraciones de AGV si mantienen bajas (DÍAZ *et al.*, 2003; CONKLIN *et al.*, 2006; DWORKIN, 2006).

3.2 Etapa 2

3.2.1 Optimización del medio para la producción de 1,3-PDO y H₂

El análisis de varianza mostró que el modelo para la producción de 1,3-PDO fue significativo ($p = 0,0127$). El coeficiente de determinación (R^2) fue igual a 0,94. Las variables extracto de levadura, MgSO₄, y tratamiento térmico mostraron efectos positivos sobre el rendimiento de 1,3-PDO, lo que significa que la influencia de estos factores es mayor cuando están en sus niveles más altos (+1). Por otro lado, la concentración de glicerol, triptona y CaCl₂ parecen tener efectos negativos, es decir, tienen una mayor influencia en el rendimiento de 1,3-PDO cuando están en sus niveles más bajos (-1). El hecho de que la concentración de glicerol presentase un efecto adverso en el rendimiento de 1,3-PDO sugirió que el inóculo debería adaptarse al glicerol como sustrato. Y así se decidió operar dos reactores UASB (R1 y R2).

En cuanto al rendimiento de H₂, el modelo no fue significativa ($p = 0,62$).

3.2.2. Desempeño de los UASB

Para inhibir la actividad metanogénica de uno de los reactores (R2), se utilizó un pH inicial ácido (5,5), ya que los reactores del experimento de Plackett-Burman demostraron que, a pesar del tratamiento térmico del lodo, se generaba metano al cabo de 5 días.

En la Fase 1, el glicerol (gli) se incrementó de 5 a 15 g gli/L·d (CO-G), lo que llevó a una drástica caída en los rendimientos. Después de 30 días de operación (Fase 2), la CO-G se ajustó a 8 g gli/L·d, y se añadió una solución de micronutrientes al Medio 1 utilizado desde la fase anterior. Como consecuencia, aumentó la eliminación de glicerol con el tiempo en R2. Estos cambios condujeran a un incremento en el rendimiento de propionato y una disminución del de 1,3-PDO (en media, 0,3 mol 1,3PDO/mol gli en ambos reactores).

En el día 83, el medio utilizado fue sustituido por el Medio 2 (Fase 3). Estos cambios condujeron a una disminución en el rendimiento de propionato ($< 0,15$ mol propionato/mol gli) y a un aumento en el rendimiento de 1,3-PDO (0,51 y 0,44 mol 1,3-PDO/mol gli para R1 y R2, respectivamente).

El pH medio efluente entre las fases 1 y 3 fue de 3,9 (R1) y 3,6 (R2), mientras que el pH ideal para los microorganismos productores de 1,3-PDO está entre 5,5 y 7,0 (SAXENA *et al.*, 2009). Así, en la Fase 4, se añadió NaHCO₃ al medio mineral con el fin de aumentar la alcalinidad en los reactores. Eso resultó en eficiencias de remoción de glicerol superiores al 90% en ambos reactores, siendo el 1,3-PDO el producto mayoritario. En ambos

reactores se alcanzó un rendimiento máximo de 1,3-PDO de 0,8 mol 1,3-PDO/mol gli. Por otro lado, la producción de H₂ disminuyó, en comparación con las etapas previas de operación. Además, pequeñas cantidades de etanol (0,01-0,07 para R1 y 0,01-0,05 mol/mol gli para R2) fueron detectadas.

En este estudio, el rendimiento medio de 1,3-PDO fue de 0,35 mol/mol glicerol. Estudios previos utilizando cultivos puros en ensayos discontinuos (*batch*) lograron resultados similares. Durgapal *et al.* (2014) obtuvieron un rendimiento de 0,42 mol 1,3-PDO/mol gli utilizando *K. pneumoniae*. Metsoviti *et al.* (2013) obtuvieron rendimientos de aproximadamente 0,48 mol 1,3-PDO/mol gli usando *Citrobacter freundii*. Przysłałowska *et al.* (2015) evaluarán el uso de *E. coli* recombinante, llegando a 0,4 mol 1,3-PDO/mol gli. En este caso, el factor limitante es la eliminación del medio de crecimiento, evitando así la acumulación de metabolitos (acetato, y otros) que pueden inhibir el crecimiento de *E. coli*.

Pocos estudios han sido realizados empleando cultivos mixtos o condiciones de no esterilidad. Selembo *et al.* (2009) llegaron a 0,69 mol 1,3-PDO/mol gli y 0,28 mol H₂/mol gli utilizando cultivos mixtos (de suelo, de fertilizante y de lodo anaerobio). Gallardo *et al.* (2014) obtuvieron rendimiento máximo de 0,52 mol 1,3-PDO/mol gli cuando con un reactor EGSB inoculado con lodo granular obtenido de un reactor UASB utilizado para el tratamiento de aguas residuales de cervecera.

3.2.3 Ecología de microorganismos

El análisis de MEB demostró la presencia de microorganismos filamentosos similares a *Methanosaeta*, muy abundantes en el lodo granular metanogénico (DÍAZ *et al.*, 2006), pero que al estar sometidos a condiciones no metanogénicas acaban por morir (se observan las cubiertas celulares rotas). Las demás células presentes tenían forma de cocos, cocobacilos y bacilos que son, hipotéticamente, las adaptadas a las condiciones operacionales impuestas. Los análisis de DGGE sugieren una baja diversidad bacteriana en el inóculo, con bandas relacionadas a *Syntrophobacter* (organismo oxidador de propionato) y una bacteria de la familia *Nitrospiraceae*. Con respecto a la comunidad de arqueas, aunque el lodo granular utilizado como inóculo presente una alta diversidad, siendo diferentes especies de *Methanobacterium* y *Methanosaeta concilli* las arqueas dominantes, como es de esperar de un lodo metanogénico, después de más de 100 días de operación en condiciones desfavorables para arqueas metanogénicas, la presencia de las mismas era prácticamente indetectable, confirmando los datos observados en la MEB.

4. Conclusiones

A partir de nuestros datos, se puede concluir que:

- El glicerol crudo generado en la producción de biodiesel puede ser degradado eficientemente mediante digestión anaerobia, alcanzándose altos rendimientos en metano.
- Es importante que la carga orgánica del reactor sea regulada cuidadosamente con el fin de proporcionar la suficiente alcalinidad para evitar la sobrecarga del sistema, la formación de espumas o la flotación de la biomasa, con la consiguiente reducción de la eficiencia de remoción de DQO.
- Las comunidades microbianas de bacterias y arqueas de un reactor operado en condiciones metanogénicas alimentado con glicerol crudo se mantienen estables.
- La producción continua de 1,3-PDO a partir de glicerol en reactores UASB con lodo granular es factible.
- El medio mineral 2 y la adición de bicarbonato de sodio favorecieron la producción de 1,3-PDO como el principal subproducto de la fermentación de glicerol. Además se detectaron pequeñas cantidades de etanol.
- La producción de hidrógeno y metano es muy baja durante la fermentación del glicerol en reactores operando en condiciones no metanogénicas (pH bajo).
- Las condiciones restrictivas impuestas durante el funcionamiento de los reactores, como la alimentación exclusiva con glicerol y el bajo pH, conducen a la muerte de las arqueas metanogénicas presentes en el inóculo.

Referências bibliográficas

- AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCMBUSTÍVEIS – ANP. **Boletim mensal do biodiesel**. Março de 2015. Disponível em <www.anp.gov.br> Acesso em: 26 Jun. 2015.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION; AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION; WATER ENVIRONMENT FEDERATION - APHA; AWWA; WEF. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 22nd ed. Washington – DC, 2012.
- ANAND, P.; SAXENA, R.K. A comparative study of solvent-assisted pretreatment of biodiesel derived crude glycerol on growth and 1,3-propanediol production from *Citrobacter freundii*. **New Biotechnology**, v. 29, p. 199-205, 2012.
- APPELS, L.; BAEYENS, J.; DEGRÈVE, J.; DEWIL, R. Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 34, p. 755-781, 2008.
- ASTALS, S.; NOLLA-ARDEVOL, V.; MATA-ALVAREZ, J. Thermophilic co-digestion of pig manure and crude glycerol: process performance and digestate stability. **Journal of Biotechnology**, v. 166, p. 97-104, 2013.
- ATHANASOULIA, E.; MELIDIS, P.; AIVASIDIS, A. Co-digestion of sewage sludge and crude glycerol from biodiesel production. **Renewable Energy**, v. 62, p. 73-78, 2014.
- AYOUB, M.; ABDULLAH, A.Z. Critical review on the current scenario and significance of crude glycerol resulting from biodiesel industry towards more sustainable renewable energy industry. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, p. 2671-2686, 2012.
- BALAT, H.; KIRTAY, E. Hydrogen from biomass – Present scenario and future prospects. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, p. 7416-7426, 2010.
- BALAT, M. Potential alternatives to edible oils for biodiesel production – A review of current work. **Energy Conversion and Management**, v. 52(2), p. 1479-1492, 2011.
- BARBIRATO, F.; CAMARASA-CLARET, C.; GRIVET, J.P.; BORIES, A. Glycerol fermentation by a new 1,3-propanediol-producing microorganism: *Enterobacter agglomerans*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 43, p. 786-793, 1995.
- BARBIRATO, F.; HIMMI, E.H.; CONTE, T.; BORIES, A. 1,3-propanediol production by fermentation: An interesting way to valorize glycerin from the ester and ethanol industries. **Industrial Crops and Products**, v. 7(2-3), p. 281-289, 1998.
- BEHR, A.; EILTING, J.; IRAWADI, K.; LESCHINSKI, J.; LINDER, F. Improved utilisation of renewable resources: New important derivatives of glycerol. **Green Chemistry**, v. 10(1), p. 13-30, 2008.
- BIEBL, H.; MENZEL, K.; ZENG, A.-P.; DECKWER, W.-D. Microbial production of 1,3-propanediol. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 52, p. 289-297, 1999.
- BIEBL, H.; ZENG, A.-P.; MENZEL, K.; DECKWER, W.-D. Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol and 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 50(1), p. 24-29, 1998.
- BOHON, M.D.; METZGER, B.A.; LINAK, W.P.; KING, C.J.; ROBERTS, W.L. Glycerol combustion and emissions. **Proceedings of the Combustion Institute**, v. 33(2), p. 2717-2724, 2011.

- BRASIL. Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis – ANP. Biodiesel. Disponível em <<http://www.anp.gov.br/?pg=46827&m=&t1=&t2=&t3=&t4=&ar=&ps=&cachebust=1319638808379>> Acesso em: 13 Ago. 2013.
- BRASIL. Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis – ANP. **Biodiesel**. Disponível em <<http://www.anp.gov.br/?pg=46827>> Acesso em: 17 Ago. 2015.
- BRASIL. Presidência da República. Casa Civil – Subchefia para Assuntos Jurídicos. Lei nº 11.097 (Lei Ordinária), de 13 de janeiro de 2005. Dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira; altera as Leis nos 9.478, de 6 de agosto de 1997, 9.847, de 26 de outubro de 1999 e 10.636, de 30 de dezembro de 2002; e dá outras providências. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, 14 jan. 2005.
- BUENO, L; TORO, CA; MARTÍN, M. Scale-up and techno-economical study for the production of polyesters from glycerol. **Computer Aided Chemical Engineering**, v. 33, p. 43-48, 2014.
- BUSWELL, A. M.; NEAVE, S. L. **Laboratory studies of sludge digestion**. Department of registration and education. State of Illinois: Bulletin n. 30, 1930.
- CARVALHO, M; MATOS, M; ROCA, C; REIS, MAM. Succinic acid production from glycerol by *Actinobacillus succinogenes* using dimethyl sulfoxide as electron acceptor. **New Biotechnology**, v. 31(1), p. 133-139, 2014.
- CASTRILLÓN, L.; FERNÁNDEZ-NAVA, Y.; ORMAECHEA, P.; MARAÑÓN, E. Optimization of biogas production from cattle manure by pre-treatment with ultrasound and co-digestion with crude glycerin. **Bioresource Technology**, v. 102(17), p. 7845-7849, 2011.
- CHAN, O.C.; LIU, W.T.; FANG, H.H.P. Study of microbial community of brewery-treating granular sludge by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rRNA gene. **Water Science and Technology**, v. 43, p. 77-82, 2001.
- CHEN, Y.; XIAO, B.; CHANG, J.; FU, Y.; LV, P.; WANG, X. Synthesis of biodiesel from waste cooking oil using immobilized lipase in fixed bed reactor. **Energy Conversion and Management**, v. 50(3), p. 668-673, 2009.
- CHENG, K.K.; ZHANG, J.A.; LIU, D.H.; SUN, Y.; LIU, H.J. YANG, M.D.; XU, J.M. Pilot-scale production of 1,3-propanediol using *Klebsiella pneumoniae*. **Process Biochemistry**, v. 42(4), p. 740-744, 2007.
- CHOOKAEW, T.; O-THONG, S.; PRASERTSAN, P. Biohydrogen production from crude glycerol by two stage of dark and photo fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 40, p. 7433-7438, 2015.
- CHOOKAEW, T.; O-THONG, S.; PRASERTSAN, P. Statistical optimization of medium components affecting simultaneous fermentative hydrogen and ethanol production from crude glycerol by thermotolerant *Klebsiella* sp. TR17. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, p. 751-760, 2014.
- CISNEROS-PÉREZ, C.; CARRILLO-REYES, J.; CELIS, L.B.; ALATRISTE-MONDRAGÓN, F.; ETCHEBEHERE, C.; RAZO-FLORES, E. Inoculum pretreatment promotes differences in hydrogen production performance in EGSB reactors. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 40(19), p. 6329-6339, 2015.
- COFRÉ, O.; RAMÍREZ, M.; GÓMEZ, J.M.; CANTERO, D. Optimization of culture media for ethanol production from glycerol by *Escherichia coli*. **Biomass & Bioenergy**, v. 37, p. 275-281, 2012.

- CONKLIN, A.; STENSEL, H.D.; FERGUSON, J. Growth kinetics and competition between *Methanosarcina* and *Methanosaeta* in mesophilic anaerobic digestion. **Water Environment Research**, v. 78(5), p. 486-496, 2006.
- COSTA, J.B.; ROSSI, D.M.; DE SOUZA, E.A.; SAMIOS, D.; BREGALDA, F.; PERALBA, M.D.R.; FLORES, S.H.; AYUB, M.A.Z. The optimization of biohydrogen production by bacteria using residual glycerol from biodiesel synthesis. **Journal of Environmental Science and Health. Part A, Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering**, v. 46(13), p. 1461-1468, 2011.
- da SILVA, G.P.; CONTIERO, J.; ÁVILA NETO, P.M.; LIMA, C.J.B. 1,3-propanediol: produção, aplicações e potencial biotecnológico. **Química Nova**, v. 37(3), p. 527-534, 2014b.
- da SILVA, G.P.; LIMA, C.J.B.; CONTIERO, J. Production and productivity of 1,3-propanediol from glycerol by *Klebsiella pneumoniae* GLC29. **Catalysis Today**, 2014a. (*in press*) Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cattod.2014.05.016>>
- da SILVA, G.P.; MACK, M.; CONTIERO, J. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 30-39, 2009.
- DAR, S.A.; YAO, L.; van DONGEN, U.; KUENEN, J.G.; MUYZER, G. Analysis of diversity and activity of sulfate-reducing bacterial communities in sulfidogenic bioreactors using 16S rRNA and *dsrB* genes as molecular markers. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73(2), p. 594-604, 2007.
- de SOUZA, A.C.C.; SILVEIRA, J.L. Hydrogen production utilizing glycerol from renewable feedstocks - The case of Brazil. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, p. 1835-1850, 2011.
- de SOUZA, E.A.; ROSSI, D.M.; AYUB, M.A.Z. Bioconversion of residual glycerol from biodiesel synthesis into 1,3-propanediol using immobilized cells of *Klebsiella pneumoniae* BLh-1. **Renewable Energy**, v. 72, p. 253-257, 2014.
- DECKWER, W.D. Microbial conversion of glycerol to 1,3-propanediol. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 16, p. 143-149, 1995.
- DEMIRBAS, A. Biofuels sources, biofuel policy, biofuel economy and global biofuel projections. **Energy Conversion and Management**, v. 49, p. 2106-2116, 2008.
- DÍAZ, E.; AMILS, R.; SANZ, J.L. Molecular ecology of anaerobic granular sludge grown at different conditions. **Water Science and Technology**, v. 48(6), p. 57-64, 2003.
- DÍAZ, E.E.; STAMS, R.; AMILS, R.; SANZ, J.L. Phenotypic properties and microbial diversity of methanogenic granules from a full-scale UASB reactor treating brewery wastewater. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72(7), p. 4942-4949, 2006.
- DINH, N.T.; HATTA, K.; KWON, S.H.; ROLLON, A.P.; NAKASAKI, K. Changes in the microbial community during the acclimation stages of the methane fermentation for the treatment of glycerol. **Biomass and Bioenergy**, v. 68, p. 240-249, 2014.
- DISHISHA, T.; IBRAHIM, M.H.A.; CAVERO, V. H.; ALVAREZ, M.T.; HATTI-KAUL, R. Improved propionic acid production from glycerol: Combining cyclic batch- and sequential batch fermentations with optimal nutrient composition. **Bioresource Technology**, v. 176, p. 80-87, 2015.
- DROZDYNSKA, A.; LEJA, K.; CZACZYK, K. Biotechnological production of 1,3-propanediol from crude glycerol. **Journal of Biotechnology, Computational Biology and Bionanotechnology**, v. 92(1), p. 92-100, 2011.

- DURGAPAL, M.; KUMAR, V.; YANG, T.H.; LEE, H.J.; SEUNG, D.; PARK, S. Production of 1,3-propanediol from glycerol using the newly isolated *Klebsiella pneumoniae* J2B. **Bioresource Technology**, v. 159, p. 223-231, 2014.
- DWORKIN, M. (Editor-in-Chief). FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K.H.; STACKEBRANDT, E. (Editors) **The Prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria**. 3rd ed. Volume 3: Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes. Springer, New York. 2006.
- EIRAS, C.E.; BARBOSA, L.P.; MARQUES, J.A.; ARAÚJO, F.L.; LIMA, B.S.; ZAWADZKI, F.; PEROTTO, D.; PRADO, I.N. Glycerine levels in the diets of crossbred bulls finished in feedlot: Apparent digestibility, feed intake and animal performance. **Animal Feed Science and Technology**, v. 197, p. 222-226, 2014.
- ERIKSSON, L.; JOHANSSON, E.; KETTANEH-WOLD, N.; WIKSTRÖM, C.; WOLD, S. **Design of experiments: principles and applications**. 3rd ed. Umetrics Academy, Sweden, 2008.
- EUROPEAN BIODIESEL BOARD – EBB. **Statistics**. The EU Biodiesel Industry. Disponível em <www.ebb-eu.org/stats.php> Acesso em: 09 Jun. 2015.
- EUROPEAN PARLIAMENT. **Directive 2009/28/EC** of the European Parliament and of the Council of 23 April 2009 on the promotion of the use of energy from renewable sources and amending and subsequently repealing Directives 2001/77/EC and 2003/30/EC (Text with EEA relevance), 2009.
- FERNÁNDEZ, N.; DÍAZ, E.E.; AMILS, R.; SANZ, J.L. Analysis of microbial community during biofilm development in an anaerobic wastewater reactor. **Microbial Ecology**, v. 56, p. 121-132, 2008.
- FERREIRA, M. **Algodão: alternativa para biodiesel**. UFPE na mídia. Disponível em <https://www.ufpe.br/agencia/index.php?option=com_content&view=article&id=40592:algodao--alternativa-para-biodiesel&catid=9&Itemid=73> Acesso em 03 Set. 2015
- FERREIRA, T.F.; RIBEIRO, R.R.; RIBEIRO, C.M.S.; FREIRE, D.M.G.; COELHO, M.A.Z. Evaluation of 1,3-propanediol production from crude glycerol by *Citrobacter freundii* ATCC 8090. **Chemical Engineering Transactions**, v. 27, p. 157-162, 2012.
- FLORENCIO, L.; KATO, M.T.; de MORAIS, J.C. Domestic sewage treatment in full-scale UASBB plant at Mangueira, Recife, Pernambuco. **Water Science and Technology**, v. 44(4), p. 71-77, 2001.
- FLORENCIO, L. **The fate of methanol in anaerobic bioreactors**. Ph.D Thesis. Wageningen Agricultural University. Wageningen, The Netherlands, 137p. 1994. Disponível em <<http://library.wur.nl/WebQuery/wurpubs/26386>> Acesso em 18 Jul. 2012
- FOUNTOULAKIS, M.S.; PETOUSI, I.; MANIOS, T. Co-digestion of sewage sludge with glycerol to boost biogas production. **Waste Management**, v. 30(10), p.1849-53, 2010.
- FOUNTOULAKIS, M. S.; MANIOS, T. Enhanced methane and hydrogen production from municipal solid waste and agro-industrial by-products co-digested with crude glycerol. **Bioresource Technology**, n.100, p. 3043-3047, 2009.
- GALLARDO, R.; FARIA, C.; RODRIGUES, L.R.; PEREIRA, M.A.; ALVES, M.M. Anaerobic granular sludge as a biocatalyst for 1,3-propanediol production from glycerol in continuous bioreactors. **Bioresource Technology**, v. 155, p. 28-33, 2014.

- GANESH, I.; RAVIKUMAR, S.; HONG, S.H. Metabolically engineered *Escherichia coli* as a tool for the production of bioenergy and biochemicals from glycerol. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 17(4), p. 671-678, 2012.
- GARRITY, G.M. (Editor-in-chief) BRENNER, D.J.; KRIEG, N.R.; STALEY, G.M. (Editors) **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2nd ed. Volume two, part C. Springer, New York. 2005.
- GERARDI, M.H. **The microbiology of anaerobic digesters**. John Wiley & Sons Inc., New Jersey. 2003.
- GUO, W.-Q.; REN, N.-Q.; WANG, X.-J.; XIANG, W.-S.; DING, J.; YOU, Y.; LIU, B.-F. Optimization of culture conditions for hydrogen production by *Ethanoligenens harbinense* B49 using response surface methodology. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 1192-1196, 2009.
- GUNSTONE, F.D.; HARWOOD, J.L.; DIJKSTRA, A.J. **The lipid handbook**. 3rd ed. CRC Press, Florida. 2007.
- HIMMI, E.H.; BORIES, A.; BARBIRATO, F. Nutrient requirements for glycerol conversion to 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum*. **Bioresource Technology**, v. 67, p. 123-128, 1999.
- HURTADO, F.J.; KAISER, A.S.; ZAMORA, B. Fluid dynamic analysis of a continuous stirred tank reactor for technical optimization of wastewater digestion, **Water Research**, v. 71, p. 282-293, 2015.
- HUTŇAN, M.; KOLESÁROVÁ, N.; BODÍK, I.; CZOLDEROVA, M. Long-term monodigestion of crude glycerol in a UASB reactor. **Bioresource Technology**, v. 130, p. 88-96, 2013.
- HUTŇAN, M.; KOLESÁROVÁ, N.; BODÍK, I.; ŠPALKOVÁ, V.; LAZOR, M. **Possibilities of anaerobic treatment of crude glycerol from biodiesel production**. In: 36th International Conference of SSCHE. May 25-29. Tatranské Matliare, Slovakia, 2009.
- ITO, T.; NAKASHIMA, Y.; SENBA, K.; MATSUI, T.; NISHIO, N. Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharges after biodiesel manufacturing process. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 100(3), p. 260-265, 2005.
- JENSEN, P.D.; ASTALS, S.; LU, Y.; DEVADAS, M.; BATSTONE, D.J. Anaerobic codigestion of sewage sludge and glycerol, focusing on process kinetics, microbial dynamics and sludge dewaterability. **Water Research**, v. 67, p. 355-366, 2014.
- JOLLY, J.; HITZMANN, B.; RAMALINGAM, S.; RAMACHANDRAN, K.B. Biosynthesis of 1,3-propanediol from glycerol with *Lactobacillus reuteri*: Effect of operating variables. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 118(2), p. 188-194, 2014.
- JOHNSON, D.T.; TACONI, K.A. The glycerin glut: Options for the value-added conversion of crude glycerol resulting from biodiesel production. **Environmental Progress**, v. 26(4), p. 338-348, 2007.
- KACPRZAK, A.; KRZYSZEK, L.; LEDAKOWICZ, S. Co-digestion of agricultural and industrial wastes. **Chemical Papers**, v. 64(2), p. 127-131, 2010.
- KHANAL, S.K.; CHEN, W.-H.; LI, L.; SUNG, S. Biological hydrogen production: effects of pH and intermediate products. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 29, p. 1123-1131, 2004.

- KIM, J.; LEE, S.; LEE, C. Comparative study of changes in reaction profile and microbial community structure in two anaerobic repeated-batch reactors started up with different seed sludges. **Bioresource Technology**, v. 129, p. 495-505, 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, p. 11749-11755, 2013.
- KOLESÁROVÁ, N.; HUTŇAN, M.; ŠPALKOVÁ, V.; KUFFA, R.; BODÍK, I. Anaerobic treatment of biodiesel by-products in a pilot scale reactor. **Chemical Papers**, v. 65(4), p. 447-453, 2011.
- KUDO, Y.; NAKAJIMA, T.; MIYAKI, T.; OYAIZU, H. Methanogen flora of paddy soils in Japan. **FEMS Microbiololy Ecology**, v. 22, p. 39-48, 1997.
- LANE, D.J. 16S/23S rRNA sequencing. STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. (Editors) **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**, John Wiley & Sons, p. 115-175, 1991.
- LEE, P.C.; LEE, W.G.; LEE, S.Y.; CHANG, H.N. Succinic acid production with reduced by-product formation in the fermentation of *Anaerobiospirillum succiniciproducens* using glycerol as a carbon. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 72, p. 41-48, 2001.
- LEONETI, A.B.; ARAGÃO-LEONETI, V.; OLIVEIRA, S.V.W.B. Glycerol as a by-product of biodiesel production in Brazil: Alternatives for the use of unrefined glycerol. **Renewable Energy**, v. 45, p. 138-145, 2012.
- LETTINGA, G. Anaerobic digestion and wastewater treatment systems. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 67, p. 3-28, 1995.
- LETTINGA, G.; van VELSEN, A.F.M.; HOBMA, S.W.; de ZEEUW, W.; KLAPWIJK, A. Use of the upflow sludge blanket (USB) reactor concept for biological wastewater treatment, especially for anaerobic treatment. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 22(4), p. 699-734, 1980.
- LIU, B.; CHRISTIANSEN, C.; PARNAS, R.; XU, Z.; LI, B. Optimizing the production of hydrogen and 1,3-propanediol in anaerobic fermentation of biodiesel glycerol. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, p. 3196-3205, 2013.
- LO, Y-C; CHEN, X-J; HUANG, C-Y; YUAN, Y-J; CHANG, J-S. Dark fermentative hydrogen production with crude glycerol from biodiesel industry using indigenous hydrogen-producing bacteria. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38(35), p. 15815-15822, 2013.
- LOPES, D.C.; STEIDLE NETO, A.J. Potential crops for biodiesel production in Brazil: a review. **World Journal of Agricultural Sciences**, v. 7(2), p. 206-217, 2011.
- LÓPEZ, J. A. S.; SANTOS, M. L. Á. M.; PÉREZ, A. F. C., MARTÍN, A. M. Anaerobic digestion of glycerol derived from biodiesel manufacturing. **Bioresource Technology**, n. 100, p. 5609-5615, 2009.
- LUO, X.; HU, S.; ZHANG, X.; LI, Y. Thermochemical conversion of crude glycerol to biopolyols for the production of polyurethane foams. **Bioresource Technology**, v. 139, p. 323-329, 2013.
- MA F.; HANNA, M. A. Biodiesel production: a review. **Bioresource Technololy**, n.70, p.1-15, 1999.

- MA, F.; CLEMENTS, D.; HANNA, M.A. Biodiesel fuel from animal fat. ancillary studies on transesterification of beef tallow. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 37(9), p. 3768-3771, 1998.
- MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; DUNLAP, P.V.; CLARK, D.P. **Microbiologia de Brock**. 12 ed. Artmed, Porto Alegre. 2010.
- MADSEN, M.; HOLM-NIELSEN, J.B.; ESBENSEN, K.H. Monitoring of anaerobic digestion processes: A review perspective. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, p. 3141-3155, 2011.
- MANGAYIL, R.; AHO, T.; KARP, M.; SANTALA, V. Improved bioconversion of crude glycerol to hydrogen by statistical optimization of media components. **Renewable Energy**, v. 75, p. 583-589, 2015.
- MANGAYIL, R.; KARP, M.; SANTALA, V. Bioconversion of crude glycerol from biodiesel production to hydrogen. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37(17), p. 12198-12204, 2012.
- MASON, R.L.; GUNST, R.F.; HESS, J.L. **Statistical Design and Analysis of Experiments**: With Applications to Engineering and Science. 2nd ed. John Wiley & Sons, Inc. 2003.
- McCARTY, P.L. One hundred years of anaerobic treatment. *In: Anaerobic Digestion*. HUGHES, D.E.; STAFFORD, D.A.; WHEATLEY, B.I.; BAADER, W.; LETTINGA, G.; NYNS, E.J.; VERSTRAETE, W.; WENTWORTH, R.L. (Eds.) Elsevier Biomedical Press Inc., Amsterdam, p. 3-22, 1981.
- MEHER, L.C.; VIDYA SAGAR, D.; NAIK, S.N. Technical aspects of biodiesel production by transesterification - a review. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v. 10(3), p. 248-268, 2006.
- MEHROTRA, R.S. **Principles of Microbiology**. Tata McGraw-Hill Education, 2009.
- METSOVITI, M.; ZENG, A.-P.; KOUTINAS, A.A.; PAPANIKOLAOU, S. Enhanced 1,3-propanediol production by a newly isolated *Citrobacter freundii* strain cultivated on biodiesel-derived waste glycerol through sterile and non-sterile bioprocesses. **Journal of Biotechnology**, v. 163, p. 408-418, 2013.
- MONTGOMERY, D.C. **Design and Analysis of Experiments**. John Wiley & Sons, 7th ed. 2008.
- MORAES, E.M.; ADORNO, M.A.T.; ZAIAT, M.; FORESTI, E. **Determinação de ácidos voláteis por cromatografia gasosa em efluentes de reatores anaeróbios tratando resíduos líquidos e sólidos**. *In: VI Oficina e Seminário Latino-Americano de Digestão Anaeróbia*, Recife-PE, Ed. Universitária - UFPE, v. 2, p. 235-238, 2000.
- MORAIS, J.C. de. **Avaliação da eficiência e dos problemas operacionais de uma estação de tratamento de esgotos ao longo de 13 anos de monitoramento**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2011. 111 f.
- MU, Y.; TENG, H.; ZHANG, D.J.; WANG, W.; XIU, Z.L. Microbial production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* using crude glycerol from biodiesel preparations. **Biotechnology Letters**, v. 28(21), p. 1755-1759, 2006.
- MURAKAMI, N.; OBA, M.; IWAMOTO, M.; TASHIRO, Y.; NOGUCHI, T.; BONKOHARA, K.; ABDEL-RAHMAN, M.A.; ZENDO, T.; SHIMODA, M.; SAKAI, K.; SONOMOTO, K. L-Lactic acid production from glycerol coupled with acetic acid

metabolism by *Enterococcus faecalis* without carbon loss. **Journal of Bioscience and Bioengineering** (in press) Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2015.05.009>>

MUYZER, G. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, v. 2, p. 317-322, 1999.

MUYZER, G.; de WAAL, E.C.; UITTERLINDEN, A.G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59(3), p. 695-700, 1993.

MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 73, p.127-141, 1998.

NANODROP TECHNOLOGIES. 260/280 and 260/230 Ratios NanoDrop® ND-1000 and ND-8000 8-Sample Spectrophotometers. Technical Support Bulletin T009. Wilmington, Delaware - USA, 2007.

NGHIEM, L.D.; NGUYEN, T.T.; MANASSA, P.; FITZGERALD, S.K.; DAWSON, M.; VIERBOOM, S. Co-digestion of sewage sludge and crude glycerol for on-demand biogas production. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 95, p. 160-166, 2014.

NIELSEN, T.A.; LIU, W-T.; FILIPE, C.; GRADY, L.; MOLIN, S.; STAHL, D.A. Identification of a novel group of bacteria in sludge from deteriorated biological phosphorus removal reactor. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 1251-1258, 1999.

NUCHDANG, S.; PHALAKORNKULE, C. Anaerobic digestion of glycerol and co-digestion of glycerol and pig manure. **Journal of Environmental Management**, v. 101, p.164-172, 2012.

OH, B.-R.; SEO, J.-W.; HEO, S.-Y.; HONG, W.-K.; LUO, L.H.; JOE, M.-H.; PARK, D.H.; KIM, C.H. Efficient production of ethanol from crude glycerol by a *Klebsiella pneumoniae* mutant strain. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 3918-3922, 2011.

ÖNER, C.; ALTUN, S. Biodiesel production from inedible animal tallow and an experimental investigation of its use as alternative fuel in a direct injection diesel engine. **Applied Energy**, v. 86(10), p. 2114-2120, 2009.

PACHAURI, N.; HE, B. Value-added utilization of crude glycerol from biodiesel production: a survey of current research activities. **ASABE Paper N° 066223**. St. Joseph, Mich.: ASABE, 2006.

PAGLIARO, M; ROSSI, M. **The future of glycerol**. 2nd ed. RSC Green Chemistry, Royal Society of Chemistry, London, 2010.

PAPANIKOLAOU, S.; RUIZ-SANCHEZ, P.; PARISSET, B.; BLANCHARD, F.; FICK, M. High production of 1,3-propanediol from industrial glycerol by a newly isolated *Clostridium butyricum* strain. **Journal of Biotechnology**, v. 77, p. 91-208, 2000.

PLACKETT, R.L.; BURMAN, J.P. The design of optimum multifactorial experiments. **Biometrika**, v. 33, p. 305-325, 1946.

PRZYSTAŁOWSKA, H.; ZEYLAND, J.; SZYMANOWSKA-POWAŁOWSKA, D.; SZALATA, M.; SŁOMSKI, R.; LIPIŃSKI, D. 1,3-Propanediol production by new recombinant *Escherichia coli* containing genes from pathogenic bacteria. **Microbiological Research**, v. 171, p. 1-7, 2015.

- QUISPE, C.A.G.; CORONADO, C.J.R.; CARVALHO, J.A. Glycerol: Production, consumption, prices, characterization and new trends in combustion. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 475-493, 2013
- RASHID, U.; ANWAR, F.; KNOTHE, G. Evaluation of biodiesel obtained from cottonseed oil. **Fuel Processing Technology**, v. 90, p. 1157-1163, 2009.
- RINZEMA, A.; VAN LIER, J.; LETTINGA, G. Sodium inhibition of acetoclastic methanogens in granular sludge from a UASB reactor. **Enzyme Microbial Technology**, v. 10, p. 24-32, 1988.
- ROSSI, D.M.; SOUZA, E.A.; FLÔRES, S.H.; AYUB, M.A.Z. Conversion of residual glycerol from biodiesel synthesis into 1,3-propanediol by a new strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Renewable Energy**, v. 55, p. 404-409, 2013.
- ROYO, J. **Algodão contribui para 5% do biodiesel brasileiro**. Portal Dia de Campo. 10/05/2010. Disponível em <<http://www.diadecampo.com.br/zpublisher/materias/Materia.asp?secao=Pacotes%20Tecnol%F3gicos&id=21674>> Acesso em: 24 Set. 2013.
- SADANO, Y.; TOSHIMITSU, R.; KOHDA, J.; NAKANO, Y.; YANO, T. Optimization of compost fermentation of glycerol by-product discharged from biodiesel fuel production process. **Journal of Material Cycles and Waste Management**, v. 12, p. 308-313, 2010.
- SANTEGOEDS, C.M.; FERDELMAN, T.G.; MUYZER, G.; de BEER, D. Structural and functional dynamics of sulfate-reducing populations in bacterial biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 3731-3739, 1998.
- SANTIBÁÑEZ, C.; VARNERO, M.T.; BUSTAMANTE, M. Residual glycerol from biodiesel manufacturing, waste or potential source of bioenergy: a review. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 71(3), p. 469-475, 2011.
- SANTOS-BALLARDO, D.U.; FONT-SEGURA, X.; FERRER, A.S.; BARRENA, R.; ROSSI, S.; VALDEZ-ORTIZ, A. Valorization of biodiesel production wastes: Anaerobic digestion of residual *Tetraselmis suecica* biomass and co-digestion with glycerol. **Waste Management and Research**, v. 33(3), p. 250-257, 2015.
- SANZ, J.L.; KÖCHLING, T. Molecular biology techniques used in wastewater treatment: an overview. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 119-133, 2007.
- SARMA, S.J.; BRAR, S.K.; BIHAN, Y.L.; BUELNA, G. Bio-hydrogen production by biodiesel-derived crude glycerol bioconversion: a techno-economic evaluation. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 36, p. 1-10, 2013.
- SATTAYASAMITSATHIT, S.; METHACANON, P.; PRASERTSAN, P. Enhance 1,3-propanediol production from crude glycerol in batch and fed-batch fermentation with two-phase pH-controlled strategy. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 14(6), 2011. Disponível em <<http://www.bioline.org.br/pdf?ej11064>> Acesso em: 01 Jun. 2015.
- SAXENA, R.N.; ANAND, P.; SARAN, S.; ISAR, J. Microbial production of 1,3-propanediol: Recent developments and emerging opportunities. **Biotechnology Advances**, v. 27(6), p. 895-913, 2009.
- SCHÄFER, H.; MUYZER, G. Denaturing gradient gel electrophoresis in marine microbial ecology. In: PAUL, J (Ed.). **Methods in Microbiology**, v. 30, p. 425-468, Academic Press, London, 2001.

- SCHRÖDER, A.; SÜDEKUM, K.-H. Glycerol as a by-product of biodiesel production in diets for ruminants. **The Regional Institute**: Online Publishing. Disponível em <<http://www.regional.org.au/au/gcirc/1/241.htm>> Acesso em: 08 Jul. 2015.
- SEIFERT, K.; WALIGORSKA, M.; WOJTOWSKI, M.; LANIECKI, M. Hydrogen generation from glycerol in batch fermentation process. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34(9), p. 3671-3678, 2009.
- SELEMBO, P.A.; PEREZ, J.M.; LLOYD, W.A.; LOGAN, B.E. Enhanced hydrogen and 1,3-propanediol production from glycerol by fermentation using mixed cultures. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 104(6), p. 1098-1106, 2009.
- SHARMA, Y.; PARNAS, R.; LI, B. Bioenergy production from glycerol in hydrogen producing bioreactors (HPBs) and microbial fuel cells (MFCs). **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36(6), p. 3853-3861, 2011.
- SI, B.; LI, J.; LI, B.; ZHU, Z.; SHEN, R.; ZHANG, Y.; LIU, Z. The role of hydraulic retention time on controlling methanogenesis and homoacetogenesis in biohydrogen production using upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor and packed bed reactor (PBR). **International Journal of Hydrogen Energy**, 2015. (*in press*) Disponível em <<http://dx.doi.org/10.16/j.ijhydene.2015.04.035>>
- SILES, J.A.; MARTÍN, M.A.; CHICA, A.F.; MARTÍN, A. Anaerobic co-digestion of glycerol and wastewater derived from biodiesel manufacturing. **Bioresource Technology**, v. 101(16), p. 6315-21, 2010.
- SINGH, S.P.; PRERNA, P. Review of recent advances in anaerobic packed-bed biogas reactors. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 13, p. 1569-1575, 2009.
- SITTIJUNDA, S; REUNGSANG, A. Biohydrogen production from waste glycerol and sludge by anaerobic mixed cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**, **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, p. 13789-13796, 2012.
- SOUZA, J; SOUZA, PMTG; SOUZA, PP; SANGIORGE, DL; PASA, VMD; OLIVEIRA, LCA. Production of compounds to be used as fuel additive: Glycerol conversion using Nb-doped MgAl mixed oxide. **Catalysis Today**, v. 213, p. 65-72, 2013.
- SOUZA, L.F.C. de. **Fatores interferentes na degradação anaeróbia do alquilbenzeno linear sulfonado**. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2013. 125 f.
- SRICHAROENCHAikul, V.; ATONG, D. Fuel gas generation from thermochemical conversion of crude glycerol mixed with biomass wastes. **Energy Procedia**, v. 14, p. 1286-1291, 2012.
- STEINMETZ, S.A.; HERRINGTON, J.S.; WINTERROWD, C.K.; ROBERTS, W.L.; WENDT, J.O.L.; LINAK, W.P. Crude glycerol combustion: Particulate, acrolein, and other volatile organic emissions. **Proceedings of the Combustion Institute**, v. 34(2), p. 2749-2757, 2013.
- STEVENS, J.F.; MAIER, C.S. Acrolein: Sources, metabolism, and biomolecular interactions relevant to human health and disease. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 52(1), p.7-25, 2008.
- STUCKEY, D.C. Recent developments in anaerobic membrane reactors. **Bioresource Technology**, v. 122, p. 137-148, 2012.
- SUZUKI, T.; NISHIKAWA, C.; SETA, K.; SHIGENO, T.; NAKAJIMA-KAMBE, T. Ethanol production from glycerol-containing biodiesel waste by *Klebsiella variicola* shows

- maximum productivity under alkaline conditions. **New Biotechnology**, v. 31(3), p. 246-253, 2014.
- SZYMANOWSKA-POWAŁOWSKA, D; BIAŁAS, W. Scale-up of anaerobic 1,3-propanediol production by *Clostridium butyricum* DSP1 from crude glycerol. **BMC Microbiology**, v. 14:45, <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/14/45>, 2014.
- TAN, H.W.; ABDUL AZIZ, A.R.; AROUA, M.K. Glycerol production and its applications as a raw material: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 118-127, 2013.
- TEMUDO, M.F.; POLDERMANS, R.; KLEEREBEZEM, R.; van LOOSDRECHT, M.C.M. Glycerol fermentation by (open) mixed cultures: A chemostat study. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 100(6), p. 1088-1098, 2008.
- THERMO SCIENTIFIC. **Assessment of Nucleic Acid Purity**. Technical Bulletin T042. NanoDrop Spectrophotometers, Wilmington, Delaware - USA.
- THOMPSON, J.C.; HE, B.B. Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks. **Applied Engineering in Agriculture**, v. 22(2), p. 261-265, 2006.
- UNITED NATIONS. **The state of the biofuels market: regulatory, trade and development perspectives**. United Nations Publication, 2014.
- van GERPEN, J.; KNOTHE, G. Basics of the transesterification reaction. *In*: KNOTHE, G.; VAN GERPEN, J.H.; KRAHL, J. **The Biodiesel Handbook**, AOCS Press, 2005.
- van HAANDEL, A.; KATO, M. T.; CAVALCANTI, P. F. F.; FLORENCIO, L. Anaerobic reactor design concepts for the treatment of domestic wastewater. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 5, p. 21-38, 2006.
- VARRONE, C.; GIUSSANI, B.; IZZO, G.; MASSINI, G.; MARONE, A.; SIGNORINI, A.; WANG, A. Statistical optimization of biohydrogen and ethanol production from crude glycerol by microbial mixed culture. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.37, p. 16479-16488, 2012.
- VARRONE, C.; ROSA, S.; FIOCCHETTI, F.; GIUSSANI, B.; IZZO, G.; MASSINI, G.; MARONE, A.; SIGNORINI, A.; WANG, A. Enrichment of activated sludge for enhanced hydrogen production from crude glycerol. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, p. 1319-1331, 2013.
- VIANA, M.B. **Produção de biogás a partir de glicerol oriundo de biodiesel**. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. São Carlos, 2011. 113 f.
- VIANA, M.B.; FREITAS, A.V.; LEITÃO, R.C.; PINTO, G.A.S.; SANTAELLA, S.T. Anaerobic digestion of crude glycerol: a review. **Environmental Technology Reviews**, v. 1(1), p. 81-92, 2012.
- VLASSIS, T.; ANTONOPOULOU, G.; STAMATELATOU, K.; LYBERATOS, G. Anaerobic treatment of glycerol for methane and hydrogen production. **Global NEST Journal**, v. 14(2), p. 149-156, 2012.
- VLASSIS, T.; STAMATELATOU, K.; ANTONOPOULOU, G.; LYBERATOS, G. Methane production via anaerobic digestion of glycerol: a comparison of conventional (CSTR) and high-rate (PABR) digesters. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 88, p. 2000-2006, 2013.

- WAGES Jr., J.M. Polymerase chain reaction, p. 243-250. In.: WORSFOLD, P.; TOWNSHEND, A.; POOLE, C. **Encyclopedia of Analytical Science**, 2nd ed. Elsevier - Academic Press, 2005.
- WAGNER, J.R.; MOUNT, E.M.; GILES, H.F. **Extrusion: The definitive processing guide and handbook**. 2nd ed. Elsevier Inc., 2014.
- WOŁOSIAK-HNAT, A; MILCHERT, E; LEWANDOWSKI, G. Optimization of hydrogenolysis of glycerol to 1,2-propanediol. **Organic Process Research & Development**, v. 17(4), p. 701-713, 2013.
- WONG, C.L.; HUANG, C.C.; CHEN, W.M.; CHANG, J.S. Converting crude glycerol to 1,3-propanediol using resting and immobilized *Klebsiella* sp HE-2 cells. **Biochemical Engineering Journal**, v. 58-59, p. 177-183, 2011.
- YANG, F.; HANNA, M.A.; SUN, R. Value-added uses for crude glycerol - a byproduct of biodiesel production. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5(13), 2012. Disponível em <<http://www.biotechnologyforbiofuels.com/content/5/1/13>> Acesso em: 23 Jul. 2014.
- YANG, Y.; TSUKAHARA, K.; SAWAYAMA, S. Biodegradation and methane production from glycerol-containing synthetic wastes with fixed-bed bioreactor under mesophilic and thermophilic anaerobic conditions. **Process Biochemistry**. n. 43, p. 362-367, 2008.
- YOUNG, J.C.; McCARTY, P.L. The anaerobic filter for waste treatment. **Journal (Water Pollution Control Federation)**, v. 41(5), Research Supplement to: 41, 5, Part II, p. R160-R173, 1969.
- YUAN, Z; WANG, J; WANG, L; XIE, W; CHEN, P; HOU, Z; ZHENG X. Biodiesel derived glycerol hydrogenolysis to 1,2-propanediol on Cu/MgO catalysts. **Bioresource Technology**, v. 101(18), p. 7088-7092, 2010.
- YUSUF, N.N.A.N.; KAMARUDIN, S.K.; YAAKUB, Z. Overview on the current trends in biodiesel production. **Energy Conversion and Management**, v. 52(7), p. 2741-2751, 2011.
- ZHANG, Y.; DUBÉ, M.A.; McLEAN, D.D.; KATES, M. Biodiesel production from waste cooking oil: 1. Process design and technological assessment. **Bioresource Technology**, v. 89(1), p. 1-16, 2003.
- ZHANG, Z.; XIN, L.; QI, J.; CHADDERDON, D.J.; LI, W. Supported Pt, Pd and Au nanoparticle anode catalysts for anion-exchange membrane fuel cells with glycerol and crude glycerol fuels. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 136-137, p. 29-39, 2013.

Apêndice

Figura A1 – Fluxograma das etapas experimentais voltadas para a produção de 1,3-propanodiol e hidrogênio a partir de glicerol por cultura mista anaeróbia

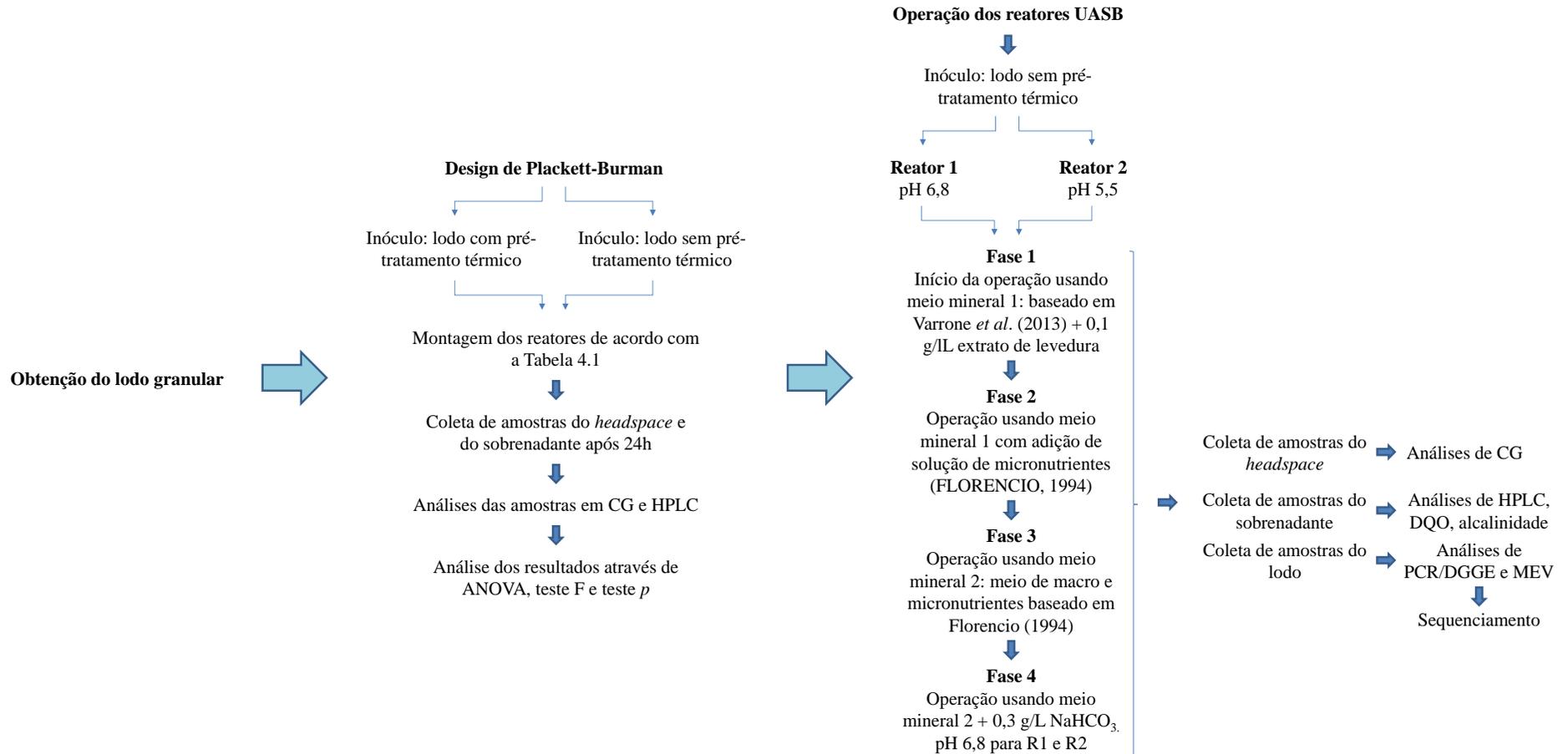


Tabela A1 – Matriz do delineamento experimental de Plackett-Burman para avaliação dos fatores significativos (X_1 a X_{13}) e valores médios das respostas obtidas (rendimentos) de 1,3-propanodiol (R_1) e hidrogênio (R_2) por cultura mista

Ensaio	X_1 Glicerol (g/L)	X_2 pH	X_3 Ext. de levedura (g/L)	X_4 Tryptona (g/L)	X_5 Peptona (g/L)	X_6 K_2HPO_4 (g/L)	X_7 KH_2PO_4 (g/L)	X_8 $(NH_4)_2SO_4$ (g/L)	X_9 NH_4Cl (g/L)	X_{10} $MgSO_4$ (g/L)	X_{11} $FeSO_4$ (mg/L)	X_{12} $CaCl_2$ (g/L)	X_{13} Tratamento térmico	R_1 Rendimento 1,3-PDO (mol/mol glicerol)	R_2 Rendimento H_2 (mol/mol glicerol)
1	40	5	5	5	0	1	1	1	5	0	5	0	com	0,000	0,030
2	40	8	0	5	5	1	1	1	0	0,4	0	5	sem	0,000	0,025
3	5	8	5	0	5	7	1	1	0	0	5	0	com	0,326	0,054
4	5	5	5	5	0	7	5	1	0	0	0	5	sem	0,000	0,392
5	40	5	0	5	5	1	5	2	0	0	0	0	com	0,059	0,015
6	40	8	0	0	5	7	1	2	5	0	0	0	sem	0,000	0,053
7	40	8	5	0	0	7	5	1	5	0,4	0	0	sem	0,068	0,293
8	40	8	5	5	0	1	5	2	0	0,4	5	0	sem	0,000	0,023
9	5	8	5	5	5	1	1	2	5	0	5	5	sem	0,000	1,087
10	40	5	5	5	5	7	1	1	5	0,4	0	5	com	0,019	0,101
11	5	8	0	5	5	7	5	1	0	0,4	5	0	com	0,311	0,096
12	40	5	5	0	5	7	5	2	0	0	5	5	sem	0,000	0,005
13	5	8	0	5	0	7	5	2	5	0	0	5	com	0,011	0,041
14	5	5	5	0	5	1	5	2	5	0,4	0	0	com	0,504	0,019
15	5	5	0	5	0	7	1	2	5	0,4	5	0	sem	0,000	0,240
16	5	5	0	0	5	1	5	1	5	0,4	5	5	sem	0,000	0,038
17	40	5	0	0	0	7	1	2	0	0,4	5	5	com	0,000	0,074
18	40	8	0	0	0	1	5	1	5	0	5	5	com	0,000	0,038
19	5	8	5	0	0	1	1	2	0	0,4	0	5	com	0,422	0,055
20	5	5	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	sem	0,000	0,214