
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA CIVIL E AMBIENTAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA CIVIL



CÂNDIDA NATHALY CORDEIRO SOUTO

**INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES OPERACIONAIS EM REATORES ANAERÓBIOS
COM BIOMASSA ADERIDA PARA
OBTENÇÃO DE 1,3-PROPANODIOL A PARTIR DE GLICEROL**

Recife
2023

CÂNDIDA NATHALY CORDEIRO SOUTO

**INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES OPERACIONAIS EM REATORES ANAERÓBIOS
COM BIOMASSA ADERIDA PARA
OBTENÇÃO DE 1,3-PROPANODIOL A PARTIR DE GLICEROL**

Tese realizada em co-tutela entre a Universidade Federal de Pernambuco e a *Universidad Autónoma de Madrid*, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Engenharia Civil e ao *Programa de Doctorado en Microbiología*, da *Universidad Autónoma de Madrid*, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Microbiologia.

Área de concentração: Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos.

Orientadora: Profa. Dra. Maria de Lourdes Florencio dos Santos
(Universidade Federal de Pernambuco)

Orientador do Exterior: Prof. Dr. José Luis Sanz Martín
(*Universidad Autónoma de Madrid*)

Recife

2023

Catálogo na fonte
Bibliotecária Margareth Malta, CRB-4 / 1198

S728i	Souto, Cândida Nathaly Cordeiro. Influência das condições operacionais em reatores anaeróbios com biomassa aderida para obtenção de 1,3-Propanodiol a partir de glicerol / Cândida Nathaly Cordeiro Souto – 2023. 143 f.: il., figs., qds., tabs. Orientadora: Profa. Dra. Maria de Lourdes Florencio dos Santos. Orientador externo: Prof. Dr. José Luis Sanz Martín. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, 2023. Inclui Referências e Apêndices. 1. Engenharia Civil. 2. Fermentação de glicerol. 3. 1,3-Propanodiol. 4. Etanol. 5. Carga orgânica. 6. Biofilme. 7. Consórcio microbiano. I. Santos, Maria de Lourdes Florencio dos (Orientador). II. Sanz Martín, José Luis (Orientador externo). III. Título. UFPE 624 CDD (22. ed.) BCTG/2024-7
-------	---

CÂNDIDA NATHALY CORDEIRO SOUTO

**INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES OPERACIONAIS EM REATORES ANAERÓBIOS
COM BIOMASSA ADERIDA PARA OBTENÇÃO DE 1,3-PROPANODIOL
A PARTIR DE GLICEROL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil da Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Tecnologia e Geociências, como requisito para a obtenção do título de Doutora em Engenharia Civil.
Área de concentração: Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos.

Tese em Regime de Co-Tutela com a Universidade Autônoma de Madri

Aprovada em: 06/10/2023.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria de Lourdes Florencio dos Santos – UFPE

Orientador Externo: Prof. Dr. José Luis Sanz Martín – UAM

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Luis Sanz Martín (orientador externo)
Universidade Autônoma de Madri

Prof.^a Dr.^a Sávia Gavazza dos Santos Pessôa (examinadora interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Renato Carrhá Leitão (examinador externo)
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

participação por videoconferência
Prof.^a Dr.^a Giovana Tommaso (examinadora externa)
Universidade de São Paulo

participação por videoconferência
Prof.^a Dr.^a Juliana Calábria de Araújo (examinadora externa)
Universidade Federal de Minas Gerais

Prof. Dr. Osmar Luiz Moreira Pereira Fonseca de Menezes (examinador externo)
Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente aos grandes mestres com quem pude contar ao longo desse processo de grandes aprendizados e crescimento pessoal. Primeiro, ao meu pai, a minha mãe e a minha avó, por seus ensinamentos de força, sabedoria e resiliência, com toda certeza eles foram essenciais para que eu chegasse até aqui. A minhas irmãs, por sempre confiarem na minha capacidade e me apoiarem com tanto orgulho. A minha tia Marcela, que com admiração me chama de doutora desde meu primeiro ano de doutorado.

A minha amiga de infância Ellen Lima, por seus sábios conselhos e escuta ativa em tantos momentos. À amiga Camila Lima, que se faz presente mesmo que longe, sempre trazendo as verdades que eu preciso ouvir.

À Nathalia Leite, minha amiga-irmã que caminha comigo desde a nossa graduação. São tantas histórias compartilhadas, que já perdemos as contas. Agradeço por ser uma grande torcedora por minhas vitórias e por dividir comigo a sua casa (e a Frida) no final do meu doutorado, onde encontrei concentração e paz mental para o desenvolvimento desta tese e dos artigos.

Aos amigos que fiz desde o mestrado no LSA-UFPE, com quem tantas vezes compartilhei dúvidas (científicas ou não), problemas, alegrias, carnavais, sem esquecer das terapias por videochamadas durante o confinamento pela pandemia: Amanda, Antonio, Bárbara, Celinha, Julliana, Oucilane, Marcos, Rhayssa, Talita. Vocês são incríveis!

Ainda no LSA conheci a Shyrlane Veras, sempre muito gentil e solícita, que me auxiliou antes dos grandes desafios deste doutorado: o trabalho com glicerol e a mudança para outro país.

Aos técnicos do LSA, Danúbia, Ronaldo, Luís e Iago, por sempre estarem disponíveis, ensinando-nos as técnicas analíticas, ajudando na aquisição de materiais e compartilhando paciência e bom humor.

À professora Lourdinha Florencio, minha orientadora de mestrado e doutorado na UFPE, com quem aprendi a ser uma melhor profissional, agradeço seus ensinamentos e por lutar pela oportunidade do meu doutorado sanduíche.

Ao professor Mario Kato, pela confiança, oportunidade e pela paciência nas revisões de artigos. À professora Sávia Gavazza, por acreditar e lutar pela oportunidade da bolsa de doutorado sanduíche.

Ao professor José Luis Sanz, meu orientador na UAM, pelo acolhimento, paciência e orientação do início ao fim deste trabalho. Por estar comigo na bancada de laboratório quando necessário, por ser o maior incentivador para que os experimentos funcionassem e nossos

objetivos fossem alcançados. E além de tudo isso, por me ensinar que os momentos de descanso (e viagens) são essenciais para a nossa criatividade.

A Patricia Rojas, por também participar da minha orientação junto ao professor José Luis e pelo auxílio com as análises de biologia molecular e cromatografia gasosa. Ao Carlos, técnico no departamento de biologia molecular, por todo auxílio. Ao amigo Jorge Garcia, com quem compartilhei um importante e intenso período de experimentos no laboratório.

Aos meus amigos e vizinhos de laboratório na UAM, que tornaram todo o processo mais leve: Amparo, Carlos, Enrique, Estebán, Inés, Irene e Sabina.

A minha amiga e “compañera de piso”, Berta, que tanto me apoiou durante meus dois anos em Madrid, sendo minha família e grande incentivadora. E ao Dani, que sempre me incentivou junto à Berta, estando disponível para uma conversa acompanhada de “cerveza y fuet”.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Portanto, agradeço também à CAPES pelas bolsas concedidas para o doutorado na UFPE e na UAM (Processo: 88887.467533/2019-00). Ao *Ministerio de Ciencia e Innovación* da Espanha (PID2019-104812GB-I00) e à *Universidad Autónoma de Madrid*, pelo suporte institucional e por me receber para a realização dos experimentos necessários ao desenvolvimento desta tese.

Se pude enxergar longe, foi por ter o apoio de gigantes.

RESUMO

Neste trabalho, estudou-se a fermentação de glicerol por um consórcio bacteriano aderido a suportes de silicone em reatores anaeróbios de fluxo ascendente, em duas configurações: R_T (filtro anaeróbio) e R_S (fluxo-pistão), operados continuamente a diferentes condições de pH, TDH e cargas de glicerol (puro e bruto). Foram estabelecidas as condições ótimas para obter 1,3-PDO como principal produto. No reator R_T, além do 1,3-PDO (máximo 0,47 mol/mol-gli), etanol foi produzido, especialmente a pH acima de 8 e carga de glicerol (gli-LR) menor do que 10 g/L.d (máximo 0,20 mol/mol-gli). As produções de 1,3-PDO e etanol estiveram relacionadas às bactérias adaptadas às variações de gli-LR e pH do reator ao longo do período operacional. O biofilme aderido às mangueiras (inóculo) teve baixa diversidade, com dominância de *Pseudomonas*, *Lactobacillus* e *Raoultella*. Após 1 ano de alimentação com glicerol, *Pseudomonas* foram substituídas por bactérias anaeróbias, incluindo gêneros produtores de 1,3-PDO: *Lacrimispora* e *Clostridium* (40% das sequências). No reator R_S, operado com aumento progressivo da gli-LR, os rendimentos mais elevados (em média) de 1,3-PDO foram 0,43 mol/mol-gli e 0,62 mol/mol-gli, alcançados com gli-LR de 18 e 46 g/L.d, quando alimentou-se com glicerol puro e bruto, respectivamente. A produtividade máxima de 1,3-PDO (14,7 g/L.d) foi obtida com glicerol bruto. O biofilme aderido ao silicone (inóculo) teve baixa diversidade, com dominância de *Lactobacillus* (70,6%) e *Klebsiella/Raoultella* (23,3%). Após 293 dias de alimentação com glicerol puro, a abundância de *Klebsiella/Raoultella* diminuiu na biomassa aderida e na suspensão (9,7% e 7,4%, respectivamente). Além disso, o gênero *Clostridium* e membros da família *Ruminococcaceae* foram majoritários. Após a alimentação com glicerol bruto, *Clostridium* foi parcialmente substituído por *Eubacterium* na suspensão e permaneceu majoritário na biomassa aderida, indicando que as bactérias aderidas ao suporte converteram glicerol em 1,3-PDO. Em ambos os reatores também surgiram gêneros que não consomem glicerol, como: *Actinomyces* e *Eubacterium* (em R_T), *Anaerobacter* e *Acetitomaculum* (biomassa sedimentada em R_S). Estes sobreviveram às expensas de material de decaimento celular. Os resultados foram muito promissores para uma aplicação em grande escala, inclusive com altas cargas de glicerol bruto. Além dos estudos em reatores contínuos, experimentos em batelada confirmaram as tendências observadas em modo contínuo com respeito à produção de 1,3-PDO e etanol como subproduto.

Palavras-chave: fermentação de glicerol; 1,3-propanodiol; etanol; carga orgânica; biofilme; consórcio microbiano.

ABSTRACT

In this work, the fermentation of glycerol by a bacterial consortium attached to silicone supports was studied in upflow anaerobic reactors in two configurations: R_T (anaerobic filter) and R_S (plug flow), operated continuously at different conditions of pH, HRT, and glycerol loads (pure and crude). Optimal conditions were established to obtain 1,3-PDO as the main product. In the R_T reactor, in addition to 1,3-PDO (maximum 0.47 mol/mol-gly), ethanol was produced, especially at pH above 8 and glycerol load (gly-LR) lower than 10 g/L.d (maximum 0.20 mol/mol-gly). 1,3-PDO and ethanol productions were related to the bacteria adapted to the variations of gly-LR and pH during the operational period. The biofilm attached to the silicone (inoculum) had low diversity, with *Pseudomonas*, *Lactobacillus*, and *Raoultella* dominance. After 1 year of glycerol feeding, *Pseudomonas* were replaced by anaerobic bacteria, including 1,3-PDO producing genera: *Lacrimispora* and *Clostridium* (40% of the sequences). In the R_S reactor, operated with a progressive increase of gly-LR, the highest yields (on average) of 1,3-PDO were 0.43 mol/mol-gly and 0.62 mol/mol-gly, achieved with gly-LR of 18 and 46 g/L.d, when fed with pure and crude glycerol, respectively. The maximum productivity of 1,3-PDO (14.7 g/L.d) was obtained with crude glycerol. The biofilm attached to the silicone (inoculum) had low diversity, with dominance of *Lactobacillus* (70.6%) and *Klebsiella/Raoultella* (23.3%). After 293 days of feeding with pure glycerol, the abundance of *Klebsiella/Raoultella* decreased in the attached biomass and the suspension (9.7% and 7.4%, respectively). In addition, the genus *Clostridium* and members of the *Ruminococcaceae* family were the majority. After crude glycerol feeding, *Clostridium* was partially replaced by *Eubacterium* in the suspension. It remained the majority in the attached biomass, indicating that the attached-to-silicone bacteria converted glycerol into 1,3-PDO. In both reactors, non-degrading glycerol genera have also emerged, such as: *Actinomyces* and *Eubacterium* (in R_T), *Anaerobacter*, and *Acetomaculum* (sedimented biomass in R_S). These bacteria survived at the expense of cellular decay material. The results were very promising for scale-up application, even with high loads of crude glycerol. In addition to the studies in continuous reactors, batch experiments were carried out, and the trends observed in the production of 1,3-PDO and ethanol as a by-product in continuous mode were confirmed.

Keywords: glycerol fermentation; 1,3-propanediol; ethanol; organic load; biofilm; microbial consortium.

RESUMEN

La fermentación de glicerol por un consorcio bacteriano adherido a soportes de silicona fue analizada en reactores anaeróbicos de flujo ascendente, en dos configuraciones: R_T (filtro anaeróbico) y R_S (flujo de pistón), operados en continuo a diferentes condiciones de pH, HRT y cargas de glicerol (puro y crudo). Se establecieron las condiciones óptimas para obtener 1,3-PDO como producto principal. En el reactor R_T, además de 1,3-PDO (máximo 0,47 mol.mol-gli⁻¹), se produjo etanol, especialmente a pH superior a 8 y carga de glicerol (gli-LR) inferior a 10 g/L.d (máximo 0,20 mol/mol-gli). Las producciones de 1,3-PDO y etanol estuvieron relacionadas con la adaptación de las bacterias a las variaciones de gli-LR y pH del reactor durante el período de operación. La diversidad en el biofilm adherido a los soportes (inóculo) fue baja, con dominancia de *Pseudomonas*, *Lactobacillus* y *Raoultella*. Después de 1 año de alimentación con glicerol, *Pseudomonas* fueron reemplazadas por bacterias anaerobias, incluidos los géneros productores de 1,3-PDO: *Lacrimispora* y *Clostridium* (40% de las secuencias). En el reactor R_S, operado con aumento progresivo de gli-LR, los mayores rendimientos (en promedio) de 1,3-PDO fueron 0,43 mol/mol-gli y 0,62 mol/mol-gli, alcanzados con gli-LR de 18 y 46 g/L.d, cuando se alimentó con glicerol puro y crudo, respectivamente. La máxima productividad de 1,3-PDO (14,7 g/L.d) se obtuvo con glicerol crudo. El biofilm adherido a la silicona (inóculo) tuvo baja diversidad, con dominancia de *Lactobacillus* (70,6%) y *Klebsiella/Raoultella* (23,3%). Después de 293 días de alimentación con glicerol puro, la abundancia de *Klebsiella/Raoultella* disminuyó en la biomasa adherida y en la suspensión (9,7% y 7,4%, respectivamente). Además, el género *Clostridium* y los miembros de la familia *Ruminococcaceae* fueron mayoritarios. Después de la alimentación con glicerol crudo, *Clostridium* fue parcialmente reemplazado por *Eubacterium* en la suspensión y permaneció mayoritario en la biomasa adherida, lo que indicó que las bacterias adheridas al soporte convirtieron el glicerol en 1,3-PDO. En ambos reactores también surgieron géneros que no consumen glicerol como: *Actinomyces* y *Eubacterium* (en R_T), *Anaerobacter* y *Acetomaculum* (biomasa sedimentada en R_S). Estos sobrevivieron a expensas del material de descomposición celular. Los resultados fueron muy prometedores para una aplicación a gran escala, incluso con altas cargas de glicerol crudo. Además de los estudios en reactores continuos, experimentos en modo discontinuo confirmaron las tendencias observadas en continuo, con respecto a la producción de 1,3-PDO y etanol como subproducto.

Palabras clave: fermentación de glicerol; 1,3-propanodiol; etanol; carga orgánica; biopelícula; consorcio microbiano.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Reação de transesterificação e produção de biodiesel	18
Figura 2 -	Rotas biológicas associadas à produção de 1,3-PDO e outros subprodutos	20
Quadro 1 -	Estrutura molecular e propriedades do 1,3-PDO	23
Figura 3 -	Conversão de glicerol a formato e etanol	27
Figura 4 -	Principais produtos gerados a partir do consumo de glicerol e os micro- organismos responsáveis	32
Quadro 2 -	Principais gêneros fermentadores de glicerol: descrição, metabolismo e condições ótimas	32
Figura 5 -	Resumo das etapas experimentais realizadas antes e após o início da operação dos reatores contínuos	40
Figura 6 -	Frascos anaeróbios utilizados nas transferências para ativação do inóculo	41
Figura 7 -	Sistema experimental de alimentação das mangueiras para crescimento do biofilme	42
Figura 8 -	Experimentos em batelada variando a concentração de H ₂ e glicerol	44
Figura 9 -	Reatores R_S e R_T contendo os meios suportes com biofilme aderido ...	45
Figura 10 -	Sistema experimental do reator R_S	46
Figura 11 -	Sistema experimental do reator R_T	46
Figura 12 -	Separação de fases para remoção de gorduras do glicerol bruto (a); Glicerol utilizado no reator (b)	47
Figura 13 -	Rendimentos de 1,3-PDO e glicerol consumido em cada transferência dos inóculos M e S	54
Figura 14 -	Evolução dos rendimentos de 1,3-PDO nas transferências do inóculo M .	54
Figura 15 -	Consumo de glicerol, produção de 1,3-PDO e H ₂ , e pressão (P) nas bateladas com 90% de volume gasoso	58
Figura 16 -	Consumo de glicerol, produção de 1,3-PDO, etanol e H ₂ , e pressão (P) nas bateladas com 80% de volume gasoso	59
Figura 17 -	Correlação entre o percentual de volume gasoso e (a) rendimento de etanol e (b) rendimento de 1,3-PDO	60
Figura 18 -	Concentrações iniciais de glicerol e rendimentos dos metabólitos na fase líquida e gasosa em cada condição aplicada	61

Figura 19 -	Produtos versus concentração de glicerol: (a) 1,3-PDO e etanol produzidos com glicerol puro; (b) 1,3-PDO e etanol produzidos com glicerol bruto	62
Figura 20 -	Esquema das fases de operação do reator R_T e estudo simultâneo em reator para a produção de etanol a pH alcalino	69
Figura 21 -	Evolução da biomassa do reator R_T ao longo da operação	70
Figura 22 -	Condições operacionais (gli-LR, pH e TDH), consumo de glicerol e rendimentos de metabólitos durante a operação do reator R_T	72
Figura 23 -	Rendimentos de 1,3-PDO durante (a) P1, (c) P2 e (e) P3; Rendimentos de etanol durante (b) P1, (d) P2 e (f) P3	73
Figura 24 -	Correlação de Gli-LR com os rendimentos molares de etanol (a) e 1,3-PDO (b)	76
Figura 25 -	Balanço de massa do R_T durante as três fases operacionais	77
Figura 26 -	Caracterização da comunidade microbiana do reator R_T quanto à filo (a), ordem (b), família (c) e gênero (d)	81
Figura 27 -	Esquema experimental da operação do reator R_S	84
Figura 28 -	Reator R_S ao longo do período operacional	85
Figura 29 -	Condições operacionais (gli-LR, pH e TDH), consumo de glicerol e rendimentos de metabólitos durante a operação do reator R_S	91
Figura 30 -	Rendimentos de 1,3-PDO e outros subprodutos em função da carga de glicerol aplicada com (a) glicerol puro e (b) glicerol bruto	92
Figura 31 -	Perfis taxonômicos a nível de ordem (a), filo (b), família (c) e gênero (d)	99
Figura 32 -	Rendimentos de etanol (EtOH) e 1,3-PDO em função da carga de glicerol aplicada (Gli-LR) em R_T; Mudanças na diversidade por Abundância Relativa (RA) de gêneros no início (dia 0) e ao final da operação (dia 362)	106
Figura 33 -	Esquema da operação do reator R_S e principais resultados de rendimentos de 1,3-PDO	109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Rendimentos (Y) dos possíveis produtos da fermentação de glicerol (C3) e intermediários envolvidos na rota metabólica	30
Tabela 2 -	Resumo de trabalhos publicados com rendimentos dos produtos e condições operacionais, tipo de cultura microbiana e tipo de substrato	38
Tabela 3 -	Condições dos testes em batelada para avaliar duas concentrações iniciais de gás hidrogênio mantendo glicerol constante e mesmo volume de <i>headspace</i>	43
Tabela 4 -	Condições iniciais dos testes em batelada variando o volume de <i>headspace</i> e a concentração de glicerol	44
Tabela 5 -	Condições das bateladas de variação da concentração de glicerol puro e bruto e pH	48
Tabela 6 -	Amostras de biomassa coletadas dos reatores para extração de DNA e análise filogenética	52
Tabela 7 -	Rendimentos de 1,3-PDO e condições aplicadas nos testes com adição de H ₂	56
Tabela 8 -	Condições aplicadas e rendimentos de 1,3-PDO e etanol durante as bateladas com adição de H ₂ e variação do percentual de volume gasoso ..	57
Tabela 9 -	Concentrações iniciais de glicerol aplicadas e metabólitos produzidos	61
Tabela 10 -	Concentrações de glicerol e rendimentos dos metabólitos produzidos nas bateladas com adição de doadores de elétrons	65
Tabela 11 -	Condições operacionais aplicadas e eficiência do reator R_T em P1, P2 e P3	71
Tabela 12 -	Leituras, diversidade e índices de uniformidade para o inóculo e o reator R_T após um ano de operação	78
Tabela 13 -	Condições operacionais aplicadas e eficiência do reator R_S durante as fases P1 e P2	86
Tabela 14 -	Caracterização do glicerol bruto	89
Tabela 15 -	Dados numéricos das sequências, biodiversidade, abundância e índices de cobertura das biomassas analisadas.....	93

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	OBJETIVO GERAL E ESPECÍFICOS	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1	PRODUÇÃO DE BIODIESEL E GERAÇÃO DE RESÍDUOS	17
2.2	FERMENTAÇÃO DO GLICEROL: PRODUÇÃO DE 1,3-PROPANODIOL E OUTROS SUBPRODUTOS	19
2.2.1	1,3-propanodiol	23
2.2.2	Bioetanol	25
2.2.3	Hidrogênio	28
2.3	BACTÉRIAS FERMENTADORAS DE GLICEROL E OS PRODUTOS OBTIDOS	30
2.4	INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES OPERACIONAIS NA FERMENTAÇÃO DO GLICEROL.....	35
3	MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.1	ATIVAÇÃO DO CONSÓRCIO MICROBIANO	40
3.2	FORMAÇÃO DO BIOFILME PARA OS REATORES CONTÍNUOS.....	41
3.3	EXPERIMENTOS EM BATELADA: INFLUÊNCIA DAS RELAÇÕES GLICEROL:H ₂ , VOLUME GASOSO E CONCENTRAÇÃO DE GLICEROL NOS RENDIMENTOS DE 1,3-PDO E SUBPRODUTOS.....	43
3.4	OPERAÇÃO DOS REATORES ANAERÓBIOS CONTÍNUOS COM MEIO SUPORTE.....	45
3.5	EXPERIMENTOS EM BATELADA: INFLUÊNCIAS DA CONCENTRAÇÃO DE GLICEROL, pH INICIAL E SUBSTRATO NA FERMENTAÇÃO	48
3.6	EXPERIMENTOS EM BATELADA: INFLUÊNCIA DE DOADORES DE ELÉTRONS (LACTATO, METANOL, ETANOL E H ₂) NO RENDIMENTO DE 1,3-PDO	49
3.7	MÉTODOS ANALÍTICOS	50

3.8	ANÁLISE DA COMUNIDADE MICROBIANA	51
4	ATIVAÇÃO DO INÓCULO, TESTES EM BATELADAS E CRESCIMENTO DO BIOFILME DOS REATORES.....	53
4.1	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
4.1.1	Ativação do inóculo e rendimentos de 1,3-PDO.....	53
4.1.2	Crescimento do biofilme nos suportes para os reatores anaeróbios	55
4.1.3	Influência das relações glicerol:hidrogênio e o volume gasoso nos rendimentos de 1,3-PDO e subprodutos.....	56
4.1.4	Influência da concentração de glicerol sob os rendimentos de 1,3-PDO e subprodutos	60
4.1.5	Influência da concentração de glicerol, pH e tipo de substrato na fermentação	62
4.1.6	Influência de doadores de elétrons (H ₂ , lactato, metanol e etanol) no rendimento de 1,3-PDO.....	64
5	EFEITO DAS CONDIÇÕES OPERACIONAIS APLICADAS A REATOR COM MEIO SUPORTE DE SILICONE NA PRODUÇÃO DE 1,3-PROPANODIOL E ETANOL PELA FERMENTAÇÃO DE GLICEROL	68
5.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	68
5.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	69
5.2.1	Imobilização da biomassa	69
6	PRODUÇÃO DE 1,3-PROPANODIOL POR FERMENTAÇÃO DE GLICEROL EM REATOR ANAERÓBIO COM BIOFILME ADERIDO AO SUPORTE DE SILICONE	83
6.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	83
6.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	84
6.2.1	Eficiência do reator: efeito da carga orgânica de glicerol.....	85
6.2.2	Efeitos do glicerol bruto e da imobilização da biomassa na eficiência do reator	88

6.2.3	Caracterização da comunidade microbiana do reator R_S.....	92
7	DISCUSSÃO GERAL	102
8	CONCLUSÕES.....	112
	REFERÊNCIAS.....	116
	APÊNDICE A - FERMENTAÇÃO EM REATORES CONTÍNUOS PARA OBTENÇÃO DE ETANOL E 1,3-PDO EM CONDIÇÕES ALCALINAS .	125
	APÊNDICE B - RESUMEN EXTENSO EM CASTELLANO	131

1 INTRODUÇÃO

O mercado dos biocombustíveis é influenciado pela demanda por combustíveis e políticas nacionais de incentivo. A União Europeia é a principal produtora mundial de biodiesel, tendo produzido 32,3% em 2021, seguida pelos USA (18,1%), Indonésia (15,0%) e Brasil (12,2%) (OECD-FAO, 2021).

O biodiesel é produzido a partir de uma reação de transesterificação de gordura vegetal ou animal em meio alcalino, cujo principal subproduto obtido é o glicerol. Estima-se que a produção global de biodiesel irá aumentar a 50 bilhões de litros até 2030, com o aumento da produção por países emergentes. No Brasil, atualmente, é exigido um percentual de 12% de biodiesel ao diesel, enquanto a Indonésia introduziu o B30 (30%) em 2020 (OECD-FAO, 2021).

Um fator ainda preocupante é o excesso de glicerol gerado, cujo processo de purificação é custoso e que, a depender de sua origem, contém impurezas como gorduras residuais, sais, metanol, sabões e catalisadores, que dificultam o seu aproveitamento. A busca por alternativas para agregar valor ao glicerol bruto tem crescido com o aumento da demanda mundial por biodiesel, sendo de grande importância o estudo de técnicas que viabilizem o seu aproveitamento.

O glicerol pode ser convertido biologicamente, via fermentação, em diversos produtos de interesse de mercado. A conversão ocorre por duas rotas metabólicas: a redutiva, em que se obtém exclusivamente 1,3-propanodiol (1,3-PDO) como produto e a rota oxidativa, em que se podem obter outros produtos, tais como H_2 , etanol, butanol e ácidos carboxílicos (GARLAPATI; SHANKAR; BUDHIRAJA, 2016; MONTEIRO *et al.*, 2018; MOSCOVIZ; TRABLY; BERNET, 2016).

Os métodos químicos tradicionais para obtenção do 1,3-PDO têm custo elevado, especialmente por requisitos como o uso de catalisadores e condições de temperatura e pressão elevadas. Por outro lado, é possível produzir o 1,3-PDO por via biológica, onde o substrato mais estudado é o glicerol, cuja rota redutiva da fermentação resulta em 1,3-PDO como produto.

Alguns micro-organismos são capazes de converter o glicerol em 1,3-PDO, ácidos graxos (acetato e butirato) e etanol. Outros oxidam o etanol e promovem o alongamento de cadeia dos ácidos graxos. O sinergismo entre as espécies permite alcançar uma eficiente coprodução de 1,3-PDO e outros subprodutos de interesse (LENG *et al.*, 2019; YANG, F.; HANNA; SUN, R., 2012).

A produção de 1,3-PDO por culturas mistas de bactérias favorece a aplicação em escala

real, sem requisitos de esterilização e ainda com a possibilidade de utilizar o glicerol bruto, o que o torna mais vantajoso em comparação a culturas puras (DIETZ; ZENG, 2014; GALLARDO *et al.*, 2014; MOSCOVIZ; TRABLY; BERNET, 2016; VARRONE *et al.*, 2017).

Entretanto, os dados publicados na literatura ainda são insuficientes para garantir a sua viabilidade. Dessa forma, é necessário avançar cientificamente para esclarecer a influência de alguns parâmetros operacionais, visando maximizar o rendimento do 1,3-PDO.

No presente estudo, foram avaliadas as melhores condições operacionais para obtenção de rendimentos elevados de 1,3-PDO por meio da fermentação do glicerol puro e bruto por culturas mistas de bactérias em testes em batelada e em reatores anaeróbios de operação contínua, além da caracterização da comunidade microbiana como ferramenta para complementar o estudo a nível microbiológico, fornecendo os dados necessários para ampliar a produção científica e incentivar a aplicação do processo com maior simplicidade de operação.

1.1 OBJETIVO GERAL E ESPECÍFICOS

Objetivo geral: Estudar a fermentação de glicerol puro e bruto em reatores anaeróbios contínuos com diferentes condições operacionais e duas configurações de meio suporte.

Para alcançar este objetivo propõem-se os seguintes objetivos específicos:

- Estudar a influência de pH, concentração de glicerol, hidrogênio e doadores de elétrons, nos rendimentos de 1,3-propanodiol em sistemas descontínuos (*batch*)
- Promover o crescimento e adesão de uma cultura mista de bactérias anaeróbias consumidoras de glicerol em meio suporte de silicone para aplicação em reatores contínuos
- Definir as melhores condições operacionais de TDH, pH e carga aplicada de glicerol, para obter melhores rendimentos de 1,3-propanodiol em reatores anaeróbios contínuos com meio suporte (filtro anaeróbio de fluxo ascendente)
- Avaliar a produção de etanol *versus* 1,3-propanodiol em reatores contínuos alimentados com glicerol puro e adição variável de bicarbonato de sódio
- Caracterizar a comunidade microbiana dos reatores por meio da extração de DNA e sequenciamento genético do gene 16S RNAr das biomassas coletadas
- Verificar a ocorrência de mudanças nas espécies dominantes influenciadas pelas condições aplicadas aos reatores ao longo da operação.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nesta seção será apresentado o levantamento bibliográfico relacionado ao tema desta da presente tese, explicitando desde a formação de glicerol até as possibilidades de reaproveitamento, processos e micro-organismos envolvidos.

2.1 PRODUÇÃO DE BIODIESEL E GERAÇÃO DE RESÍDUOS

O mercado dos biocombustíveis é influenciado pela demanda por combustíveis fósseis e pelas políticas nacionais de incentivo. O cenário mundial sofreu mudanças influenciadas por questões atuais como a pandemia causada pelo coronavírus, que levou a uma restrição no setor de transportes e diminuição da demanda por combustíveis, além da invasão russa ao território ucraniano, que tem causado um choque entre o mercado de energia e de agricultura quanto à destinação dos alimentos produzidos para fins alimentícios e para produção de energia. Assim, a demanda por biocombustíveis sofreu uma diminuição entre os anos 2019-2020, recuperando-se em 2021 (OECD, 2022).

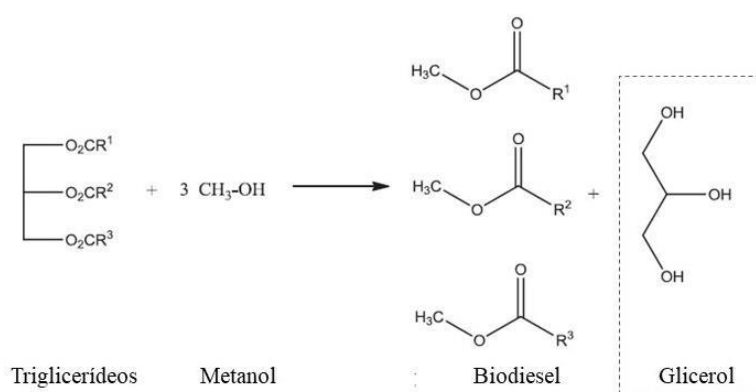
A União Europeia é a principal produtora mundial de biodiesel, tendo produzido 32,3% em 2021, seguida pelos EUA, Indonésia e Brasil (18,1, 15,0 e 12,2%, respectivamente). Espera-se que o consumo global de biocombustíveis aumente especialmente nos países em desenvolvimento, que tendem a elevar o percentual na mistura combustível (OECD-FAO, 2021).

Estima-se que a produção global de biodiesel irá aumentar a 50 bilhões de litros até 2030, com o aumento da produção pelos países emergentes. A Indonésia introduziu 30% de biodiesel adicionado ao diesel (B30) em 2020 e pretende implementar o B35 em janeiro de 2023, em meio às expectativas de que o preço do petróleo bruto continue em alta. No Brasil, o Conselho Nacional de Política Energética (CNPE) aprovou resolução que estabelece o teor 12% de mistura obrigatória do biodiesel ao diesel fóssil em 2023, com aumento para 15% de forma progressiva até 2026 (BRASIL, 2023).

Quimicamente, o biodiesel é composto por ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) que se produzem a partir de uma reação de transesterificação de um óleo vegetal ou gordura animal com um álcool, catalisada por hidróxido de potássio (KOH) ou de sódio (NaOH) (Figura 1), cuja mistura ao óleo ou gordura provoca diminuição da viscosidade, gerando uma mistura bifásica de biodiesel e glicerol. Além de óleos vegetais e gordura animal, pode-se obter o biodiesel a partir de óleos de cozinha utilizados e algas que acumulem triglicerídeos (BART; PALMERI; CAVALLARO, 2010; KAUR *et al.*, 2020; MONTEIRO *et al.*, 2018).

Contudo, um fator relacionado à produção de biodiesel que ainda é preocupante é o excesso de glicerol gerado como principal subproduto (0,10 kg por kg de biodiesel produzido), denominado glicerol bruto, que apresenta coloração escura e contém impurezas como gorduras residuais, sais, metanol, sabões e catalisadores, que dificultam a sua absorção pelo mercado devido à necessidade de purificação. O teor de impurezas pode variar de 20% a 60% a depender da matéria-prima, eficiência catalítica e das etapas de preparação e purificação do biodiesel (CHATZIFRAGKOU *et al.*, 2011; KAUR *et al.*, 2020; MONTEIRO *et al.*, 2018; DIETZ; ZENG., 2014).

Figura 1 - Reação de transesterificação e produção de biodiesel



Fonte: Adaptado de LEE *et al.* (2015)

O glicerol obtido junto ao biodiesel, pelo processo convencional de transesterificação, necessita de uma etapa de purificação para ser comercializado no setor alimentício ou farmacêutico (pureza entre 96 e 99,5%), que consiste na remoção dos sais dissolvidos, da cor e de impurezas de óleos e graxas, concentração e/ou destilação. Algumas plantas de biodiesel utilizam o glicerol bruto para produção de energia ou o vendem sem nenhum tratamento, pois apesar de contribuir para a valorização do resíduo, a purificação não é viável para empresas de pequeno e médio porte e, portanto, torna-se um resíduo de difícil destinação (ARDI; AROUA; HASHIM, 2015; BART; PALMERI; CAVALLARO, 2010; MONTEIRO *et al.*, 2018).

Desta forma, é necessário apresentar alternativas que viabilizem o aproveitamento do glicerol bruto, sem a necessidade de purificação. O desenvolvimento de biotecnologias que permitam o aproveitamento do glicerol residual, priorizando a obtenção de produtos de valor agregado, irá viabilizar a ascensão da produção de biodiesel (OECD-FAO, 2021).

2.2 FERMENTAÇÃO DO GLICEROL: PRODUÇÃO DE 1,3-PROPANODIOL E OUTROS SUBPRODUTOS

A busca por alternativas para agregar valor ao glicerol residual tende ao crescimento com uma maior demanda mundial por biodiesel. O preço de comercialização do resíduo não compensa os custos aplicados ao seu refino. Dessa forma, o uso do glicerol como matéria-prima ou substrato para a produção de compostos de valor agregado torna-se mais atrativa (VIVEK *et al.*, 2017).

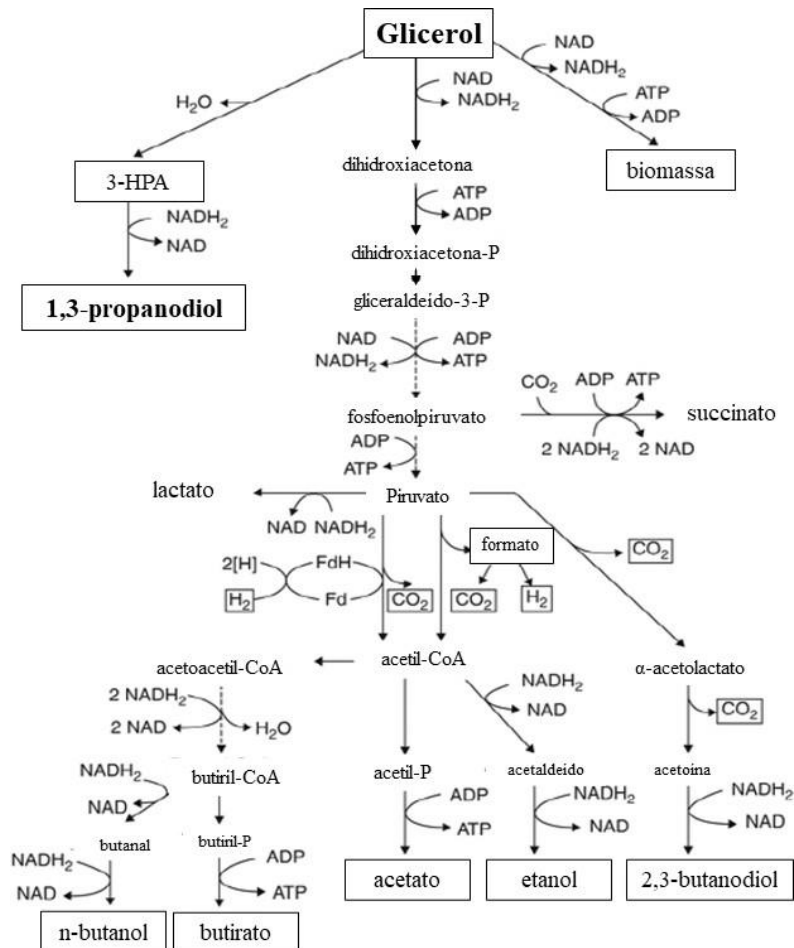
O glicerol é considerado uma matéria-prima alternativa aos açúcares e carboidratos na produção de compostos químicos e combustíveis em processos fermentativos (BART *et al.*, 2010). Em ambos os casos, a aplicação do glicerol como fonte de carbono é mais vantajosa, devido ao seu elevado grau de redução (CLOMBURG; GONZALEZ, 2013; VIVEK *et al.*, 2017).

Além das impurezas já citadas, o glicerol bruto contém nutrientes, como fósforo, sódio, cálcio, nitrogênio e enxofre, o que facilita a sua fermentação (ZENG; BIEBL, 2002).

Em condições anaeróbias o glicerol pode ser metabolizado pela célula bacteriana por meio de duas rotas paralelas: (i) rota redutiva, onde o 1,3-PDO é produzido pela desidratação do glicerol a 3-hidroxiopropanaldeído (3-HPA) com a atuação de uma enzima B12-dependente.

O 3-HPA formado é reduzido a 1,3-PDO por uma NADH-oxidoredutase, regenerando o NAD^+ ; (ii) rota oxidativa, onde o glicerol é oxidado a piruvato (glicólise) via dihidroxiacetona (DHA). A formação de DHA ocorre por desidrogenação seguida por fosforilação para formar piruvato. Durante a fermentação, o piruvato obtido na glicólise e o 3-HPA competem pela NADH-oxidoredutase para formar outros produtos, tais como etanol, ácido acético, butanol etc. (SARRIS; PAPANIKOLAOU, 2016). As rotas bioquímicas descritas estão esquematizadas na Figura 2.

Figura 2 - Rotas biológicas associadas à produção de 1,3-PDO e outros subprodutos

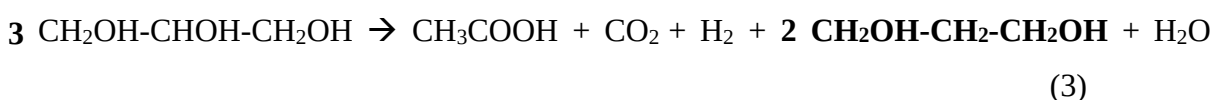


Fonte: adaptado de (BIEBL, H. *et al.*, 1999)

De acordo com BIEBL *et al.* (1998), o 1,3-propanodiol é o produto característico da fermentação do glicerol, formado por uma etapa de desidratação e redução. Os equivalentes redutores e a energia necessários devem ser produzidos pela oxidação de glicerol a ácido acético e a ácido butírico em *Clostridium* (com menor rendimento). A formação de etanol a partir do glicerol não fornece equivalentes redutores, pois é redox-neutro.

Os subprodutos formados dependem dos micro-organismos envolvidos e das condições aplicadas ao processo (LEE *et al.*, 2015; ZENG; BIEBL, 2002). Portanto, o rendimento e proporção dos produtos irá depender da combinação e estequiometria das vias redutiva e oxidativa. De acordo com Zeng; Biebl (2002) o rendimento de 1,3-PDO é favorecido quando

ácido acético é o único subproduto da via oxidativa e, nesta combinação, o rendimento de 1,3-PDO é máximo (67 % mol/mol de glicerol consumido), conforme as equações:



Outros estudos também já demonstraram que o rendimento de 1,3-PDO é máximo quando se obtém ácido acético como único subproduto da rota oxidativa (CLOMBURG; GONZALEZ, 2013; GARLAPATI; SHANKAR; BUDHIRAJA, 2016; MONTEIRO *et al.*, 2018; MOSCOVIZ; TRABLY; BERNET, 2016; VERAS *et al.*, 2019a).

Além da influência dos micro-organismos dominantes no processo fermentativo, a distribuição dos produtos da fermentação é influenciada pelas condições operacionais aplicadas. Dessa forma, o controle dos parâmetros operacionais e o entendimento das rotas na fermentação do glicerol são de grande importância nesse processo (VARRONE; SKIADAS; GAVALA, 2018).

Poucos micro-organismos são capazes de fermentar glicerol a 1,3-PDO (rota redutiva). O glicerol é convertido a piruvato através da dihidroxicetona-fosfato (Figura 2). No metabolismo de *Klebsiella*, o piruvato é clivado a acetil-CoA e formato, gerando etanol, acetato, CO₂ e H₂. Um balanço dos equivalentes redutores é requerido, resultando na conversão de glicerol a 3-hidroxiopropanaldeído (3-HPA) via glicerol desidratase e subsequente redução a 1,3-PDO (ROSENBERG *et al.*, 2013).

De acordo com Biebl *et al.* (1999), as bactérias dos gêneros *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter* (família *Enterobacteriaceae*), *Lactobacillus* e *Clostridium*, são capazes de produzir 1,3-PDO. Porém, a mistura dos produtos que derivam da formação de piruvato por dihidroxiacetona é variável e depende do micro-organismo. Enquanto *Klebsiella* forma etanol, formato, lactato, acetato e 2,3-butanodiol (2,3-BDO), *Clostridium* também pode produzir butirato e butanol e não produzir 2,3-BDO. Os produtos variam e dependem tanto do micro-

organismo quanto das condições de crescimento, incluindo pH e concentração de glicerol (ROSENBERG *et al.*, 2013; ZHU *et al.*, 2021).

Para o cálculo de rendimentos teóricos por *Klebsiella pneumoniae*, (ROSENBERG *et al.*, 2013) consideram separadamente a geração de ATP por duas vias: (i) a rota de produção de ácido acético e (ii) a rota de etanol e concluem que a primeira tem rendimento de 1,3-PDO cinco vezes maior do que a de etanol, que resulta em maior rendimento de biomassa e de ATP. Já as bactérias da espécie *Clostridium butyricum*, produzem butirato e/ou acetato pelo metabolismo de glicerol, sendo a formação de butirato mais favorável à síntese de biomassa, uma vez que produz mais ATP. Sendo assim, para ambas as espécies, a rota que favorece a produção de ácido acético é também a de maior rendimento de 1,3-PDO.

Para Zeng *et al.* (1997), a produção de 1,3-PDO é máxima quando butirato e hidrogênio não são produzidos e o valor máximo de rendimento teórico é de 0,72 mol de 1,3-PDO/mol de glicerol. Considerando que acetato ou butirato sejam produzidos, os autores consideraram que a rota de ácido acético resulta em rendimento de 1,3-PDO 30% maior do que na formação de ácido butírico, com rendimento teórico máximo de 0,65 mol de 1,3-PDO/mol de glicerol com formação de H₂, sendo mais favorável à produção 1,3-PDO.

Quanto à habilidade de produzir 1,3-PDO, dentre as enterobactérias, *K. pneumoniae* utiliza glicerol e produz 1,3-PDO, enquanto *Klebsiella oxytoca* produz muito menos 1,3-PDO a partir de glicerol. *K. oxytoca* possui a atividade de 1,3-propanodiol desidrogenase e não possui a glicerol desidrogenase. Outras espécies de *Klebsiella* não crescem fermentativamente em glicerol e possuem a enzima glicerol desidrogenase, mas não a 1,3-PDO desidrogenase (ROSENBERG *et al.*, 2013; GRIMONT; GRIMONT, 2005). Quando *Enterobacter agglomerans* crescem anaerobicamente em glicerol, o produto majoritário é 1,3-PDO; acetato, etanol e formato também são produzidos em quantidades significativas, enquanto lactato e succinato são minoritários (ROSENBERG *et al.*, 2013).

Diante do exposto, as rotas bioquímicas de fermentação do glicerol podem resultar em diversos produtos, a depender das condições impostas e dos micro-organismos envolvidos. Nos próximos tópicos, serão discutidas as formações de 1,3-PDO e de alguns subprodutos da rota oxidativa.

3.1.1 1,3-propanodiol

O 1,3-propanodiol (1,3-PDO) é um diol (Quadro 1) intermediário na produção de poliésteres e poliuretanos, vastamente utilizado nas indústrias de alimentos, cosméticos e farmacêutica. Além disso, é utilizado na indústria química como monômero precursor do polítrimetileno tereftalato (PTT), polímero importante de grande demanda no setor têxtil. Conforme cresce a produção de PTT, espera-se que também aumente a demanda por 1,3-PDO, sendo, portanto, um produto de alto valor agregado.

Além do setor têxtil, o 1,3-PDO possui diversas aplicações em outros setores industriais como: adesivos, laminados, compósitos, tintas, produtos de limpeza e anticongelantes (GARLAPATI; SHANKAR; BUDHIRAJA, 2016; MARKETANDMARKETS, 2019). O mercado de 1,3-PDO no ano 2020 foi avaliado em US\$ 401,7 milhões com um crescimento estimado de US\$ 292,4 milhões de 2019 a 2024, apresentando uma taxa média anual de crescimento de 11,4%, já considerando o impacto causado pela COVID-19, sendo a América do Norte responsável por 74% deste crescimento (DA SILVA RUY *et al.*, 2020).

Quadro 1 - Estrutura molecular e propriedades do 1,3-PDO


Fórmula: C ₃ H ₈ O ₂
Nomenclaturas: 1,3-propanodiol, propileno glicol, 1,3-dihidroxipopano
Peso molecular: 76,09 g/mol
Densidade: 1,0597 g/L (25 °C)

Fonte: A autora (2023)

Os métodos químicos tradicionais mais utilizados para obtenção do 1,3-PDO foram desenvolvidos por Shell e Degussa (atualmente dominados por DuPont) e baseiam-se na conversão catalítica de óxido de etileno (Shell) e de acroleína (Degussa) a 1,3-PDO. Contudo, a síntese química requer condições de elevadas temperatura e pressão, uso de catalisadores químicos que aumentam os custos do processo, além de produzir compostos intermediários tóxicos (KAUR *et al.*, 2020; SUN *et al.*, 2018; KNIFTON *et al* 2003; VIVEK; PANDEY; BINOD, 2016).

O 1,3-PDO também pode ser obtido por processos biológicos como a fermentação, porém não é produzido por conversão anaeróbia de nenhum outro substrato orgânico que não seja o glicerol. A biossíntese de 1,3-PDO pela fermentação de glicerol é mais vantajosa em relação à síntese química, caracterizando-se como uma opção sustentável, ao passo que contribui para agregar valor ao glicerol residual gerado. Alguns estudos têm aplicado como estratégia a co-fermentação com açúcares como a glicose, contando com a conversão de glicose em glicerol para obter 1,3-PDO e elevar seus rendimentos (FOKUM *et al.*, 2021; SAXENA *et al.*, 2009).

A maioria dos estudos que obtiveram rendimentos próximos ao valor máximo teórico de 0,72 mol 1,3-PDO.mol gli⁻¹, sugerido por Zeng *et al.* (1997) e Biebl *et al.*, (1999), utilizou culturas puras de bactérias na fermentação e co-fermentação de glicerol. Entretanto, isto envolve algumas exigências, como condições estéreis e um meio nutricional mais complexo, que dificultam a aplicação em grande escala (NAKAZAWA *et al.*, 2017; VIVEK; PANDEY; BINOD, 2016).

Muitos estudos já reportaram a obtenção de 1,3-PDO por fermentação de glicerol (quase sempre puro) e com operação em batelada ou batelada alimentada, cujos rendimentos de 1,3-PDO obtidos estiveram entre 0,5-0,7 mol.mol-gli⁻¹ (Tabela 2). Outros trabalhos que reportaram rendimentos maiores utilizaram estratégias que ainda não são viáveis a nível industrial, como melhoramento genético de espécies, ou ainda pela co-fermentação com algum outro substrato, normalmente glicose. (LEE; JUNG; OH, 2018) realizaram modificação genética de *K. pneumoniae* eliminando os genes responsáveis pela formação de subprodutos como lactato e formato e dos reguladores de DHA para uma maior conversão de 1,3-PDO. Os autores obtiveram rendimentos de 1,3-PDO de 0,76 mol.mol⁻¹ via fermentação de glicerol em batelada.

Moscoviz; Trably; Bernet (2016) conduzindo experimentos em batelada com cultura mista, relataram que o 1,3-PDO teve máximo rendimento quando o acetato era o único subproduto, mas diminuiu quando o etanol e o formato foram coproduzidos. Ao analisarem a correlação entre as comunidades microbianas e as fermentações, os autores concluíram que a produção de 1,3-PDO esteve correlacionada positivamente com acetato e negativamente com lactato, etanol e hidrogênio. Os autores também demonstraram que o rendimento de 1,3-PDO diminui quando etanol e formato são produzidos juntos, atingindo um mínimo de 0,11 mol.mol-gli⁻¹ e, nessa situação, ocorre máximo crescimento de biomassa; dessa forma, o glicerol é utilizado para a formação de biomassa, diminuindo o rendimento de 1,3-PDO.

A síntese biológica de 1,3-PDO também encontra alguns desafios e barreiras econômicas, como baixos rendimentos e produtividade quando os processos ocorrem à temperatura ambiente, pressão atmosférica e principalmente em bateladas. Uma excelente alternativa é a aplicação do modo de operação contínua ou em bateladas alimentadas (*fed-batch*). A operação de biorreatores em modo contínuo e com células imobilizadas contribui para melhorar a produtividade do processo, aumentando a densidade celular no meio (SAXENA *et al.*, 2009; ZENG; BIEBL, 2002).

Os estudos com reatores em operação contínua ainda necessitam ser mais explorados. Gallardo *et al.*, (2014) obtiveram 0,52 mol de 1,3-PDO por mol de glicerol consumido utilizando cultura mista de bactérias em um reator contínuo do tipo EGSB (*Expanded Granular Sludge Bed*). Nakazawa *et al.* (2017) obtiveram o máximo rendimento de 1,3-PDO de 0,43 mol.mol-gli⁻¹ utilizando cultura mista em reator contínuo tipo UASB (*Upflow Anaerobic Sludge Blanked*). Veras (2019) alcançou rendimentos variáveis de 0,4 a 0,5 mol.mol-gli⁻¹ utilizando culturas mistas também em reator tipo UASB utilizando glicerol puro e bruto como substrato. Varrone *et al.* (2017) relataram elevado rendimento de 0,63 mol-1,3-PDO.mol-gli⁻¹ em reator contínuo tipo CSTR (*Continuous Stirred Tank Reactor*) e cultura mista.

3.1.2 Bioetanol

O bioetanol se classifica como um biocombustível, cuja matéria-prima é uma biomassa renovável, vastamente utilizado no setor de transportes, sendo produzido a partir de milho e cana-de-açúcar pelos principais produtores mundiais: EUA e Brasil, respectivamente.

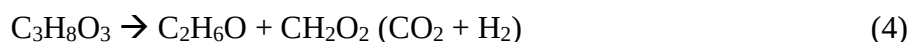
Considera-se de primeira geração o etanol derivado da fermentação de açúcares simples e/ou de amido (fonte alimentícia), enquanto o etanol de segunda geração deriva da conversão de uma matéria-prima lignocelulósica; para o de terceira geração, algas e resíduos alimentares são matéria-prima (MELENDEZ *et al.*, 2022).

Os estudos voltados à produção de bioetanol estão principalmente focados na descoberta de novos micro-organismos, naturais ou geneticamente modificados, para a obtenção de etanol a concentrações finais significativas. Ou ainda, estão focados em processos de otimização, modelagem e desenvolvimento de novas configurações de fermentação, a fim de potencializar a utilização de vários subprodutos, resíduos e/ou material renovável bruto como substrato (SARRIS; PAPANIKOLAOU, 2016).

Adicionalmente, os processos biotecnológicos que não requerem condições assépticas ou pré-tratamento, como é o caso da produção a partir de matéria lignocelulósica, tornam-se mais atrativos, especialmente pela redução dos custos operacionais. Dessa forma, a otimização de condições para o reaproveitamento do glicerol residual para obtenção de etanol pode ser uma interessante alternativa.

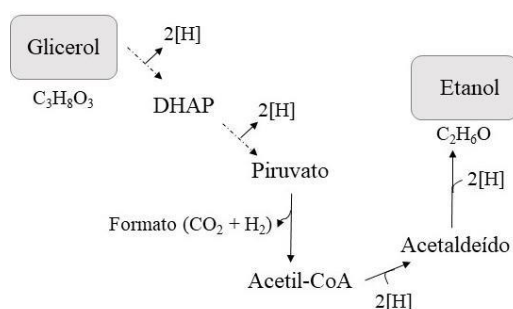
Glicose, dissacarídeos, xilose e glicerol são as principais fontes simples de carbono que podem ser convertidas em etanol. A glicose é convertida principalmente pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* e a bactéria *Zymomonas mobilis*; já o glicerol, embora existam poucos estudos relatados, pode ser convertido por cepas de bactérias e leveduras (CHA *et al.*, 2015; CHOI *et al.*, 2011; ITO *et al.*, 2005; METSOVITI *et al.*, 2012).

Um dos primeiros estudos reportando a produção de etanol por fermentação de glicerol foi realizado por (JARVIS; MOORE; THIELE, 1997), onde etanol e formato foram produzidos em quantidades equimolares (30 e 32 mmol.L⁻¹, respectivamente) por *Klebsiella planticola*. De acordo com Clomburg; Gonzalez (2013), etanol e formato (ou H₂ e CO₂) podem ser produzidos, simultaneamente, a partir dos equivalentes redutores gerados na conversão de glicerol a piruvato (Figura 3), conforme a equação (4):



Zhang *et al.*, (2006) em um estudo do metabolismo de glicerol por *K. pneumoniae* YMU2 demonstraram que a produção de 1,3-PDO por tal espécie é diminuída quando etanol também é produzido. Nesse metabolismo, duas moléculas de NADH são consumidas na formação de uma molécula de etanol.

A enzima acetaldeído desidrogenase oxida uma molécula de NADH na conversão de acetil-CoA a acetaldeído e, em seguida, ocorre a formação de etanol por atuação da enzima etanol desidrogenase e oxidação de outra molécula de NADH. Assim, estas duas enzimas que oxidam NADH para a produção de etanol precisariam ser impedidas de atuar para que a produção de 1,3-PDO não fosse prejudicada. Os autores realizaram uma modificação genética para a inativação da enzima acetaldeído desidrogenase e conseguiram aumentar o rendimento de 1,3-PDO até 0,7 mol.mol⁻¹.

Figura 3 - Conversão de glicerol a formato e etanol

Fonte: (Adaptado de Clomburg; Gonzalez, 2013)

Nota: linhas pontilhadas indicam reações em várias etapas; DHAP: dihidroxiacetona-fosfato.

Temudo *et al.* (2008) realizaram um estudo comparativo da fermentação de glicose e glicerol, separadamente, em reator tipo CSTR com cultura mista e pH controlado a 8,0. Somente o reator alimentado com glicerol produziu 1,3-PDO; acetato e butirato foram quase negligenciáveis no reator com glicerol e etanol foi produzido em quantidades muito maiores. Os autores também avaliaram a variação da concentração inicial de glicerol (4 a 25 g.L⁻¹) e observaram que em condições limitantes de substrato, os rendimentos de etanol-formato foram maiores que 60% (em termos de carbono convertido); ao elevar a concentração de glicerol, os rendimentos de acetato e 1,3-PDO cresceram.

Vikromvarasiri *et al.* (2016) produziram etanol pela fermentação em batelada em frascos sorológicos de 100 mL utilizando lodo granular de reator UASB como inóculo e variando a concentração do glicerol puro, de 10 a 128 g.L⁻¹, e o pH inicial (4 a 7). Os autores obtiveram rendimentos de 0,66 a 0,85 mol etanol/mol glicerol, sendo o maior rendimento obtido a pH 7 e com a menor concentração de glicerol (10 g.L⁻¹). *Enterobacter* e *Klebsiella* foram identificadas como as maiores produtoras de etanol.

Diante do que já foi discutido até aqui, pode-se dizer que o glicerol é um substrato interessante para obtenção de diversos produtos, especialmente em fermentação com cultura mista. Comparado a outros carboidratos como a glicose, o glicerol possui um grau de redução mais alto, podendo gerar compostos mais reduzidos, como etanol, butanol ou 1,3-PDO e menos ácidos graxos oxidados, como o acetato (TEMUDO *et al.*, 2008). Embora uma cultura mista envolva uma alta diversidade de micro-organismos, ocorre uma seleção dos micro-organismos capazes de adaptar-se às condições que lhe são impostas.

Portanto, se é preferível produzir etanol, deve-se evitar as condições que levam à produção de 1,3-PDO; nos estudos que foram citados, a limitação de glicerol é uma condição desfavorável à produção de 1,3-PDO e mais favorável ao etanol.

A influência do pH nos rendimentos depende do metabolismo das bactérias, sendo assim uma condição associada também à comunidade microbiana. Por exemplo, no metabolismo de clostrídios produtores de solventes, o pH exerce efeito sob as fases acidogênica e solventogênica. Durante a acidogênica, que ocorre na fase log de crescimento, a bactéria produz acetato, butirato e lactato, que diminuem o pH do meio de fermentação. Na fase estacionária de crescimento, ocorre a solventogênese, onde as células utilizam os ácidos acumulados para formar solventes como etanol e butanol, que elevam o pH do meio. Em fermentação descontínua sem controle de pH (pH inicial neutro), as células seguirão seu ciclo acidogênico-solventogênico; porém, se o pH inicial for alto, o tempo da fase lag diminui e a produção de solventes é favorecida (LENG *et al.*, 2019; YANG; HANNA; SUN, 2012).

3.1.3 Hidrogênio

Dentre os métodos de obtenção de H_2 utilizando glicerol bruto reportados na literatura, estão os que envolvem técnicas de reforma de vapor, reforma em fase aquosa e reforma auto térmica; tais processos utilizam de catalisadores que agem como agentes de redução da energia de ativação, favorecendo a cinética da reação de obtenção de H_2 a partir de glicerol (ANITHA; KAMARUDIN; KOFLI, 2016; MONTEIRO *et al.*, 2018).

Teoricamente, hidrogênio pode ser produzido pela fermentação anaeróbia de glicerol com rendimentos iguais ou superiores ao obtido por glicose, devido a similaridades da via metabólica, como a formação de um mesmo intermediário, o gliceraldeído-3-P (Figura 2) tanto por glicerol quanto por glicose. A partir deste intermediário podem ser formados hidrogênio e outros subprodutos da via oxidativa (SELEMBO *et al.*, 2009; TEMUDO *et al.*, 2008).

Considerando que apenas acetato é produzido pela fermentação de glicerol, 2 H_2 podem ser produzidos a partir de 2 NADH (liberados durante a oxidação de glicerol a piruvato) e 1 H_2 da conversão de piruvato a acetil-CoA ou formato, resultando em um total de 3 H_2 por glicerol consumido ou 1 H_2 por mol de carbono. No caso da fermentação de glicose, são formados 2 H_2 a partir de 2 NADH e 2 H_2 do piruvato, totalizando 0,67 mol de H_2 por mol de carbono (TEMUDO *et al.*, 2008).

Sendo assim, o rendimento teórico de H_2 é maior tendo glicerol como fonte de carbono. Entretanto, durante a fermentação de glicerol há a formação de 1,3-propanodiol, que consome 1 mol de H_2 para o balanço e recuperação de equivalentes redutores.

O que devemos considerar, no caso da fermentação de glicerol, é que o controle da produção de H_2 deve ser levado em conta, também para direcionar o processo à formação dos produtos desejados. Sabendo que a rota de 1,3-PDO é favorecida quando o H_2 gerado é consumido (não se acumula), pode-se aumentar o rendimento da reação de produção de 1,3-PDO.

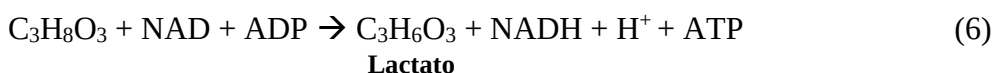
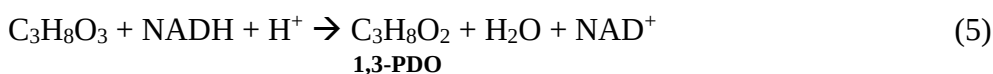
Sittijunda; Reungsang (2020) avaliaram a produção simultânea de H_2 , etanol e 1,3-PDO a partir da fermentação de glicerol puro e bruto em condições em reator UASB com diferentes cargas orgânicas (OLR) aplicadas ($25-75 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$). A variação de OLR impactou a produção de H_2 , o consumo de glicerol e as espécies dominantes no consórcio microbiano.

Com OLR maior que $62,5 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ houve diminuição no H_2 e no consumo de glicerol. Os autores atribuíram a um favorecimento da rota redutiva, elevando a produção de 1,3-PDO, onde H_2 não foi produzido, mas se consumiu NADH para produção de biomassa (crescimento), diminuindo a produção de H_2 . Com OLR de $50 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ e usando glicerol bruto, a rota redutiva foi favorecida, produzindo 1,3-PDO e ácido láctico como subproduto.

De acordo com as equações apresentadas pelos autores (Eq. 5-11), a produção de 1,3-PDO e ácido propiônico não contribuem para o aumento da produção de H_2 , o que também está de acordo com (TEMUDO *et al.*, 2008), conforme Tabela 1.

Efetivamente, o glicerol tem grandes possibilidades de ser utilizado como matéria-prima para a produção de diversos produtos de valor agregado além do 1,3-PDO, como bioetanol, hidrogênio e ácidos orgânicos. Entretanto, muito ainda há que ser estudado quanto à utilização do glicerol bruto, o metabolismo por culturas mistas e as condições operacionais e viabilidade econômica dos processos.

As equações (8) a (10) são as vias de produção de H_2 e a (11) representa uma via indireta de produção de H_2 .



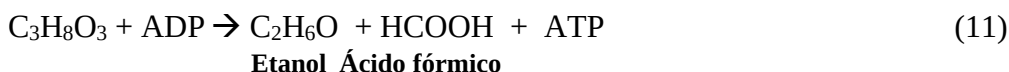
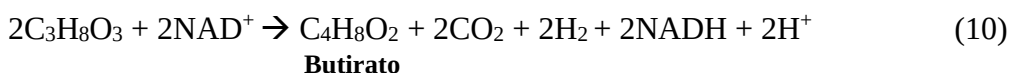
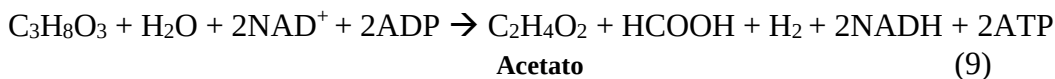


Tabela 1 - Rendimentos (Y) dos possíveis produtos da fermentação de glicerol (C3) e intermediários envolvidos na rota metabólica

Produto	$Y_{\text{prod/C3}}$	$Y_{\text{Ac-CoA/C3}}^1$	$Y_{\text{ATP/C3}}$
Acetato	1	1	2
Etanol	1	1	1
Butirato	0,5	1	1,5
Lactato	1	0	1
1,3-PDO	1	0	0

Fonte: adaptado de Temudo *et al.* (2008)

¹ Cada mol de acetyl-CoA (Ac-CoA) está associado com a formação de 1 mol de H₂ ou de formato.

2.3 BACTÉRIAS FERMENTADORAS DE GLICEROL E OS PRODUTOS OBTIDOS

A fermentação de glicerol é possível por meio da atividade de micro-organismos que são capazes de consumir esta fonte de carbono reduzida na ausência de um aceptor de elétrons externo. Dentre as espécies mais reportadas como fermentadoras de glicerol estão as pertencentes à família *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*) e aos gêneros *Clostridium* e *Lactobacillus*, e, em menor grau, *Bacillus*, *Propionibacterium* e *Anaerobiospirillum* (CLOMBURG; GONZALEZ, 2013; GARLAPATI *et al.*, 2016).

Fatores como a origem do substrato, as condições operacionais aplicadas e a complexidade do meio influenciam a atividade dessas bactérias, que podem ser mais ou menos sensíveis às alterações no meio. Muitos estudos têm reportado a obtenção de rendimentos

elevados de 1,3-PDO utilizando culturas puras, isoladas ou geneticamente modificadas de bactérias. Contudo, tais culturas apresentam requisitos específicos que tornam a fermentação mais onerosa.

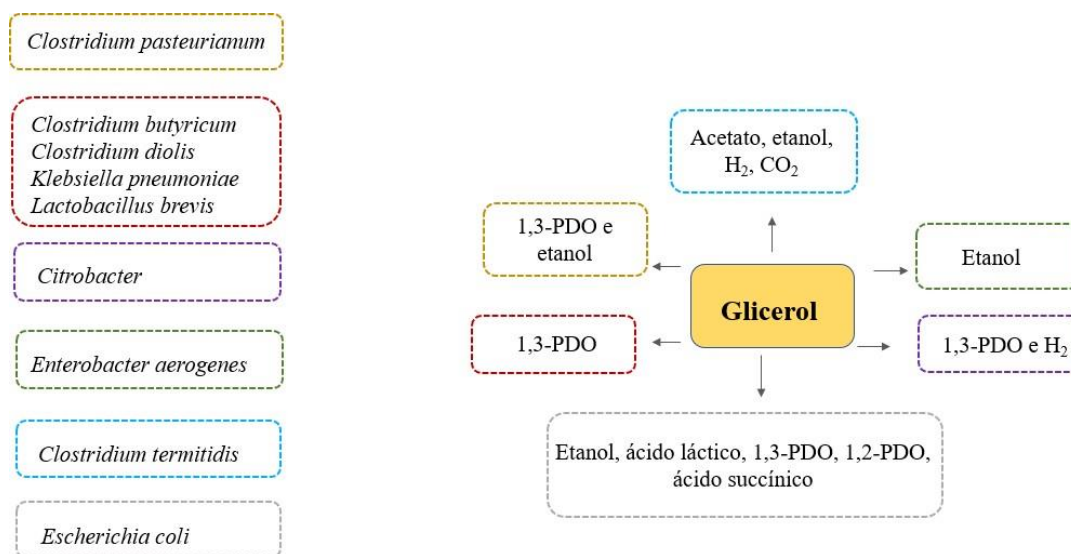
A fermentação do glicerol bruto pode ser favorecida pela utilização de culturas mistas, de composição complexa não definida, no processo, apesar de envolver desafios como a competição entre espécies e o controle das condições operacionais para o favorecimento de determinada rota metabólica. Apesar disso, são uma alternativa viável para a produção em grande escala, eliminando as exigências de esterilização e aplicação de meio complexo de nutrientes, requeridas pelas culturas puras. Ademais, nos processos em que se aplicam culturas mistas pode-se contar com a flexibilidade de uma comunidade diversa capaz de metabolizar substratos distintos (AGLER *et al.*, 2011).

Dentre as vantagens que as culturas mistas têm em relação a culturas puras, podem ser citadas: variedade de substratos utilizados, robustez, tolerância a substratos complexos, menos subprodutos, vasta adaptabilidade a distintas condições de pH, não necessitam de esterilização do meio e têm mais facilidade de aplicação industrial (ZHU *et al.*, 2021). Assim, são mais interessantes em escala real e adaptam-se a metabolizar o glicerol bruto, apesar de suas impurezas.

Estudos mais recentes têm focado na fermentação de glicerol a partir de culturas mistas, inclusive no intuito de utilizar o glicerol bruto como substrato (MOSCOVIZ; TRABLY; BERNET, 2016; SITTIJUNDA; REUNGSANG, 2020; VERAS *et al.*, 2019a).

O esquema apresentado na Figura 4 mostra uma correlação entre os produtos obtidos da fermentação de glicerol e os micro-organismos responsáveis de acordo com a literatura. Na Tabela 2 foram referenciados os rendimentos dos produtos obtidos e as bactérias relacionadas.

Os gêneros *Clostridium*, *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Lactobacillus* são os mais comumente relatados na literatura como fermentadores de glicerol. Portanto, discutiremos no Quadro 2 as condições que favorecem e/ou que impedem o crescimento desses micro-organismos, a fim de chegar a um entendimento sobre o que pode levar a que um gênero seja favorecido em relação a outro.

Figura 4 - Principais produtos gerados a partir do consumo de glicerol e os micro-organismos responsáveis

Fonte: GARRITY (2005); VOS *et al* (2011); KAUR *et al.* (2020)

Nota: os produtos e os micro-organismos que estão correlacionados possuem a mesma cor de linhas tracejadas.

Quadro 2 - Principais gêneros fermentadores de glicerol: descrição, metabolismo e condições ótimas

Gênero: <i>Clostridium</i>			
Descrição: geralmente são quimiorganotróficos e anaeróbios obrigatórios. Em geral, produzem ácidos orgânicos e álcoois. Crescimento mais rápido a pH 6,5-7,0 e temperaturas entre 30 e 37 °C.			
Espécie	Descrição (metabolismo)	Condições ótimas	Consumo de glicerol
<i>C. butyricum</i>	Convertem piruvato a acetato, butirato e, algumas vezes, a formato		+
<i>C. acetium</i>	Quimiolitotróficos; produzem ácido acético na presença de CO ₂ e H ₂	T: 25-37 °C pH: 7,5-9,5 (8,3 ótimo)	-
<i>C. diolis</i>	Converte glicerol a 1,3-PDO, além de butirato e acetato	T: 25-42 °C pH: 5,5-8,5 (7,0 ótimo)	+

<i>C. kluyveri</i>	Convertem etanol a butirato, caproato e H ₂ , na presença de CO ₂ ou carbonato e acetato ou propionato.	T: 19-37 °C (35 °C ótima)	n.d.
<i>C. mayombei</i>	Quimiolitotrófico facultativo; Acetato é o produto majoritário. Fermenta uma variedade de substratos, incluindo: glicerol, formato, piruvato e glicose.	T: 15-45 °C (33°C ótima) pH: 5,5-9,3 (7,3 ótimo)	+
<i>C. pasteurianum</i>	Convertem piruvato a acetato, CO ₂ , H ₂ e pequenas quantidades de butirato e ácido fórmico	T ótima: 37 °C, mas crescem bem a 30 °C pH=8,5 inibe o crescimento	+
<i>C. termiditis</i>	Fermenta uma variedade de substratos, incluindo glicerol; Produtos: acetato, etanol, H ₂ e CO ₂	T: 20-48 °C (37 ° ótima) pH: 5,0-8,2 (7,5 ótimo)	+

Gênero: *Klebsiella*

Descrição: *K. pneumoniae* é relatada como a espécie que possui tanto a enzima glicerol desidrogenase quanto 1,3-PDO desidrogenase, sendo capaz de produzir 1,3-PDO. Outras espécies não fermentam glicerol e possuem apenas a glicerol desidrogenase.

Espécie	Descrição (metabolismo)	Condições ótimas	Consumo de glicerol
<i>K. pneumoniae</i>	Podem fermentar glicerol sem um aceptor exógeno de hidrogênio, pela cooperação entre as rotas redutiva e	T: 30-35 °C	+

	oxidativa. 1,3-PDO é formado junto a ácido acético em uma razão 2:1		
Gênero: <i>Enterobacter</i> Descrição: anaeróbio facultativo, Temperatura ótima de crescimento: 30 °C			
Espécie	Descrição (metabolismo)	Condições ótimas	Consumo de glicerol
<i>E. aerogenes</i>	n.d.	n.d.	+
<i>E. agglomerans</i>	Quando <i>E. agglomerans</i> é cultivado anaerobicamente em glicerol, PDO é o produto majoritário; Acetato, etanol e formato também são produzidos em quantidades significativas.	n.d	+
Gênero: <i>Lactobacillus</i> Descrição: anaeróbio obrigatório; aerotolerante; metabolismo fermentativo. São majoritariamente homofermentadores, produzindo somente lactato, embora possa ocorrer o metabolismo heterofermentativo. Ao menos metade do produto final é lactato, que geralmente não é fermentado; produtos adicionais: acetato, etanol, CO ₂ , formato ou succinato. Temperatura de crescimento: 2-53 °C; T ótima: 30-40 °C; pH ótimo: 5,5-6,2. A taxa de crescimento é reduzida em pH neutro ou alcalino. Várias espécies formam polissacarídeos extracelulares (EPS). Em condições de limitação de hexose, é favorecida a heterofermentação, formando além do ácido láctico, ácido acético, etanol e ácido fórmico como principais produtos.			
Espécie	Descrição (metabolismo)	Condições	Consumo de

		ótimas	glicerol
<i>L. casei</i> <i>L. paracasei</i>	Homofermentativas e heterofermentativas (produtos: ácido láctico, CO ₂ , etanol e ácido acético)	n.d.	n.d.

Fonte: GARRITY (2005); VOS *et al* (2011)

n.d.: não descrito

A maioria das espécies de *Clostridium* é neutrófila. Embora algumas como *C. acidisoli*, *C. akagii* e *C. pasteurianum* são considerados tolerantes à acidez, a maioria das espécies não pode crescer abaixo de pH 6,2. No entanto, as células podem continuar a metabolizar e a diminuir ainda mais o pH, enquanto as suas enzimas extracelulares continuam a funcionar.

Em meio alcalino, vários podem crescer a valores de pH acima de 8,0, e até mesmo acima de 8,5 (por exemplo, *C. histolyticum*) embora o seu pH ótimo seja neutro (espécies alcalitolerantes). Muitas das espécies de *Clostridium sensu stricto* realizam fermentações mistas de ácido e álcool, produzido além de ácido butírico, concentrações variáveis de ácido acético, ácido láctico e/ou etanol, propanol ou butanol. Muitas cepas de *C. butyricum* produzem como principal álcool o propanodiol quando crescem em glicerol (WIEGEL *et al.*, 2006).

2.4 INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES OPERACIONAIS NA FERMENTAÇÃO DO GLICEROL

O controle dos parâmetros operacionais e o entendimento das rotas metabólicas são de grande importância nesse processo, uma vez que influenciam a distribuição dos produtos da fermentação tanto quanto os micro-organismos dominantes (VARRONE; SKIADAS; GAVALA, 2018).

A concentração de glicerol exerce influência sob a eficiência da conversão em 1,3-PDO. Alguns autores relataram a concentração ótima de 30 g.L⁻¹ e que concentrações acima desse valor levaram à diminuição da biossíntese de 1,3-PDO devido ao acúmulo de produtos como acetato e butirato. Algumas espécies de bactérias não são tolerantes ao glicerol bruto, sendo inibidas a concentrações elevadas (FOKUM *et al.*, 2021; SZYMANOWSKA-POWAŁOWSKA, 2015; WISCHRAL *et al.*, 2016).

A maioria dos estudos focados em condições de pH, TDH, carga orgânica e concentrações de substrato foi realizada em batelada (*batch mode*), com culturas puras, isoladas ou geneticamente modificadas (SUN *et al.*, 2019). Ainda há poucos trabalhos publicados com o uso de culturas mistas e em reatores contínuos para a fermentação do glicerol bruto (Tabela 2), principalmente devido a lacunas quanto ao estabelecimento das condições operacionais, uma vez que os resultados obtidos em batelada nem sempre são válidos para operação contínua. A determinação de tais condições é importante para uma possível aplicação em grande escala (KAUR *et al.*, 2020; VARRONE; SKIADAS; GAVALA, 2018).

Yang *et al.* (2018a) estudaram a otimização de fermentações de glicerol bruto, por uma cultura de *K. pneumoniae*, operando em bateladas alimentadas, aplicando estratégias operacionais como a variação do volume útil do reator, controle do pH e alimentação contínua. Os autores obtiveram um alto rendimento de 1,3-PDO (0,73 mol.mol gli⁻¹) e indicaram um excelente potencial para aplicação em escala real. Sittijunda; Reungsang, (2020) demonstraram que diferentes cargas orgânicas de glicerol influenciaram na obtenção de 1,3-PDO, etanol e hidrogênio e que a variação nas cargas também influenciou na dominância de espécies presentes no consórcio microbiano.

O pH também é um fator importante, que afeta o crescimento e o metabolismo microbiano. Atividades enzimáticas dependem fortemente do pH. Os ácidos orgânicos e outros subprodutos obtidos durante a fermentação podem diminuir o pH do meio a ponto de inibir o crescimento bacteriano e causar modificações nas rotas metabólicas, uma vez que culturas diferentes apresentam pHs ótimos distintos (ZHU *et al.*, 2021).

Outra estratégia operacional adotada é a imobilização de micro-organismos em biofilmes, normalmente utilizada para melhorar a obtenção de produtos de valor agregado. A imobilização pode ser dividida em adesão (*attachment*), aprisionamento (*entrapment*), contenção (*containment*) e agregação (*aggregation*).

Os trabalhos com produção de 1,3-PDO estão mais focados em adesão, onde as células aderem à superfície de um suporte sólido, por meio de ligações físicas e químicas; o material pode ser sólido, inerte e de baixo custo, como espumas de poliuretano, cerâmica, pedra-pomes ou vidro (ZHU *et al.*, 2021).

A formação de biofilme favorece a manutenção das espécies de crescimento lento de um consórcio microbiano. De acordo com Madigan *et al.* (2016), o processo de formação de um biofilme ocorre em estágios: (1) adesão reversível de células planctônicas (de vida livre),

(2) adesão irreversível das mesmas células, (3) crescimento celular e produção de polissacarídeo, (4) desenvolvimento que forma o biofilme maduro e quase impenetrável. A matriz espessa do biofilme forma uma barreira contra micro-organismos predadores e impede que as células bacterianas sejam deslocadas a um hábitat menos favorável.

Veras *et al.* (2019a) avaliaram a produção de 1,3-PDO com cultura mista aderida a mangueira de silicone dentro de um reator anaeróbio tipo UASB alimentado com glicerol puro e bruto, alcançando em média 0,5 mol 1,3-PDO.mol gli⁻¹, sendo o glicerol bruto favorável a uma maior biodiversidade, pois além da espécie *Clostridium*, *Lactobacillus* e *Klebsiella* também participaram da fermentação.

Outra condição é a composição gasosa, que também pode influenciar as reações das rotas oxidativa e redutiva da degradação anaeróbia de glicerol. A pressão parcial do hidrogênio (H₂), que é produzido e consumido durante as reações, pode direcionar as reações e permitir a obtenção dos produtos desejados (ARSLAN *et al.*, 2016).

Tabela 2 - Resumo de trabalhos publicados com rendimentos dos produtos e condições operacionais, tipo de cultura microbiana e tipo de substrato

Cultura	Micro-organismo relacionado	Produto	mol/mol	Operação	Substrato	Ref.
M		1,3-PD	0,54		PG	
	<i>C. pausterianum</i>	1,3-PD	0,48	C	CG	
	<i>C. beijerinckii</i>					Veras <i>et al.</i> (2019)
	<i>K. pneumoniae</i>					
	<i>Lactobacillus</i> spp.					
P	<i>K. pneumoniae</i>	1,3-PD	0,77	B	PG	Yang <i>et al.</i> (2017)
	ATCC 8724		0,65	B	CG	
P	<i>E. coli</i> JA11	1,3-PD	0,64	B	PG	Yang <i>et al.</i> (2018b)
P	<i>K. pneumoniae</i>	1,3-PD	0,35	FB	CG	Yang <i>et al.</i> (2018)
	ATCC 8724		0,47	FB	CG	
M	<i>Clostridium</i> sp.	1,3-PD	0,60	C	CG	Varrone <i>et al.</i> (2017)
M	<i>E. limosum</i>	1,3-PD	0,31	SC	PG + acetato	Leng <i>et al.</i> (2019)
	<i>P. acetatigenes</i>	Butirato	0,10			
	<i>Actinomyces</i> sp.					
	MD1					
	<i>A. caccae</i>					
M	<i>K. pneumoniae</i>	1,3-PD	0,60	B	PG + EtOH + acetato	Leng <i>et al.</i> (2019)
	<i>C. kluyveri</i>	Caproato	0,50			

	<i>M. elsdenii</i>	Butirato	0,45-0,56			
M	<i>M. senegalense</i> <i>E. limosum</i> <i>C. kluyveri</i>	1,3-PD Caproato	0,32 -	SC	PG + EtOH + acetato	Leng <i>et al.</i> (2019)
M	<i>Clostridium</i> <i>M. elsedenii</i>	Valerato	0,12	C	CG + EtOH	Veras <i>et al.</i> (2019b)
P	<i>C. beijerinckii</i> CCIC 22954	1,3-PDO	0,58 0,94	B	PG PG+glicose	Fokum <i>et al.</i> (2021)
P	<i>C. butyricum</i> JKT37	1,3-PDO	0,60	B	PG CG	Tee <i>et al.</i> (2017)
P	<i>C. perfringens</i> GYL (isolada)	1,3-PDO	0,63 0,68 0,58	B FB B	PG CG CG	Guo <i>et al.</i> (2017)

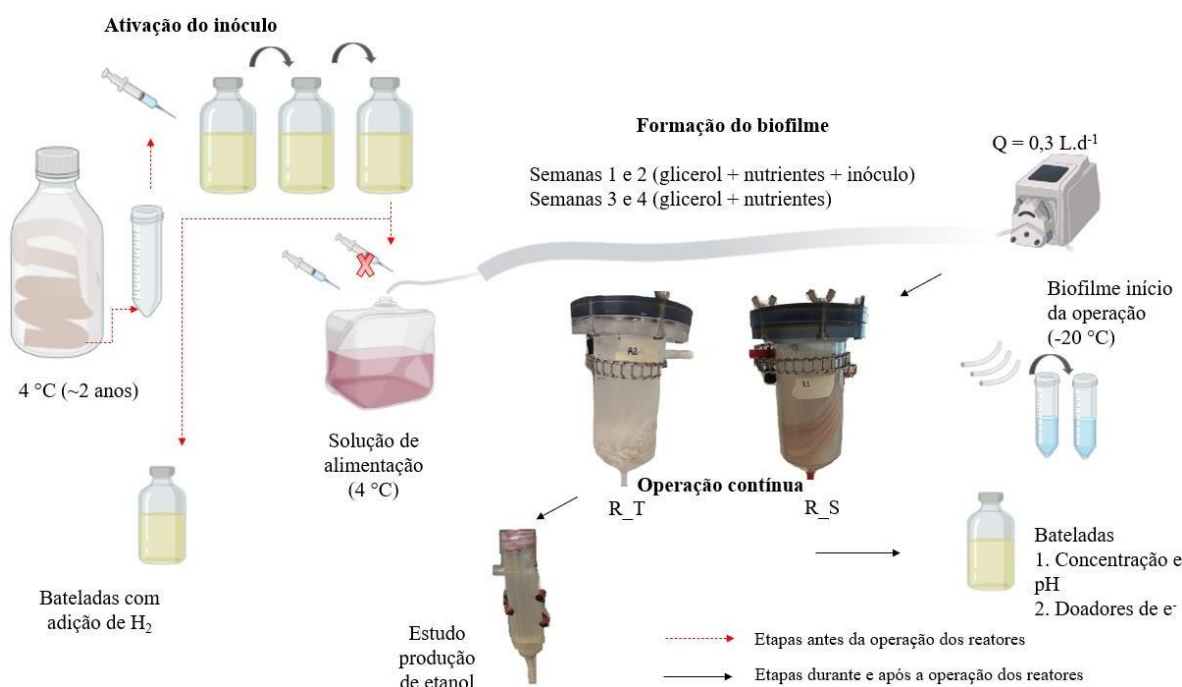
M: cultura mista; P: cultura pura; FB: batelada alimentada; TS: fermentação em dois estágios; SC: semi-contínua; C: contínua; B: batelada; PG: glicerol puro; CG: glicerol bruto. *A. caccae*: *Anaerostipes caccae*; *M. elsdenii*: *Megasphaera elsdenii*; *M. senegalense*: *Massilibacterium senegalense*; *E. limosum*: *Eubacterium limosum*; *P. acetatigenes*: *Proteiniphilum acetatigenes*; *C. beijerinckii*: *Clostridium beijerinckii*; *C. perfringens*: *Clostridium perfringens*.

Nota: Entenda-se por cultura mista (M), trabalhos em que se utilizaram culturas complexas; os micro-organismos relacionados (segunda coluna) foram os detectados por sequenciamento das bactérias que foram relacionados aos produtos mencionados (terceira coluna).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Departamento de Biologia Molecular da Universidade Autónoma de Madrid (UAM) e serão apresentados seguindo a ordem cronológica de execução de cada atividade. Os experimentos desenvolvidos que serão descritos em cada subitem desta seção estão resumidos na Figura 5.

Figura 5 - Resumo das etapas experimentais realizadas antes e após o início da operação dos reatores contínuos



Fonte: A autora (2023)

3.1 ATIVAÇÃO DO CONSÓRCIO MICROBIANO

Inicialmente foi realizada a ativação de um consórcio de bactérias proveniente de um reator UASB adaptado à fermentação de glicerol nos estudos de Veras (2019), que foi mantido a 4 °C por cerca de dois anos em uma garrafa de 1,0 L contendo meio de nutrientes e glicerol bruto, sem adição de nova alimentação.

Para a ativação, preparou-se um meio de cultivo contendo macronutrientes (em g.L^{-1}): 3,4 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$; 1,3 KH_2PO_4 ; 1,6 NH_4Cl ; 0,2 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,02 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,005 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (adaptado de Varrone *et al.*, 2013); micronutrientes (em mg.L^{-1}): 2,0 $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0,05 ZnCl_2 ; 0,50 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0,142 $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,05 H_3BO_3 ; 0,038

$\text{CuCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 2,0 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,09 $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,05 $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 1,0 EDTA; 0,20 resazurina (Florencio *et al.*, 1993), além disso, adicionou-se glicerol puro (97%, VWR Chemicals BDH Pro Lab®, Belgium) a uma concentração de 10 g.L^{-1} .

Frascos de vidro de 250 mL foram autoclavados contendo 200 mL de meio, selados e purgados com uma mistura de $\text{N}_2:\text{CO}_2$ (80:20) para manter as condições anaeróbias (Figura 6). Após a purga, 1 mL de sulfeto de sódio ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, 100 g.L^{-1}) por litro de solução foi adicionado para a remoção do oxigênio dissolvido. Então, os frascos foram inoculados com a cultura mista a 1% (v/v) e mantidos em ambiente climatizado a 30°C .

Após o consumo total de glicerol, foram realizadas transferências consecutivas para novos frascos contendo meio fresco, até obter rendimentos satisfatórios de 1,3-PDO, o principal produto de interesse. Com o inóculo ativo da última transferência realizada, foi iniciado o procedimento de formação de biofilme em mangueiras (descrito no item 3.2) que foram utilizadas como meio suporte para os reatores contínuos.

Figura 6 - Frascos anaeróbios utilizados nas transferências para ativação do inóculo



Fonte: A autora (2023)

3.2 FORMAÇÃO DO BIOFILME PARA OS REATORES CONTÍNUOS

Antes do início da operação dos reatores anaeróbios contínuos, foi realizado o procedimento de formação de biofilme em mangueiras de silicone, que seriam os meios suportes para os inóculos dos reatores.

Para isto, três mangueiras de silicone (Carl Roth®, Germany) com diferentes diâmetros internos e comprimentos foram alimentadas por uma solução contendo nutrientes com a mesma composição dos testes iniciais de reativação do inóculo em batelada citada no subitem 3.1. Além dos nutrientes minerais, a solução de alimentação continha glicerol puro a diferentes concentrações (30 g.L^{-1} nas primeiras semanas e 15 g.L^{-1} nas duas últimas semanas). O pH do

meio foi 7, sem adição de reagentes para a correção.

A solução de alimentação foi bombeada (bomba peristáltica Gilson, modelo Minipuls 3) ao interior das mangueiras a uma vazão de $0,3 \text{ L.d}^{-1}$ durante quatro semanas. Nas duas primeiras semanas, a solução de alimentação foi inoculada com a cultura mista (2% v/v) da última transferência de ativação da biomassa. A partir da terceira semana não houve adição de inóculo, para confirmar que a biomassa aderida correspondia às bactérias consumidoras de glicerol.

A solução de alimentação foi mantida refrigerada (4°C) e as mangueiras foram dispostas em bancadas, conforme mostrado na Figura 7, em ambiente climatizado a 30°C . Para o monitoramento do consumo de glicerol e da produção de metabólitos, diariamente foram coletadas amostras na saída das mangueiras para análise por cromatografia líquida conforme procedimento descrito no item 3.6. As vazões diárias foram calculadas por meio da pesagem diária do líquido armazenado no reservatório de efluente.

Figura 7 - Sistema experimental de alimentação das mangueiras para crescimento do biofilme



Fonte: A autora (2023)

Uma vez concluída esta fase de crescimento do biofilme no interior das mangueiras, estas foram introduzidas nos reatores anaeróbios contínuos, conforme descrito no item 3.4.

3.3 EXPERIMENTOS EM BATELADA: INFLUÊNCIA DAS RELAÇÕES GLICEROL:H₂, VOLUME GASOSO E CONCENTRAÇÃO DE GLICEROL NOS RENDIMENTOS DE 1,3-PDO E SUBPRODUTOS

Em estudos anteriores realizados por Veras (2019) levantou-se a hipótese de que a pressão parcial exercida pelo gás hidrogênio (H₂) produzido pela fermentação anaeróbia do glicerol em reator UASB com biomassa aderida a um meio de suporte tenha favorecido o aumento do rendimento de 1,3-PDO.

Para avaliar a influência da pressão e concentração de H₂ no volume gasoso (*headspace*) dos reatores sobre os grupos de micro-organismos e estabelecer uma relação com os produtos formados na fermentação de glicerol, foram realizados testes em batelada com duração entre 3 e 6 dias. Para isto, frascos sorológicos de 108 mL (Figura 8) contendo macro e micronutrientes (seção 3.1) e glicerol puro foram selados com septos de butila e tampas de alumínio, autoclavados (120 °C, por 20 min) e purgados com uma mistura de N₂:CO₂ (80:20). Além disso, adicionou-se 1 mL.L⁻¹ de sulfeto de sódio (Na₂S.9H₂O, 100 g.L⁻¹) para remoção do oxigênio dissolvido.

Finalmente, os reatores foram inoculados, utilizando uma seringa estéril, com 3% (v/v) da suspensão do frasco da última transferência realizada na fase de reativação do inóculo. Os testes foram realizados em triplicata e os reatores foram mantidos à temperatura de 30 °C.

O volume de gás H₂ 99,999% (Scientific & Technical gases, U.K.) foi adicionado às garrafas utilizando seringa de vidro fechadura hermética (*gas tight*), antes da adição do inóculo, e foi variado (10% e 5%) para atender às relações molares apresentadas na Tabela 3. A relação molar glicerol:H₂ de 1:1, considerando o balanço redox, é considerada a relação teórica ideal para a produção de 1,3-PDO; porém outras relações também foram testadas.

Tabela 3 - Condições dos testes em batelada para avaliar duas concentrações iniciais de gás hidrogênio mantendo glicerol constante e mesmo volume de *headspace*

	Headspace (%)	Meio líquido (%)	H₂ (%)	Gli/H₂ (mol.mol⁻¹)
80_10	80	20	10	0,5
80_5	80	20	5	1,0
Controle	80	20	0	-

Fonte: A autora (2023)

Após a conclusão das bateladas iniciais mantendo o volume gasoso (*headspace*) de 80%, novos testes foram realizados aplicando a mesma composição de meio e o mesmo procedimento descrito para manter os frascos anaeróbios, porém variando o volume gasoso e as concentrações de glicerol, conforme apresentado na Tabela 4. Adicionalmente, nessa batelada foi medida a pressão de gás (mbar), bem como as concentrações de H₂ durante os testes.

Tabela 4 - Condições iniciais dos testes em batelada variando o volume de *headspace* e a concentração de glicerol

Headspace (%)	Meio (%)	H₂ (%)¹	Glicerol (g.L⁻¹)	Gli/H₂ (mol.mol⁻¹)
90	10	10	0,5	0,14
90	10	10	1,0	0,27
90	10	0	1,0	
90	10	0	0,5	
80	20	10	1,0	0,6
80	20	5	1,0	1,2
80	20	0	1,0	

¹ Concentração (% v/v) de H₂ adicionado em relação ao volume de *headspace*.

Fonte: A autora (2023)

Figura 8 - Experimentos em batelada variando a concentração de H₂ e glicerol



Fonte: A autora (2023)

Para avaliar o consumo de glicerol e os produtos obtidos, diariamente coletou-se 0,3 mL de líquido e analisou-se as concentrações de glicerol e metabólitos por cromatografia líquida, conforme descrito na seção 3.6.

Por fim, para avaliar a influência da concentração inicial de glicerol foram inoculados frascos sorológicos de 108 mL mantendo o volume gasoso (*headspace*) constante (50%) e sem adição de H_2 , nem de alcalinidade. Foi aplicada a mesma composição do meio de minerais e glicerol. Os frascos foram selados e purgados, conforme descrito acima. Foram analisadas três concentrações de glicerol puro: 0,05, 0,25 e 0,48 mol.L⁻¹.

As concentrações de glicerol e dos metabólitos na fase líquida foram analisadas por cromatografia líquida, conforme descrito na seção 3.6.

3.4 OPERAÇÃO DOS REATORES ANAERÓBIOS CONTÍNUOS COM MEIO SUPORTE

Inicialmente, foram montados dois reatores anaeróbios idênticos, de material acrílico, com volume total de 900 mL. Os reatores divergiram apenas quanto à disposição dos meios suporte (Figura 9). Ambos os reatores foram operados com fluxo ascendente.

Após a formação de biofilme, a mangueira (M3) de maior diâmetro interno (0,5 cm) e comprimento de 286 cm foi conectada em formato espiral à parte interna da entrada do reator (R_S, Figura 9) com uma conexão em Y, de forma que parte da alimentação entrava diretamente à parte interna da mangueira e outra parte ao seu exterior.

As mangueiras de menores diâmetros internos (M1 0,4 cm e M2 0,3 cm), contendo o biofilme aderido, foram cortadas em pedaços de 2 cm e soltas no interior do reator preenchendo um pouco menos da metade do volume (R_T, Figura 9).

Volumes das mangueiras: M1= 22 mL, M2 = 35 mL e M3 = 56 mL.

Figura 9 - Reatores R_S e R_T contendo os meios suportes com biofilme aderido



R_S DIA 0



R_T DIA 0

Fonte: A autora (2023)

A solução de alimentação para cada reator foi mantida em refrigeração (4 °C) e bombeada por meio de bombas peristálticas (Gilson, modelo Minipuls 3). O volume de gás produzido foi medido por sistema de deslocamento de líquido (Figuras 10 e 11). Em todas as fases experimentais foram monitoradas, diariamente, as condições de vazão afluente e efluente, gli-LR, TDH, pH de entrada e saída e os metabólitos formados na fase líquida.

Figura 10 - Sistema experimental do reator R_S



Fonte: A autora (2023)

Figura 11 - Sistema experimental do reator R_T



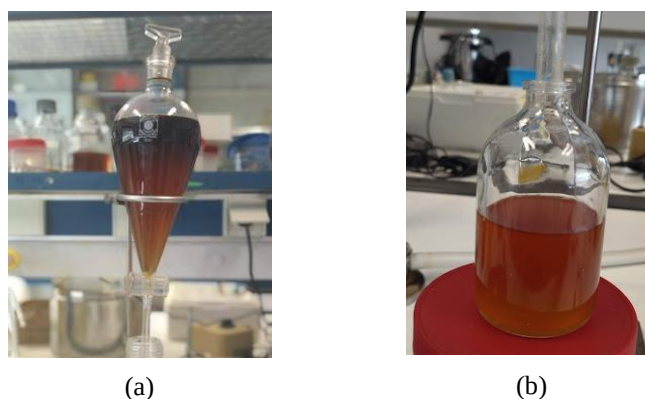
Fonte: A autora (2023)

Em seus primeiros dias, os reatores foram operados com as mesmas condições de pH afluente, nutrientes e substrato (glicerol puro). Inicialmente aplicou-se carga orgânica volumétrica de glicerol (gli-LR) de 5 a 10 g.L⁻¹.d⁻¹, que foi sendo alterada à medida que se alcançava uma estabilidade na eficiência de consumo de glicerol e rendimentos de 1,3-PDO.

Em uma segunda fase operacional, o reator R_S foi escolhido para a fermentação de glicerol bruto por ter apresentado melhores rendimentos de 1,3-PDO para o glicerol puro e por suportar maior carga orgânica. Já o R_T, em sua última fase de operação teve suas condições direcionadas ao estudo dos rendimentos de etanol, além do 1,3-PDO. As fases operacionais e suas respectivas condições estão apresentadas nas seções 5 (R_T) e 6 (R_S).

O glicerol puro utilizado foi o mesmo já mencionado. O glicerol bruto foi fornecido pelo grupo Beta Renewable, indústria de biodiesel localizada em Alicante (Espanha) e foi acidificado com HCl (Hu *et al.*, 2012) para remoção da gordura residual por meio de separação de fases (Figura 12), conforme descrito por Veras (2019), antes de ser adicionado à solução de alimentação do reator. A composição de metais no glicerol bruto, após acidificação e separação, foi analisada usando um espectrômetro de emissão óptica por plasma acoplado indutivamente (ICP-OES, Modelo 5100, Agilent Technologies, EUA), com adaptação do método proposto por Silva *et al.* (2020).

Figura 12 - Separação de fases para remoção de gorduras do glicerol bruto (a); Glicerol utilizado no reator (b)



Fonte: A autora (2023)

3.5 EXPERIMENTOS EM BATELADA: INFLUÊNCIAS DA CONCENTRAÇÃO DE GLICEROL, pH INICIAL E SUBSTRATO NA FERMENTAÇÃO

Ao final da operação dos reatores contínuos (R_T e R_S), foram realizadas bateladas em frascos sorológicos de 108 mL, contendo 50 mL de meio de nutrientes e glicerol (bruto ou puro), a fim de avaliar o comportamento de cada população microbiana desenvolvida em seus respectivos reatores, analisando a influência das condições: concentração, pH e substrato (glicerol puro ou bruto) nos rendimentos dos produtos obtidos pela fermentação.

Para isso, planejou-se variar as concentrações de glicerol (10, 30 e 40 g.L⁻¹), meio de cultivo sem e com adição de NaHCO₃ (0,5 g.gDQO⁻¹) a fim de comparar o pH inicial neutro e alcalino (8,0-8,3). Além disso, variou-se o substrato de acordo com a origem do inóculo, de modo que os frascos inoculados com biomassa do reator adaptado a glicerol bruto (R_S) foram alimentados com esse substrato, enquanto os frascos inoculados com biomassa do R_T, com glicerol puro. Os reais valores dos testes de batelada se encontram na Tabela 5.

Tabela 5 - Condições das bateladas de variação da concentração de glicerol puro e bruto e pH

Glicerol puro					
Glicerol (g.L ⁻¹) ¹	Glicerol (mol.L ⁻¹) ¹	Glicerol (mol.L ⁻¹) ²	pH ³	Glicerol (mol.L ⁻¹) ²	pH ⁴
10	0,109	0,090±0,001	7	0,103±0,005	8,18
30	0,326	0,312±0,003	7	0,343±0,001	8,27
40	0,435	0,401±0,001	7	0,418±0,001	8,25
Glicerol bruto					
10	0,109	0,092±0,005	7	0,096±0,003	7,92
30	0,326	0,322±0,015	7	0,308±0,002	8,14
40	0,435	0,430±0,008	7	0,408±0,001	8,15

Fonte: A autora (2023)

¹ Concentração teórica de glicerol

² Concentração real de glicerol no meio, medida por HPLC (valores médios das duplicatas)

³ pH do meio sem adição de NaHCO₃

⁴ pH do meio com adição de NaHCO₃ (0,5 g.gDQO⁻¹)

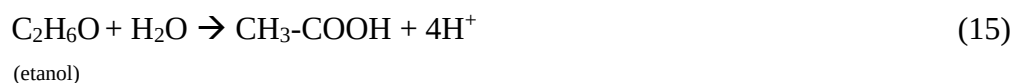
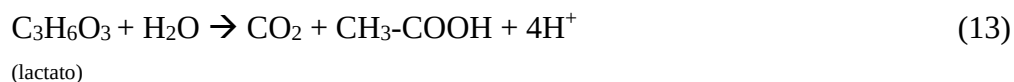
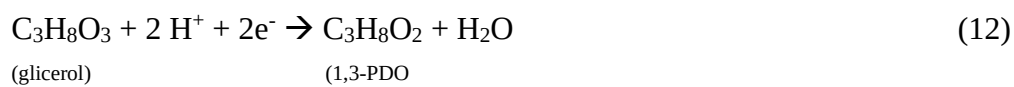
Os testes foram realizados em duplicatas de frascos sorológicos de 108 mL de volume total. Os frascos foram selados com septos de butila e tampas de alumínio, purgados com N₂ puro por 2 min e adicionou-se L-cisteína (0,5 g.L⁻¹). Após inocular com a cultura mista do reator contínuo (3% v/v), foram mantidos sob agitação a 120 rpm em ambiente climatizado à temperatura de 30 °C.

As concentrações de glicerol e metabólitos produzidos foram analisadas diariamente, por HPLC, assim como a concentração de H₂ produzido, por cromatografia gasosa, conforme descrito em 3.7.

3.6 EXPERIMENTOS EM BATELADA: INFLUÊNCIA DE DOADORES DE ELÉTRONS (LACTATO, METANOL, ETANOL E H₂) NO RENDIMENTO DE 1,3-PDO

Um último experimento em batelada foi realizado adicionando ácido láctico, metanol, etanol e H₂ como doadores de elétrons para avaliar se seria possível melhorar os rendimentos de 1,3-PDO. Para esses testes, adicionou-se cada doador ao meio contendo glicerol puro a 10 g.L⁻¹, macro e micronutrientes (descrita em 3.1) a pH neutro (com adição de NaOH para correção apenas nos testes com ácido láctico).

As quantidades de doador de elétrons foram calculadas considerando que 1 mol de H₂ será consumido para produzir cada mol de 1,3-PDO, e que 1 mol de ácido láctico, metanol ou etanol libera suficiente poder redutor (2 H₂) como para reduzir 2 moles de glicerol (Eq. 12-15).



Os testes com os doadores lactato, metanol e etanol foram realizados em frascos sorológicos de 108 mL, contendo 50 mL de solução de nutrientes e glicerol; enquanto os testes com H₂ foram realizados em garrafas de 1 L contendo 50 mL da solução; toda a atmosfera dos frascos de 1L foi preenchida com gás H₂ puro (Nippon gases) até a saturação. Antes de inocular, todos os frascos foram selados com septo de butila e tampa de alumínio e forneceram-se as condições de anaerobiose por adição de L-cisteína (0,5 g.L⁻¹) e purga com N₂. Utilizou-se como inóculo 3% (v/v) da suspensão de uma das garrafas do experimento descrito na seção 3.4, que estava mais ativa e apresentou rendimento de 1,3-PDO elevado (0,51 mol.mol-gli⁻¹).

3.7 MÉTODOS ANALÍTICOS

Para o monitoramento da eficiência de consumo de glicerol e produção de metabólitos, foram realizadas coletas diárias dos frascos anaeróbios, utilizando seringa estéril, na fase de ativação do inóculo e nos experimentos em batelada, assim como no período de formação de biofilme nas mangueiras, e durante os 362 dias de operação dos reatores contínuos.

As amostras eram coletadas em tubos eppendorf de 1,5 mL e, após a centrifugação a 14.000 rpm por 10 min, diluídas 10x. As concentrações de glicerol e dos metabólitos na fase líquida foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC1200 Infinity Series, Agilent Technologies, EUA), equipado com detector de índice de refração (RID) e coluna MetaCarb 67H 300 x 6,5 mm (Agilent Technologies, EUA). As condições aplicadas foram: temperaturas da coluna e detector 40 °C, fase móvel H₂SO₄ 0,01 N, fluxo 0,65 mL.min⁻¹ e volume de injeção de 20 µL.

A concentração de gases (H₂ e CO₂) foi analisada em cromatógrafo gasoso (Bruker Varian 450–GC, Scientific Instruments) com detector de condutividade térmica (TCD), cujas condições aplicadas foram: temperatura de 50 °C (forno), 150 °C (injetor) e 200 °C (detector), nitrogênio como fase móvel, fluxo 10 mL.min⁻¹ e volume de injeção de 50 µL.

Ademais, durante todas as fases experimentais dos sistemas contínuos foram monitoradas, diariamente, as condições de vazão afluente e efluente, carga orgânica volumétrica (COV), tempo de detenção hidráulica (TDH), assim como o pH de entrada e saída. Os rendimentos dos metabólitos foram calculados em termos de mol de produto gerado por mol de glicerol consumido (mol.mol-gli⁻¹), conforme a equação (16) e a produtividade volumétrica de 1,3-PDO foi calculada pela razão entre a concentração do produto e o TDH, como equação (17).

$$\text{Rendimento (mol.mol-gli}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Taxa de produção do metabólito (mol.d}^{-1}\text{)}}{\text{Glicerol consumido (mol.d}^{-1}\text{)}} \quad (16)$$

$$\text{Produtividade 1,3-PDO (g. L}^{-1}\text{. d}^{-1}\text{)} = \frac{\text{1,3-PDO efluente (g.L}^{-1}\text{)}}{\text{TDH (d)}} \quad (17)$$

3.8 ANÁLISE DA COMUNIDADE MICROBIANA

Ao final da operação dos reatores contínuos R_T e R_S, realizou-se a extração de DNA e sequenciamento massivo de amostras do inóculo das mangueiras de cada reator e das biomassas coletadas no último dia operacional. Além disso, para o reator R_S também foram extraídos DNA de amostras coletadas ao realizar a troca de alimentação com glicerol puro a bruto, a fim de verificar como os micro-organismos reagiriam à troca de substrato e as possíveis modificações ocorridas nos grupos dominantes. A nomenclatura utilizada encontra-se na Tabela 6.

As amostras coletadas foram armazenadas a -20 °C. Para a extração do DNA, utilizou-se o kit FastDNA SPIN para o solo e o instrumento FastPrep® (MP Biomedicals, EUA). As concentrações de DNA foram medidas em Fluorômetro Invitrogen Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific, EUA).

Após a extração, as amostras seguiram para o sequenciamento massivo e análise filogenética. Os *primers* utilizados para o sequenciamento foram 341F/806R e analisou-se em MySeq V3 (2 X 300 pb) platform (Illumina, San Diego, EUA) pela FISABIO Sequencing and Bioinformatics Service (Valencia, Espanha). A análise filogenética foi realizada utilizando o software Mothur v.1.47.0.

O processamento das sequências foi realizado utilizando o pacote Mothur v.1.47.0 (www.mothur.org; Schloss *et al.*, 2009). Quaisquer sequências com baixa qualidade, isto é, Phred < 25, foram removidas. Os ruídos foram removidos pela ferramenta Pre.cluster do pacote Mothur e as quimeras introduzidas no processo de PCR foram detectadas e removidas usando ChimeraUquime.

As sequências qualificadas foram agrupadas em unidades taxonômicas operacionais (OTUs) definidas por um nível de distância de 3% com base na matriz de distância e um *bootstrap* superior a 60%. A classificação taxonômica foi realizada usando o banco de dados de genes SILVA 16S rRNA, usando um consenso de *k-nearest neighbors* (vizinhos mais próximos e abordagem de Wang). Valores de confiança inferiores a 80%, em nível de filo, foram considerados “não classificados” de acordo com Wang *et al.* (2007). Análises estatísticas e gráficas foram realizadas com o pacote Vegan (OKASANEN *et al.*, 2010) para o programa R (<http://www.R-project.org/>).

Tabela 6 - Amostras de biomassa coletadas dos reatores para extração de DNA e análise filogenética

Reator	Amostra	Nomenclatura
R_T	Biofilme inicialmente aderido às mangueiras	I
	Biofilme aderido ao final da operação do reator	F
R_S	Biofilme inicialmente aderido à mangueira	S1
	Biofilme aderido à mangueira ao final da alimentação com glicerol puro	S2
	Biomassa em suspensão ao final da alimentação com glicerol puro	S3
	Biofilme aderido à mangueira ao final da operação do reator	S4
	Biomassa em suspensão ao final da alimentação com glicerol bruto	S5
	Biomassa sedimentada ao final da alimentação com glicerol bruto	S6

Fonte: A autora (2023)

4 ATIVAÇÃO DO INÓCULO, TESTES EM BATELADAS E CRESCIMENTO DO BIOFILME DOS REATORES

Nesta seção serão apresentados e discutidos os resultados dos experimentos desenvolvidos em batelada, antes e após a operação dos reatores contínuos, assim como da fase de formação do biofilme nos meios suporte utilizados nos reatores. Tais estudos foram muito relevantes para o entendimento da atividade microbiana da cultura mista utilizada.

4.1 RESULTADOS E DISCUSSÃO

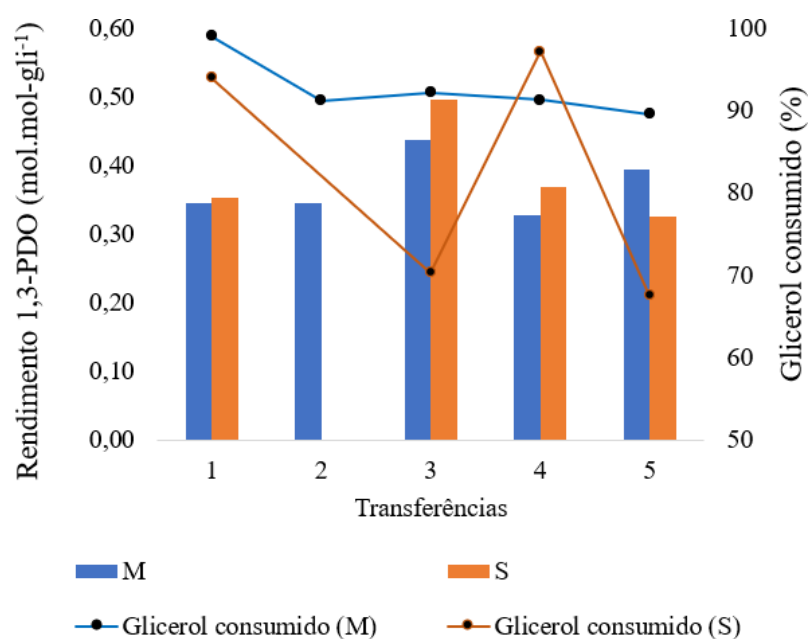
A princípio, conforme descrito na seção de materiais e métodos, avaliou-se a evolução do consumo de glicerol e produção de 1,3-propanodiol durante a reativação da cultura mista de bactérias, utilizada como inóculo para os testes em batelada, proveniente de um reator anaeróbio adaptado à fermentação de glicerol e mantido a 4 °C por dois anos. Em seguida, foram realizados os experimentos em bateladas e a formação do biofilme nas mangueiras para os reatores. A seguir serão apresentados os resultados obtidos.

4.1.1 Ativação do inóculo e rendimentos de 1,3-PDO

Na Figura 13 são apresentados os resultados comparativos entre os rendimentos dos dois inóculos estudados: M (biomassa aderida à mangueira utilizada como meio suporte no reator anaeróbio) e S (biomassa em suspensão no reator anaeróbio). Ainda que o inóculo S tenha apresentado maior consumo de glicerol, o inóculo M foi o escolhido por seus melhores rendimentos de 1,3-PDO e estabilidade no consumo de glicerol (> 90%) ao longo das transferências realizadas.

Para ativar o inóculo M foram realizadas sete novas transferências (Figura 14), até que os rendimentos de 1,3-PDO fossem maiores que 0,50 mol.mol-gli⁻¹ e o consumo de glicerol maior que 90%. Com exceção da transferência 3, todas foram realizadas sem adicionar alcalinidade ao meio. Com a adição de bicarbonato de sódio na terceira transferência, o pH inicial foi próximo a 9,0, houve redução no rendimento de 1,3-PDO (0,21 mol.mol-gli⁻¹) e aumento no rendimento de etanol (0,36 mol.mol-gli⁻¹). Por isso, para manter o 1,3-PDO como produto majoritário da fermentação, decidiu-se prosseguir os demais experimentos sem adicionar alcalinidade.

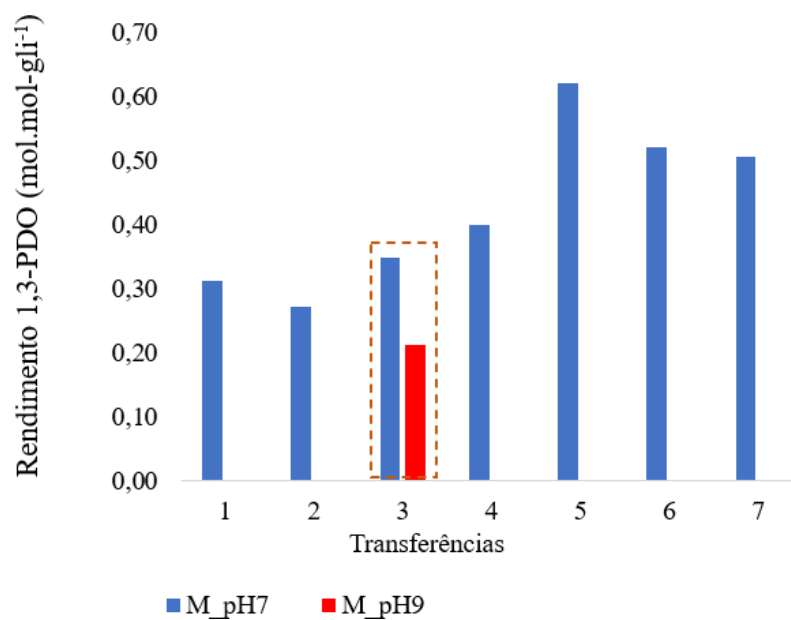
Figura 13 - Rendimentos de 1,3-PDO e glicerol consumido em cada transferência dos inóculos M e S



Nota: Não houve atividade do inóculo S na transferência 2, possivelmente devido à entrada de oxigênio no sistema.

Fonte: A autora (2023)

Figura 14 - Evolução dos rendimentos de 1,3-PDO nas transferências do inóculo M



Fonte: A autora (2023)

4.1.2 Crescimento do biofilme nos suportes para os reatores anaeróbios

Para a formação dos biofilmes das mangueiras utilizadas como meio suporte para reter a biomassa dentro dos reatores, utilizou-se o inóculo proveniente da última transferência realizada, cujo rendimento de 1,3-PDO foi de 0,50 mol.mol-gli⁻¹. Na primeira semana de alimentação das mangueiras M1 (Øi =0,4 cm), M2 (Øi =0,3 cm) e M3 (Øi =0,5 cm) não houve consumo de glicerol.

A partir da segunda semana de alimentação iniciou-se o consumo de glicerol e a produção de 1,3-PDO. Os rendimentos médios foram de 0,28 (M1 e M2) e 0,41 mol.mol-gli⁻¹ (M3), ainda com adição do inóculo a cada nova alimentação. Na última semana, foi retirado o inóculo da alimentação e reduziu-se a concentração de glicerol à metade (de 30 a 15 g.L⁻¹). Os consumos de glicerol e os rendimentos de 1,3-PDO aumentaram: 0,34, 0,31 e 0,40 mol.mol⁻¹ gli (M1, M2 e M3, respectivamente). Os demais subprodutos obtidos foram etanol (em média 0,1 mol.mol-gli⁻¹) e ácido acético a rendimentos inferiores a 0,1.

Nesta fase experimental não se adicionaram reagentes para manter a alcalinidade. O pH afluente era, em média, 7,0 e o efluente esteve ao redor de 5,0, o que provavelmente limitou o consumo total de glicerol a 69% (M1), 58% (M2) e 50% (M3).

De acordo com Madigan *et al.* (2016), o processo de formação de um biofilme ocorre em quatro estágios: (1) adesão reversível de células planctônicas (de vida livre), (2) adesão irreversível das mesmas células, (3) crescimento celular e produção de mucopolissacarídeos, (4) desenvolvimento que forma o biofilme maduro. A matriz espessa do biofilme forma uma barreira contra micro-organismos predadores e impede que as células bacterianas sejam deslocadas a um hábitat menos favorável. No procedimento seguido neste estudo esperou-se a confirmação de que o glicerol adicionado à alimentação era consumido pelo biofilme que se formou, quando nenhum inóculo estava sendo adicionado ao meio.

Gungormusler-Yilmaz *et al.* (2016), consideram que propriedades físicas (porosidade), químicas (hidrofilia) e a estabilidade mecânica são consideradas fundamentais na escolha de um material suporte para a imobilização celular. Neste estudo, as mangueiras demonstraram atender a tais requisitos.

Assim, a partir da confirmação de que o biofilme foi formado, iniciou-se a operação dos reatores com os suportes, aplicando inicialmente as mesmas condições de concentração de glicerol e vazão afluente que foram aplicadas às mangueiras durante a última semana (15 g.L⁻¹

e 0,3 L.d⁻¹).

4.1.3 Influência das relações glicerol:hidrogênio e o volume gasoso nos rendimentos de 1,3-PDO e subprodutos

Nesta etapa foi estudado se a concentração de gás hidrogênio exerce algum efeito na redução do glicerol a 1,3-PDO. Nos testes iniciais de batelada, o volume de gás ou *headspace* (86 mL), volume de meio líquido (22 mL) e a concentração de glicerol ($\approx 1,0 \text{ g.L}^{-1}$) foram mantidos fixos. Para avaliar diferentes relações de glicerol/H₂, a quantidade de glicerol foi mantida constante e somente o volume de H₂ adicionado foi modificado. Os resultados obtidos em termos de rendimento em mol de 1,3-PDO por mol de glicerol consumido se encontram na Tabela 7.

Tabela 7 - Rendimentos de 1,3-PDO e condições aplicadas nos testes com adição de H₂

H ₂ (%)	H ₂ (mL)	H ₂ (mmol)	Glicero (mmol)	Glicerol/H ₂	1,3-PDO (mol.mol ⁻¹ gli)
10	8,6	0,40	0,20	0,5	0,53±0,04
5	4,3	0,20	0,20	1,0	0,60±0,02
0	0	0	0,21	-	0,51±0,05

Fonte: A autora (2023)

Os resultados obtidos parecem indicar que a melhor condição para o máximo rendimento de 1,3-PDO foi a da relação 1:1 (glicerol:H₂). Isto estaria de acordo com o balanço de equivalente redox apresentado na equação (12) da seção materiais e métodos, 1 mol de H₂ é necessário para reduzir 1 mol de glicerol. Contudo, as diferenças foram pouco significativas e o efeito da concentração de H₂ sobre a produção de 1,3-PDO não está clara.

Além de 1,3-PDO, ácido fórmico foi detectado com rendimentos médios de 0,07±0,05 mol.mol⁻¹ nas amostras das condições de 5% de H₂ e controle (sem H₂). Nenhum outro subproduto foi detectado na fase líquida, indicando que praticamente todo o glicerol consumido foi direcionado à produção de 1,3-PDO e biomassa. Não foi medida a composição gasosa, apenas a pressão inicial e final nos frascos, que indicou um aumento de cerca de 10 mbar em todas as condições estudadas.

Para complementar os estudos a respeito da relação glicerol/H₂, novos testes em batelada foram realizados em frascos sorológicos de 108 mL, variando o volume de gás entre 80 e 90% e as concentrações de H₂ e de glicerol, conforme apresentado na seção 3.3.

Os resultados obtidos nos testes com 90% de volume gasoso (Tabela 8, Figura 15) demonstraram que o glicerol foi totalmente consumido em dois dias, para os testes com adição de H_2 , e em três dias para a amostra controle. Não houve consumo de H_2 em nenhuma condição (Figura 15), tampouco o gás parece ter provocado diminuição nos rendimentos de 1,3-PDO, sendo inclusive a condição em que se obteve o melhor rendimento de 1,3-PDO ($0,452 \pm 0,034$ mol.mol-gli⁻¹) em comparação às demais condições.

A pressão gasosa foi monitorada ao longo de seis dias e a concentração final dos metabólitos na fase líquida foi novamente medida ao final. Observou-se uma pequena queda da pressão e um leve aumento da concentração de H_2 nos testes em que o gás foi adicionado. Ainda que a pressão tenha aumentado, não foi detectado H_2 no teste controle.

Tabela 8 - Condições aplicadas e rendimentos de 1,3-PDO e etanol durante as bateladas com adição de H_2 e variação do percentual de volume gasoso

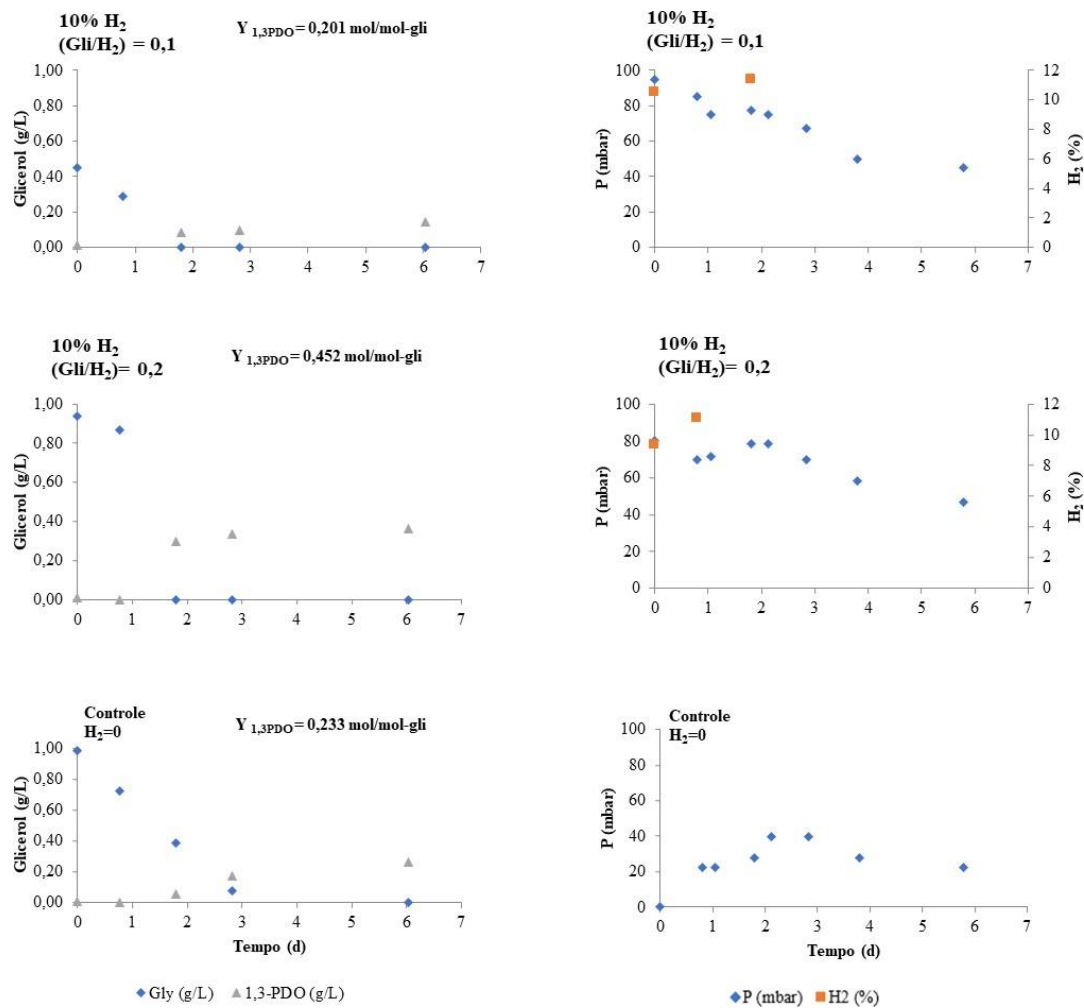
$V_{gás}$ (%)	H_2 (%) ¹	Glicerol (g.L ⁻¹)	Gli/ H_2 (mol.mol ⁻¹)	$Y_{1,3-PDO}$ (mol.mol ⁻¹)	Y_{EtOH} (mol.mol ⁻¹)
90	10	0,5	0,1	$0,201 \pm 0,065$	
90	10	1,0	0,2	$0,452 \pm 0,034$	
90	0	1,0		$0,233 \pm 0,048$	
80	10	1,0	0,6	$0,321 \pm 0,025$	$0,448 \pm 0,046$
80	5	1,0	1,1	$0,309 \pm 0,031$	$0,313 \pm 0,023$
80	0	1,0		$0,277 \pm 0,050$	$0,394 \pm 0,012$

¹ Percentual de H_2 adicionado com relação ao volume gasoso dos frascos.

Fonte: A autora (2023)

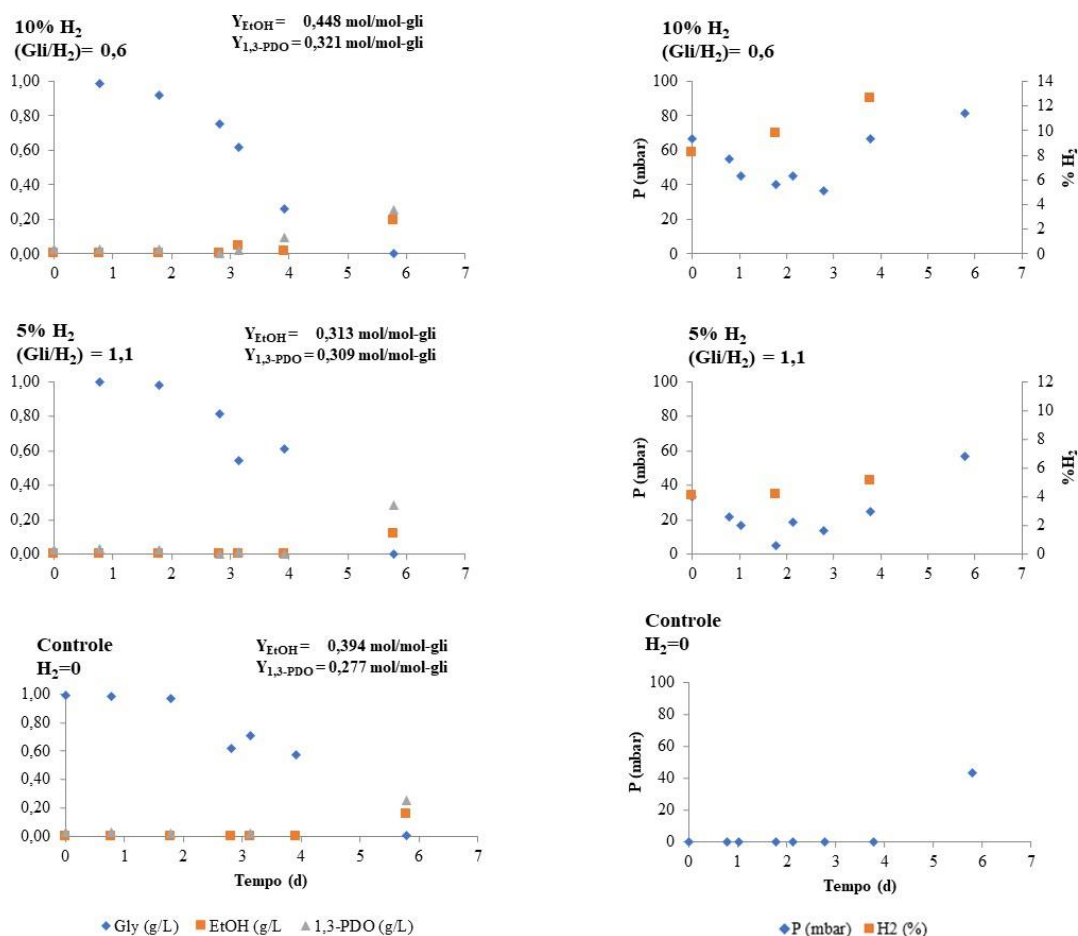
Nos testes com 80% de volume gasoso (Figura 16), o glicerol foi completamente consumido em cerca de seis dias e os rendimentos de 1,3-PDO foram muito próximos ao do teste controle (sem adição de H_2). Houve uma notável diferença em relação à produção de etanol, que não foi produzido na condição de 90%. O fato de um menor volume de gás (80%) ter resultado em produção de etanol e menor quantidade de 1,3-PDO poderia ser indicativo que a pressão gasosa estaria influenciando o processo, uma vez que, de acordo com Harper; Pohland (1986), a oxidação de etanol a ácido acético diminui à medida em que a pressão parcial de H_2 aumenta dentro do sistema e é inibida à pressão parcial de H_2 próxima a 1 atm. Entretanto, a pressão total dentro dos reatores não chegou ao valor considerado inibitório e, neste caso, apenas a retenção de H_2 não pode justificar os rendimentos de etanol.

Figura 15 - Consumo de glicerol, produção de 1,3-PDO e H₂, e pressão (P) nas bateladas com 90% de volume gasoso



Fonte: A autora (2023)

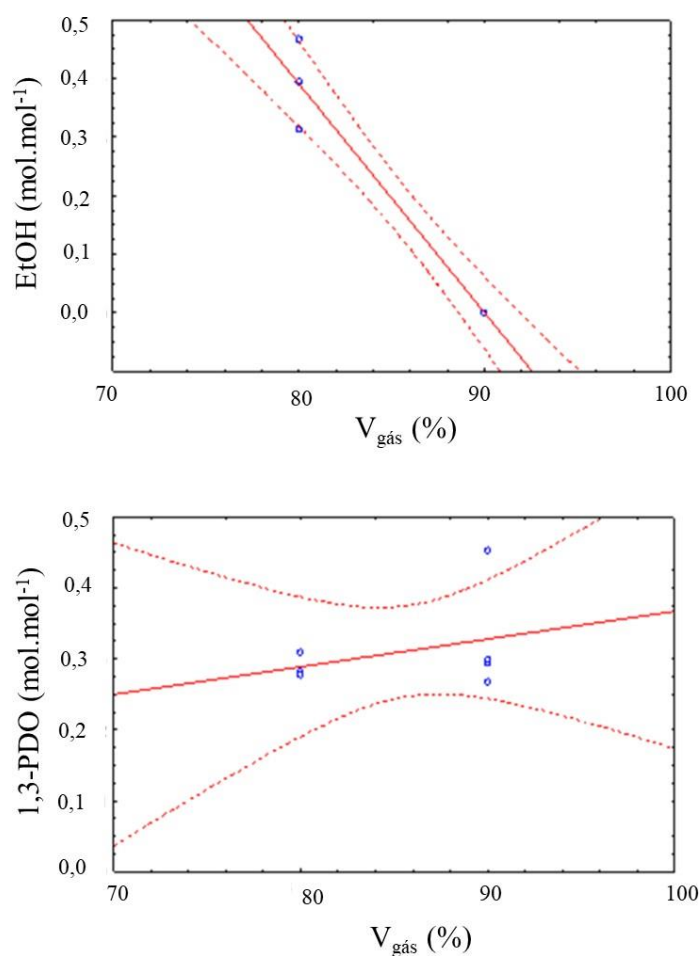
Figura 16 - Consumo de glicerol, produção de 1,3-PDO, etanol e H_2 , e pressão (P) nas bateladas com 80% de volume gasoso



Fonte: A autora (2023)

Estatisticamente, houve correlação significativa ($r^2 = 0,96$; $p = 0,0001$) apenas entre o percentual do volume de gás e o rendimento de etanol, sendo 80% a condição mais favorável (Figura 17(a)), não houve correlação para os rendimentos de 1,3-PDO (Figura 17(b)). Aparentemente, há uma relação inversa entre o volume gasoso (ou a quantidade de gás H_2 nele contida) e o etanol produzido; entretanto, seriam necessários mais testes para comprovar a existência desta relação.

Figura 17 - Correlação entre o percentual de volume gasoso e (a) rendimento de etanol e (b) rendimento de 1,3-PDO



Fonte: A autora (2023)

4.1.4 Influência da concentração de glicerol sob os rendimentos de 1,3-PDO e subprodutos

Os resultados mostraram (Tabela 9, Figura 18) que independente da concentração de glicerol estudada, o glicerol foi convertido majoritariamente em 1,3-PDO, ainda que os

subprodutos fossem distintos. Os rendimentos de 1,3-PDO aumentaram a medida em que se elevou a concentração inicial de glicerol, demonstrando um favorecimento à rota redutiva.

Tabela 9 - Concentrações iniciais de glicerol aplicadas e metabólitos produzidos

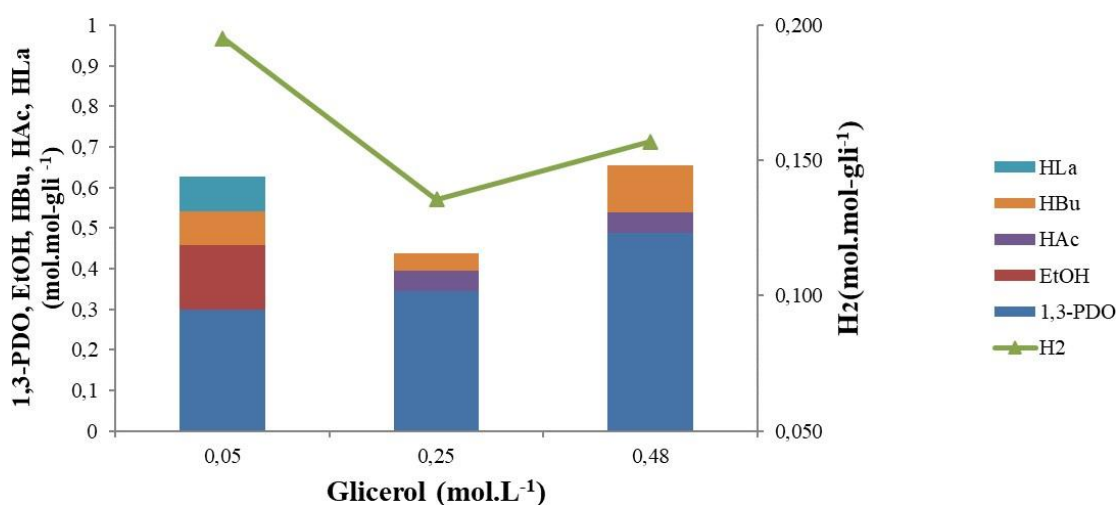
Glicerol _{inicial}		Metabólitos fase líquida (mol.mol.gli ⁻¹)					H ₂ produzido
(mol.L ⁻¹)	(mmol)	1,3-PDO	HAc	EtOH	HL _a	HBu	(mmol)
0,05	2,5	0,300	0	0,157	0,085	0,082	0,48
0,25	12,5	0,345	0,049	0	0	0,043	1,08
0,48	24,0	0,489	0,049	0	0	0,116	1,05

Fonte: A autora (2023)

É importante notar que o rendimento de 1,3-PDO foi favorecido quando ácido acético foi produzido, estando em acordo com o que diz a literatura quanto ao favorecimento da rota redutiva quando este ácido é produzido (GARLAPATI *et al.*, 2016; MOSCOVIZ; TRABLY; BERNET, 2016; ZENG; BIEBL, 2002). Além disso, a produção de etanol ocorreu apenas na condição de menor concentração de glicerol inicial.

Os percentuais de glicerol consumido foram de 97,5%, 63,6% e 27,9% para as concentrações iniciais de 0,05, 0,25 e 0,48 mol.L⁻¹, respectivamente. Nas condições de maiores concentrações de glicerol, o pH caiu a valores próximos a 4,2. O acúmulo de ácidos no meio impediu que a comunidade microbiana fosse capaz de consumir todo o substrato.

Figura 18 - Concentrações iniciais de glicerol e rendimentos dos metabólitos na fase líquida e gasosa em cada condição aplicada



Fonte: A autora (2023)

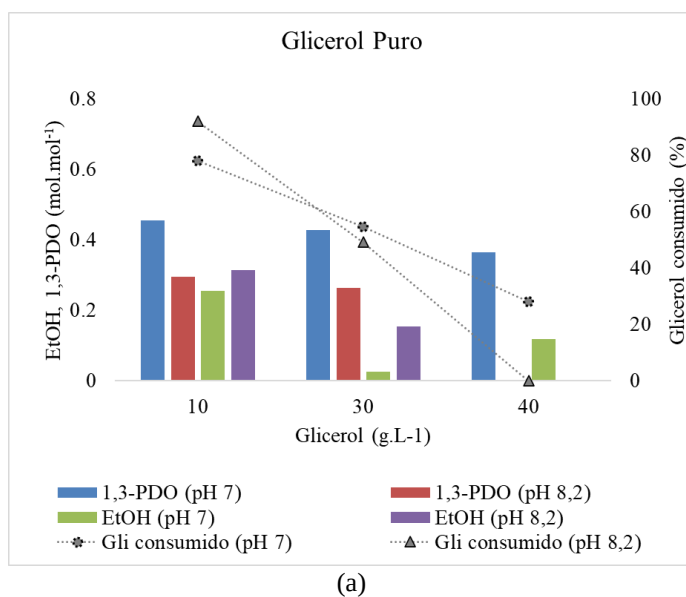
4.1.5 Influência da concentração de glicerol, pH e tipo de substrato na fermentação

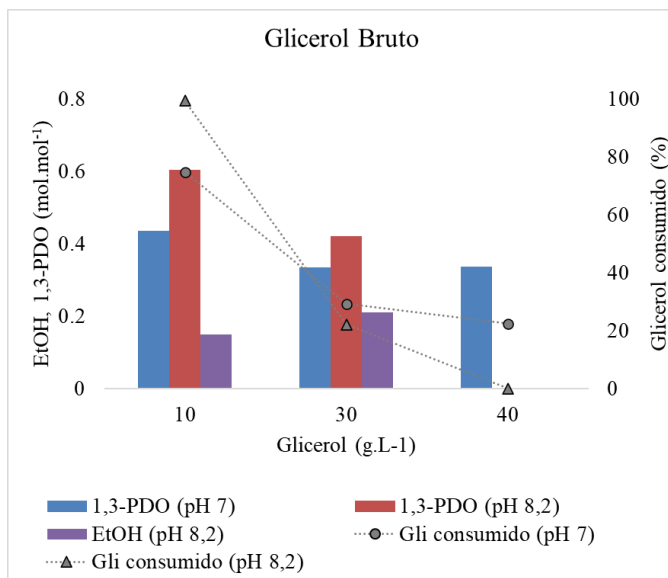
Os experimentos discutidos nesta seção foram realizados utilizando as biomassas coletadas ao final da operação dos reatores R_S (alimentado, sequencialmente, com glicerol puro e bruto) e R_T (alimentado apenas com glicerol puro), conforme descrito na seção 3.4.

Nos testes inoculados com a biomassa do reator R_T, Figura 19(a), os rendimentos de etanol foram maiores quando a menor concentração de glicerol foi aplicada (10 g.L^{-1}) e com pH alcalino. Na condição de glicerol a 40 g.L^{-1} e pH 8 não houve consumo de glicerol e apenas 30% do glicerol foi consumido a pH 7,0. O mesmo comportamento ocorreu nos testes realizados a concentração inicial de glicerol de 44 g.L^{-1} (pH 7), conforme discutido na seção 4.1.4. Sendo assim, esta foi então considerada a concentração inibitória.

Quando glicerol bruto e biomassa do R_S foram o substrato e o inóculo utilizados, Figura 19(b), a produção de 1,3-PDO foi maior na condição de pH 8 e concentrações de 10 e 30 g.L^{-1} de glicerol bruto. Comparando-se aos testes com inóculo do R_T, a produção de etanol foi menor e só ocorreu nas concentrações de 10 e 30 g.L^{-1} , com pH 8. A concentração de 40 g.L^{-1} de glicerol também foi inibitória para a comunidade bacteriana (consumo de glicerol = 22%).

Figura 19 - Produtos *versus* concentração de glicerol: (a) 1,3-PDO e etanol produzidos com glicerol puro; (b) 1,3-PDO e etanol produzidos com glicerol bruto





(b)

Fonte: A autora (2023)

Wu *et al.* (2011) utilizaram um fermentador 2,5-L inoculado com *Klebsiella* sp. HE1 para investigar o efeito do pH na faixa de 5,5-7,0 e concentrações de glicerol de 10-70 g.L⁻¹. Os autores relataram os maiores rendimentos de etanol para as menores concentrações de glicerol e pH 6,0.

MOSCOVIZ; TRABLY; BERNET (2016), trabalhando com cultura mista, estudaram o efeito do pH inicial em testes batelada, ajustando o pH inicial de 4 a 10, com baixa concentração de glicerol (1,66 g.L⁻¹) e obtiveram principalmente 1,3-PDO (0,52 a 0,64 mol.mol-gli⁻¹) na faixa de pH de 5-9, com os melhores resultados obtidos a pH 7 e 8. O máximo rendimento de etanol (0,11 mol.mol-gli⁻¹) em seus estudos foi obtido a pH 6,0, mesma condição de pH em que o rendimento de 1,3-PDO foi mínimo (0,52 mol.mol-gli⁻¹). Os autores sugeriram que os metabólitos produzidos não só estão relacionados com o pH aplicado, mas também com a comunidade bacteriana.

Kongjan *et al.* (2021), avaliaram a otimização da fermentação de glicerol bruto, em testes batelada, por uma cultura pura de *Enterobacter* sp., e obtiveram rendimento máximo de 1,3-PDO (0,24 mol.mol-gli⁻¹) a pH 8. Os autores demonstraram que ao aumentar o pH de 6 a 8 e a concentração de glicerol de 5 para 10 g.L⁻¹, a via redutiva foi favorecida.

Temudo *et al.* (2008) variaram a concentração de glicerol de 4 a 25 g.L⁻¹ e observaram que o glicerol foi um fator limitante, ocorrendo diminuição na produção de etanol e aumento em 1,3-PDO quando a concentração de glicerol foi aumentada.

No presente estudo, a produção de etanol foi maior para a menor concentração inicial de glicerol estudada utilizando o inóculo do R_T, demonstrando que houve influência da quantidade de glicerol disponível, mesmo após a mudança da comunidade bacteriana adaptada ao reator.

Analizando os resultados para os diferentes inóculos, a comunidade presente no reator R_T demonstrou maior tendência a produzir etanol, especialmente quando a concentração de substrato foi menor. A influência do pH somente foi significativa quando a concentração do substrato aumentou de 10 a 30 g.L⁻¹.

Diante do que concluído por estudos anteriores, os resultados obtidos convergem na relação inversa entre concentração inicial de glicerol e produção de etanol e ao mesmo tempo no fato de que mais glicerol disponível favorece a produção de 1,3-PDO. Quanto ao pH, poucos estudos apresentaram pH alcalino como condição mais favorável ao etanol.

Em nosso caso, a condição alcalina influenciou os rendimentos de etanol, que foram mais altos, e isto provavelmente está relacionado à comunidade bacteriana em atividade, visto que os resultados foram distintos entre os inóculos.

4.1.6 Influência de doadores de elétrons (H₂, lactato, metanol e etanol) no rendimento de 1,3-PDO

O glicerol é convertido a 1,3-PDO pela redução de um de seus grupos hidroxila. Nesta etapa do estudo em bateladas, estudou-se a hipótese de a adição de doadores de elétrons favorecerem a transformação de glicerol em 1,3-PDO. As concentrações de glicerol, doadores de elétrons e produtos medidas por cromatografia são apresentadas na Tabela 10. Dentre os doadores de elétrons utilizados, apenas o metanol foi parcialmente consumido (0,02 mol.L⁻¹).

As quantidades de doador de elétrons foram calculadas considerando que 1 mol de H₂ é consumido para produzir cada mol de 1,3-PDO, e que 1 mol de ácido láctico, metanol ou etanol libera suficiente poder redutor (2 H₂) como para reduzir 2 moles de glicerol (eq. (12)-(15), seção 3). O teste com adição de H₂ foi realizado adicionando a princípio a metade do gás e esperava-se que ao ser consumido a outra metade seria adicionada para seguir o consumo de glicerol, entretanto, o substrato foi consumido sem utilização do doador.

Tabela 10 - Concentrações de glicerol e rendimentos dos metabólitos produzidos nas bateladas com adição de doadores de elétrons

	Doador e ⁻ (mol.L ⁻¹)		Glicerol (mol.L ⁻¹)		Rendimentos (mol.mol ⁻¹ gli)			
	Inicial	final	inicial	final	HLa	EtOH	HAc	1,3-PDO
HLa	0,02	0,02	0,09	0,03	0,03	0,14	0,13	0,52
MeOH	0,06	0,04	0,09	0,01	0,00	0,17	0,07	0,56
EtOH	0,04	0,05	0,09	0,02	0,03	0,21	0,08	0,60
H ₂	0,04	0,04	0,09	0,01	0,00	0,00	0,15	0,67
-	-	-	0,09	0,01	0,00	0,15	0,08	0,59

Fonte: A autora (2023)

HAc: ácido acético; HLa: ácido láctico, MeOH: metanol, EtOH: etanol

Com os resultados obtidos neste ensaio, chegou-se à conclusão de que as bactérias já estavam adaptadas aos reatores contínuos, que foram operados sem adição de doador de elétrons, obtendo rendimentos de 1,3-PDO muito altos sem necessidade de adicionar doadores de e⁻. Tais resultados são muito positivos, uma vez que apontaram não ser necessária a adição de doadores para melhorar os rendimentos.

Além disso, os rendimentos de 1,3-PDO foram bem mais altos do que nas bateladas iniciais, realizadas com o inóculo do procedimento de reativação, mostrando que ao longo do período operacional nos reatores houve uma seleção de bactérias produtoras de 1,3-PDO, aumentando a eficiência.

Diante dos resultados obtidos nos diferentes experimentos em bateladas, antes e após a operação dos reatores, bem como no procedimento de crescimento da biomassa nos meios suporte dos reatores, podem ser pontuadas as seguintes conclusões:

- Durante a reativação dos inóculos por meio das transferências consecutivas a um meio fresco de nutrientes, os rendimentos de 1,3-PDO foram satisfatórios sem adição de alcalinidade ao meio. Por isso, optou-se por proceder o crescimento do inóculo no interior das mangueiras de silicone sem adição de alcalinidade. O consumo de glicerol e a produção de 1,3-PDO nas mangueiras de silicone ocorreu a partir da segunda semana de alimentação; os rendimentos médios de 1,3-PDO estiveram na faixa de 0,28 a 0,41 mol.mol-gli⁻¹; o efluente das mangueiras apresentou pH ao redor de 5,0, o que limitava o consumo completo de substrato, que variou de 50 a 69%, em média. Além de 1,3-PDO, etanol (0,1 mol.mol-gli⁻¹) e ácido acético (< 0,1 mol.mol-gli⁻¹) foram obtidos como subprodutos;

- A relação entre hidrogênio e glicerol influenciou o rendimento de 1,3-PDO e etanol. Observou-se uma tendência de maior rendimento de 1,3-PDO na relação H₂:glicerol 1:1, o que esteve de acordo com o balanço de equivalente redox, onde 1 mol de H₂ é necessário para reduzir 1 mol de glicerol. Porém, as diferenças entre os rendimentos foram pouco significativas e o efeito do H₂ sobre a produção de 1,3-PDO não fica claro;
- Quando se modificou o volume gasoso (*headspace*) nos frascos, observou-se que 1,3-PDO foi independente do volume de gás, enquanto o etanol foi produzido exclusivamente quando o percentual de volume gasoso foi de 80%. Em nenhuma das condições testadas observou-se o consumo do H₂ adicionado aos frascos. Contudo, mais testes seriam necessários para comprovar essa relação;
- 1,3-PDO sempre foi o produto majoritário, com elevação dos rendimentos à medida em que se elevaram as concentrações iniciais de glicerol (5,0 - 44,0 g.L⁻¹). A produção de etanol como subproduto ocorreu apenas na menor concentração inicial de glicerol;

Os experimentos em batelada discutidos até aqui foram realizados com o inóculo de partida dos reatores contínuos. Vale considerar que a comunidade microbiana não era tão diversa quanto a que se desenvolveu dentro dos reatores. Dessa forma, para as conclusões dos últimos testes em batelada, deve-se ressaltar que uma nova comunidade (que se estabeleceu no interior dos reatores R_S e R_T) foi estudada em *batch*, a fim de verificar o comportamento frente a condições distintas, tais como: tipo de substrato, concentrações de substrato e pH inicial.

- Nos testes com a biomassa do reator adaptado ao consumo de glicerol puro, cujo meio suporte foram os pedaços de mangueira (R_T), a concentração inicial de glicerol e o pH alcalino favoreceram maiores rendimentos de etanol. A atividade da comunidade microbiana foi inibida por concentração de glicerol de 40 g.L⁻¹;
- Nos testes com a biomassa do reator adaptado ao consumo de glicerol bruto, cujo meio suporte foi a mangueira de silicone disposta em espiral no interior do reator R_S, os rendimentos de 1,3-PDO foram altos na condição de pH 8 e concentrações de 10 e 30 g.L⁻¹ de glicerol bruto. A produção de etanol com glicerol a 10 g.L⁻¹ foi muito menor em comparação às bateladas com o inóculo do reator R_T, sugerindo uma diferença na comunidade microbiana em atividade; o consumo de glicerol bruto a concentração ≥ 30 g.L⁻¹ foi muito baixo. Esse resultado diverge do que se obteve em operação contínua, onde rendimentos muito elevados de 1,3-PDO foram alcançados a cargas elevadas de glicerol bruto, conforme será discutido na seção 6;

- Nas bateladas com adição de doadores de elétrons, os rendimentos de 1,3-PDO variaram de 0,52 a 0,67 mol.mol-gli⁻¹. Ainda que o máximo rendimento tenha sido obtido ao adicionar H₂ como doador de elétrons, em nenhum caso os doadores foram consumidos pelas bactérias. Assim, chegou-se à conclusão de que as bactérias adaptadas aos reatores contínuos, operados sem adição de doador de elétrons, alcançaram rendimentos de 1,3-PDO muito elevados sem necessidade de adicionar doadores para melhorar os rendimentos.

5 EFEITO DAS CONDIÇÕES OPERACIONAIS APLICADAS A REATOR COM MEIO SUPORTE DE SILICONE NA PRODUÇÃO DE 1,3-PROPANODIOL E ETANOL PELA FERMENTAÇÃO DE GLICEROL

O processo biológico de fermentação do glicerol pode gerar produtos de valor agregado, dependendo da rota metabólica favorecida, em consequência das condições operacionais aplicadas e dos micro-organismos envolvidos.

O rendimento de 1,3-PDO depende da combinação das rotas redutiva e oxidativa e será máximo quando ácido acético for o único subproduto. Por outro lado, etanol e ácido fórmico podem ser obtidos como subprodutos, o que tem relação com a natureza redutora do glicerol; a conversão a piruvato gera equivalentes redutores que permitem a coprodução (CLOMBURG; GONZALEZ, 2013; GARLAPATI; SHANKAR; BUDHIRAJA, 2016; MOSCOVIZ; TRABLY; BERNET, 2016; ZENG; BIEBL, 2002).

A aplicação de culturas mistas envolve desafios como a competição entre espécies e o controle das condições operacionais para o favorecimento de uma rota metabólica em particular, uma vez que a fermentação é influenciada tanto pelo micro-organismos dominantes quanto pelas condições operacionais aplicadas, tais como pH, temperatura, tipo de reator, carga orgânica e TDH.

Nesta seção serão discutidos os resultados obtidos durante a operação do reator contínuo com biofilme imobilizado em pedaços de mangueira de silicone (tipo filtro anaeróbio ascendente) para avaliar o efeito da variação da carga de glicerol aplicada (gli-LR) nos rendimentos de 1,3-PDO e etanol. A influência da dosagem de NaHCO_3 para fornecer alcalinidade também foi estudada.

5.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Conforme foi descrito na seção 3.4 de materiais e métodos, o reator anaeróbio R_T (900-mL), foi preenchido até cerca da metade de seu volume com as mangueiras de silicone cortadas em pedaços, formando um leito para a imobilização da biomassa. O reator foi alimentado até 800-mL de volume útil (Figura 20).

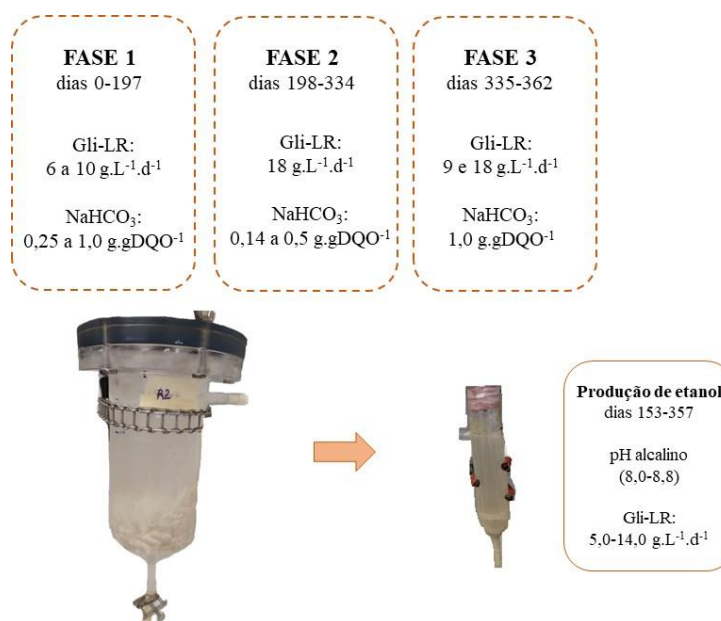
A operação do reator foi dividida em três fases: (P1) estudo do efeito da gli-LR aplicada, de 6 a 10 $\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$; (P2) a gli-LR foi mantida constante, próxima a 18 $\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ e foram aplicadas dosagens variadas de NaHCO_3 , tanto em P1, quanto em P2 (Tabela 11); (P3) avaliação da

influência da gli-LR (9 e 18 g.L⁻¹.d⁻¹), mantendo constante a dosagem de NaHCO₃.

A dosagem de bicarbonato adicionada à alimentação foi variada para (i) fornecer alcalinidade e evitar a queda de pH; (ii) verificar a influência nos rendimentos de 1,3-PDO e etanol. O sistema foi operado em ambiente com temperatura controlada (30 ± 2 °C).

Simultaneamente aos experimentos com o reator R_T, foi estudado um reator de menor volume (~100-mL de V_{útil}), alimentado com gli-LR de 5,0 a 14,0 g.L⁻¹.d⁻¹ e com pH afluyente variando entre 8,0-8,8 (mais detalhes no APÊNDICE A).

Figura 20 - Esquema das fases de operação do reator R_T e estudo simultâneo em reator para a produção de etanol a pH alcalino



Fonte: A autora (2023)

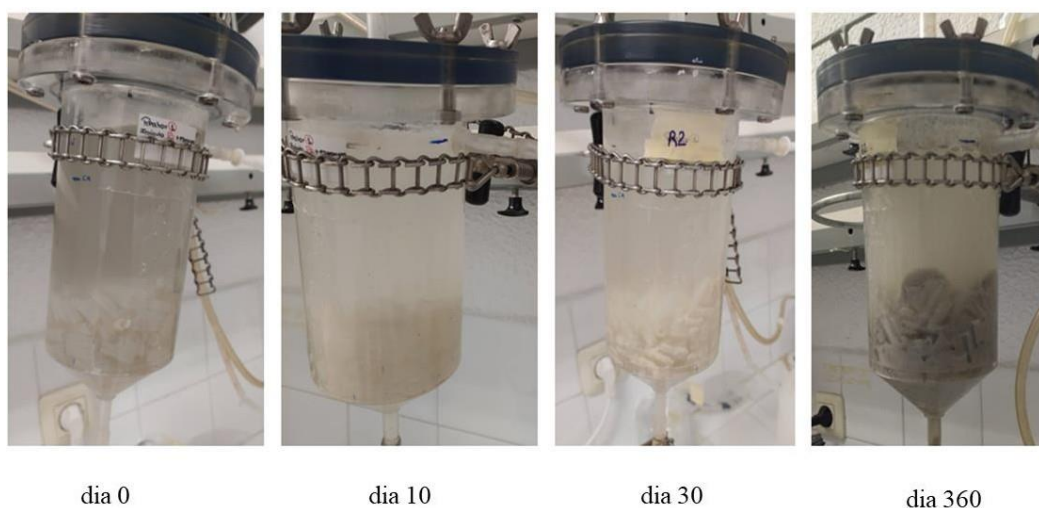
5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.2.1 Imobilização da biomassa

A Figura 21 mostra a evolução da biomassa no interior do reator R_T ao longo do período operacional. As propriedades físicas (resistência, porosidade), químicas (hidrofobicidade, capacidade de reutilização do suporte) e estabilidade mecânica são algumas

das considerações fundamentais na seleção de um meio suporte para a imobilização celular (GUNGORMUSLER-YILMAZ *et al.*, 2016). Neste trabalho, foi demonstrada a viabilidade do uso de tubos de silicone para a imobilização de biomassa de consumidores de glicerol, abrindo possibilidades para estudos futuros relacionados às propriedades do material.

Figura 21 - Evolução da biomassa do reator R_T ao longo da operação



Fonte: A autora (2023)

5.2.2 Influência das condições operacionais nos rendimentos de 1,3-PDO e de etanol

Durante os primeiros sete dias de operação do reator, nenhuma alcalinidade foi adicionada ao meio e o pH efluente caiu até 4,0. O consumo de glicerol diminuiu a 31% devido ao baixo pH do reator. A dosagem inicial de NaHCO_3 (1 g por g de DQO-glicerol) desde o dia 8 foi acompanhada por um aumento nos rendimentos de etanol e ácido fórmico, bem como pelo decréscimo nos rendimentos de 1,3-PDO e acetato. Assim, a dosagem de NaHCO_3 foi diminuída, a fim de avaliar o efeito nos rendimentos de 1,3-PDO e etanol.

Um pequeno aumento na gli-LR de 6,0 a 8,0 (dias 25-95) resultou em menores rendimentos de etanol (dia 30), acompanhado por um leve aumento em 1,3-PDO e acetato (Figura 22). O aumento da carga a $10 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, mantendo constante a quantidade de NaHCO_3 (dias 96-133), não afetou substancialmente os rendimentos de 1,3-PDO e etanol. Além disso, a diminuição da dosagem de bicarbonato à metade (dias 134-197) também não teve efeito substancial nos rendimentos, o que possibilitou utilizar menos bicarbonato na operação.

A influência da diminuição da dosagem de NaHCO_3 foi estudada durante a fase P2, mantendo a gli-LR constante ($18 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$). A não dosagem de bicarbonato (dias 300-305)

resultou em uma rápida queda do consumo de glicerol, como já havia sido observado nos primeiros dias de P1 (dias 0-7), justificando a necessidade de adicionar alcalinidade ao reator. A dosagem mínima testada ($0,14 \text{ g NaHCO}_3 \cdot \text{g DQO}^{-1}$) foi suficiente para manter o consumo de glicerol acima de 87% (Figura 22, Tabela 11).

Com relação à gli-LR aplicada, os resultados obtidos nas fases P1 e P2 levaram à hipótese de que gli-LR poderia influenciar os rendimentos de etanol e 1,3-PDO. Na fase P3, tal hipótese foi comprovada, com o notável aumento de etanol de $0,04$ a $0,19 \text{ mol} \cdot \text{mol-gli}^{-1}$ quando aplicadas as cargas de $18,0$ e $9,0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, respectivamente (Tabela 11, Figura 23(f)). Além disso, nestas mesmas condições, o rendimento médio de 1,3-PDO diminuiu de $0,47$ a $0,32 \text{ mol} \cdot \text{mol-gli}^{-1}$ (Figura 23(e)).

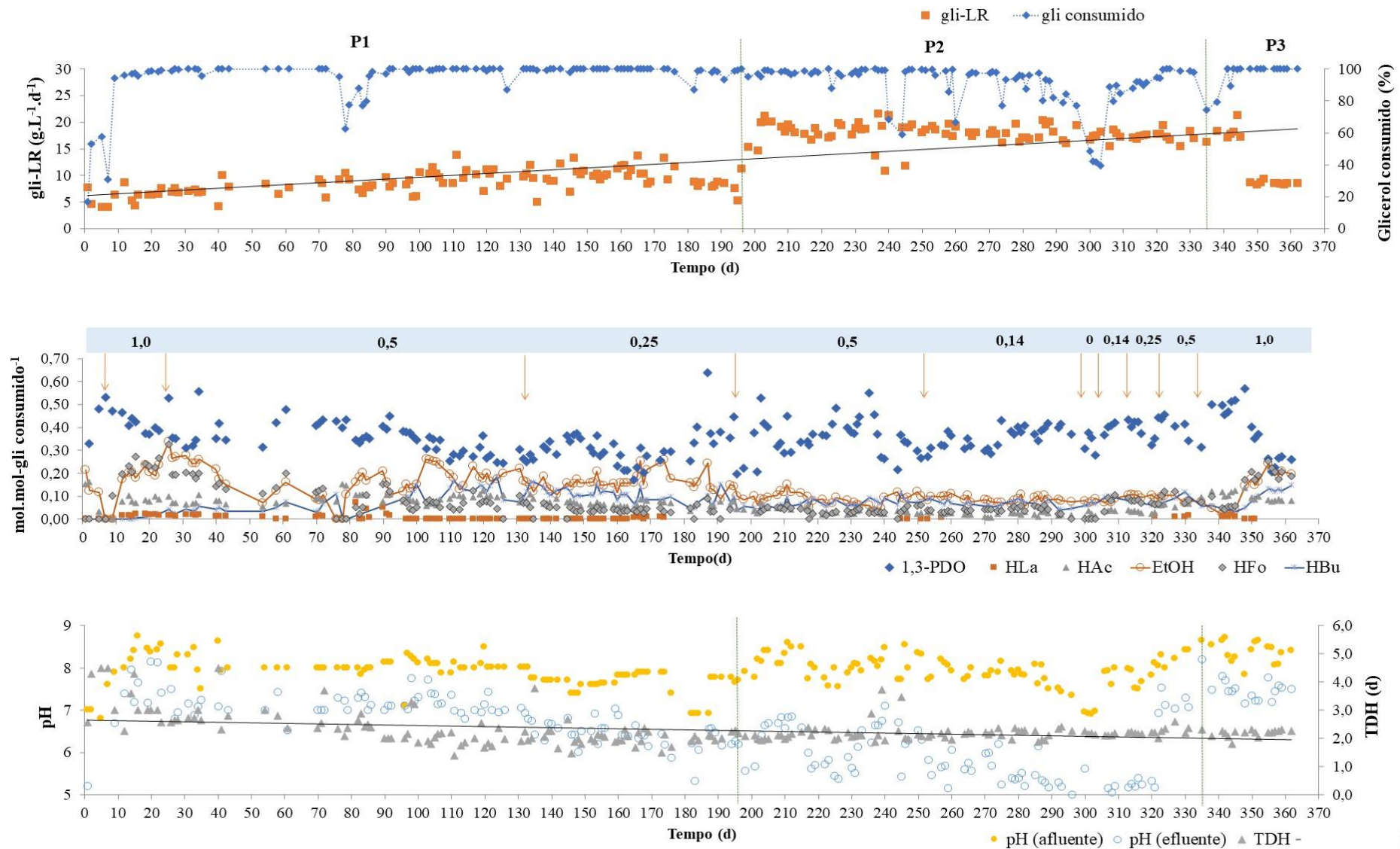
Na fase P1, quando comparada a mesma carga aplicada (cerca de $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) com adição de $0,5 \text{ g NaHCO}_3 \cdot \text{g DQO}^{-1}$ (dias 96-133) e $0,25 \text{ g NaHCO}_3 \cdot \text{g DQO}^{-1}$ (dias 134-197), os rendimentos médios de 1,3-PDO e etanol não divergiram (Figura 23(a) e 23(b)), o que pode ser interessante operacionalmente, possibilitando a operação do reator com menor quantidade de bicarbonato adicionada. Em P2, as variações na dosagem de NaHCO_3 também não influenciaram nos rendimentos médios de 1,3-PDO e etanol (Figura 23(c) e 23(d)).

Tabela 11 - Condições operacionais aplicadas e eficiência do reator R_T em P1, P2 e P3

	Tempo (d)	NaHCO_3 (g.g DQO ⁻¹)	pH _{afluente}	pH _{efluente}	Gli-LR (g.L ⁻¹ .d ⁻¹)	Gli consumido (%)	1,3-PDO (mol.mol ⁻¹)	EtOH (mol.mol ⁻¹)
P1	0 – 7	0	7,10±0,30	4,47±0,46	5,13±1,53	39,60±16,59	0,45±0,09	0,11±0,08
	8 - 24	1,00	8,04±0,59	6,71±1,49	5,88±1,37	97,17±1,61	0,42±0,04	0,18±0,07
	25 - 95	0,50	8,06±0,22	7,14±0,26	7,81±1,31	94,97±9,45	0,39±0,06	0,17±0,08
	96 - 133	0,50	8,05±0,24	7,15±0,25	9,68±1,79	99,25±2,57	0,31±0,05	0,19±0,04
	134 - 197	0,25	7,63±0,28	6,41±0,31	9,77±1,90	99,13±2,29	0,31±0,08	0,16±0,04
P2	198 - 252	0,50	8,10±0,28	6,22±0,50	18,22±2,38	96,02±8,34	0,36±0,08	0,09±0,03
	253 - 299	0,14	7,84±0,22	5,54±0,32	18,09±1,24	91,00±8,69	0,36±0,04	0,09±0,01
	300 - 305	0	7,02±0,17	4,84±0,43	17,84±0,92	42,83±3,32	0,33±0,04	0
	306 - 313	0,14	7,88±0,14	5,09±0,13	17,28±1,05	87,25±4,03	0,41±0,02	0,09±0,01
	314 - 320	0,25	7,69±0,17	5,28±0,07	17,45±0,34	91,93±1,74	0,39±0,04	0,10±0,01
	321 - 334	0,50	8,22±0,16	6,88±0,72	17,43±1,16	98,48±1,80	0,41±0,04	0,09±0,01
P3	335 - 347	1,00	8,47±0,21	7,66±0,26	18,07±1,49	91,84±10,17	0,47±0,07	0,04±0,02
	348 - 362	1,00	8,34±0,25	7,40±0,19	8,61±0,28	100	0,32±0,10	0,19±0,03

Fonte: A autora (2023)

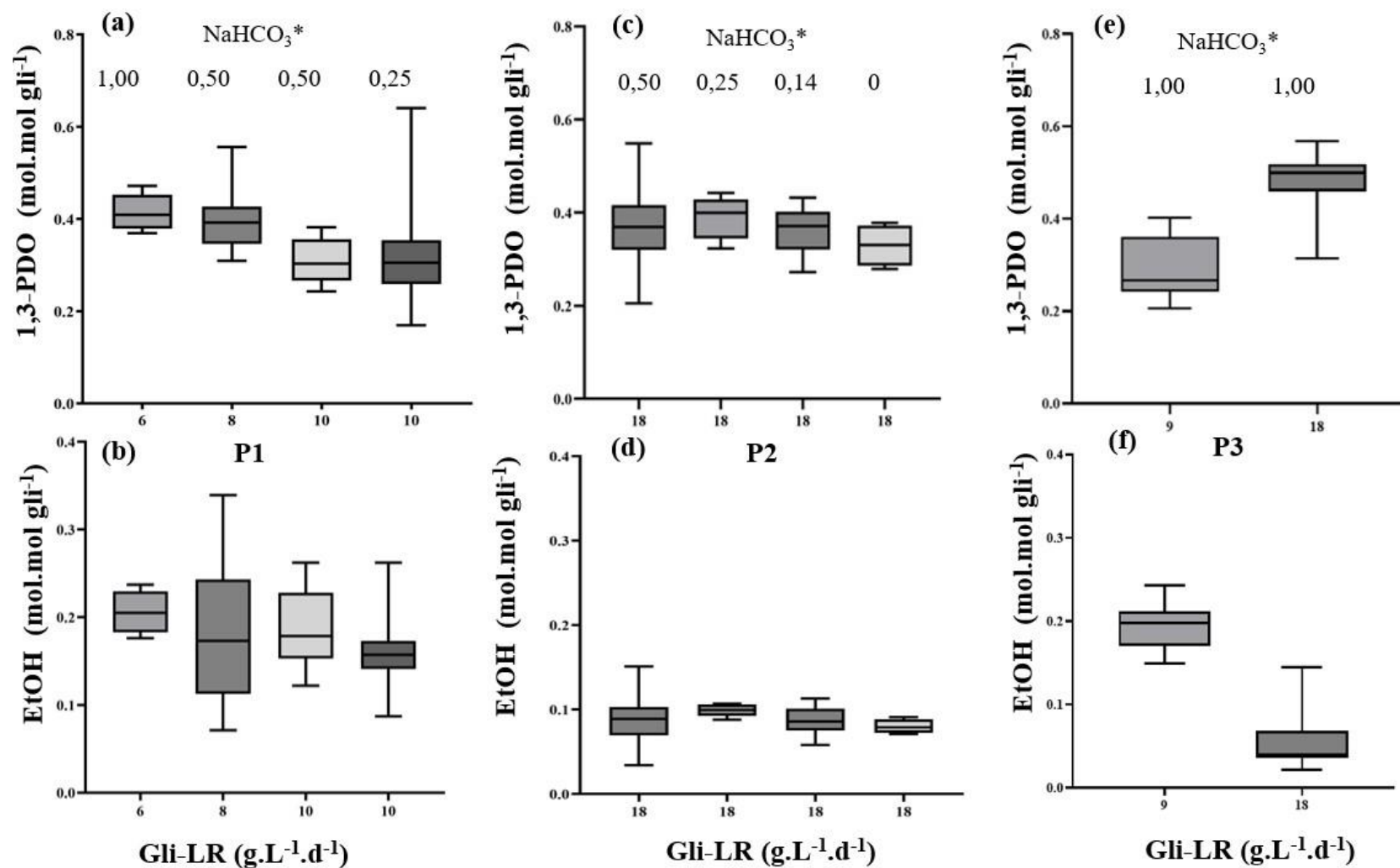
Figura 22 - Condições operacionais (gli-LR, pH e TDH), consumo de glicerol e rendimentos de metabólitos durante a operação do reator R_T



Nota: os números destacados em azul no gráfico de rendimentos de produtos refere-se às quantidades de NaHCO_3 (g.gDQO^{-1}) adicionado.

Fonte: A autora (2023)

Figura 23 - Rendimentos de 1,3-PDO durante (a) P1, (c) P2 e (e) P3; Rendimentos de etanol durante (b) P1, (d) P2 e (f) P3



Fonte: A autora (2023)

No presente estudo, notou-se que os rendimentos mais elevados de etanol foram produzidos quando a carga de glicerol aplicada foi menor ($8-9 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) e a pH alcalino (acima de 8). Existem poucos estudos que relatem a produção de etanol pela fermentação de glicerol e os que foram publicados quase sempre se referem a culturas puras de bactérias consumidoras de glicerol.

Wu *et al.* (2011) inocularam um fermentador de 2,5-L com cultura isolada de *Klebsiella* sp. HE1 para investigar o efeito do pH na faixa de 5,5-7,0 sob concentrações de $10-70 \text{ g.L}^{-1}$ de glicerol; os autores relacionaram os rendimentos mais elevados de etanol a menor concentração inicial de glicerol e pH 6,0. Suzuki *et al.* (2014) apresentaram, pela primeira vez, a produção de etanol a partir de glicerol bruto a pH alcalino por uma cultura isolada de *Klebsiella variicola*. O estudo foi realizado em tubos contendo 30 mL de meio basal de glicerol, variando o pH; os autores reportaram que o melhor pH para a produção de etanol foi 8,0-9,0 e o consumo de glicerol foi 1,4 vezes mais alto a pH 9,0. Temudo *et al.* (2008) utilizaram um reator CSTR com cultura mista com dominância de *Klebsiella oxytoca* e demonstraram que sob concentrações de glicerol limitantes e pH 8,0, os rendimentos de etanol e formato foram maiores do que 60% do carbono convertido.

A partir de uma comparação dos nossos resultados com os publicados por outros autores, pode-se concluir que quando a obtenção de etanol for prioridade, o reator deve ser operado com baixa carga aplicada e pH levemente alcalino.

A maioria das espécies de *Clostridium* cresce mais rápido a pH 6,5-7,0 (RAINEY *et al.*, 2009). Diversos estudos mostraram *Clostridium* spp. como fermentadores de glicerol e produtores de 1,3-PDO (CHATZIFRAGKOU *et al.*, 2011; SITTIJUNDA; REUNGSANG, 2017; TEE *et al.*, 2017; VARRONE; SKIADAS; GAVALA, 2018; DIETZ; ZENG, 2014; ZHOU *et al.*, 2017). Neste trabalho, considerando a variação de pH do reator ao longo da operação, o pH efluente esteve dentro da faixa ótima para a atividade de *Clostridium* e 1,3-PDO foi o principal produto.

Em experimentos realizados em um reator independente do R_T, operado concomitantemente (APÊNDICE A), os rendimentos de etanol estiveram próximos a $0,30 \text{ mol.mol}^{-1}$ quando foram mantidos o pH afluente alcalino (8,5-8,8) e baixa

carga (gli-LR) aplicada, de 5,0 a 8,0 g.L⁻¹.d⁻¹; não houve produção de 1,3-PDO nesta condição, exceto quando o pH afluente foi diminuído a 8,0. Assim, isto parece marcar um limite de pH máximo para a produção de 1,3-PDO.

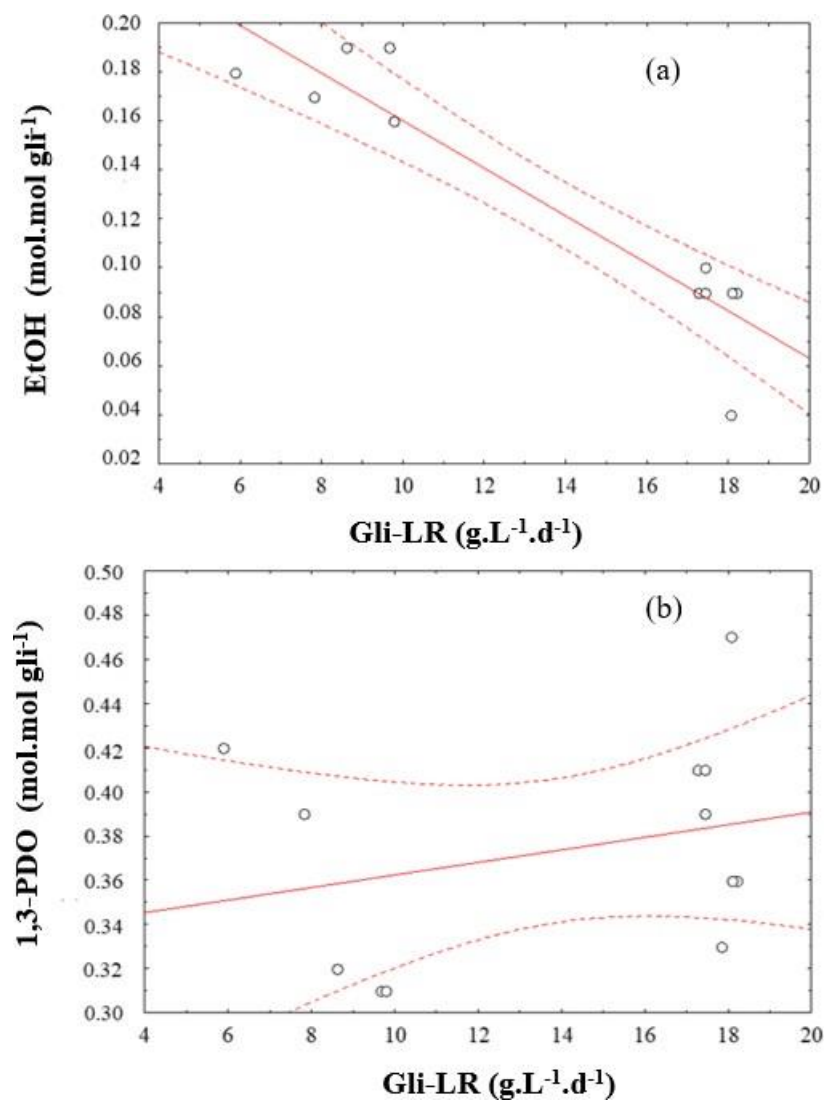
Em relação à carga de glicerol aplicada, houve influência nos rendimentos de etanol, de forma que os rendimentos mais elevados foram alcançados a cargas menores do que 10 g.L⁻¹.d⁻¹ (Figura 24(a)). Portanto, se é preferível produzir 1,3-PDO, as condições devem ser aplicadas com a finalidade de evitar a produção de etanol. Temudo *et al.* (2008) variaram a concentração de glicerol de 4 a 25 g.L⁻¹ e observaram que o glicerol foi fator limitante, ocorrendo diminuição dos rendimentos de etanol e aumento em 1,3-PDO quando a concentração de glicerol foi aumentada. Da mesma forma, Kongjan *et al.* (2021), avaliando a otimização da fermentação de glicerol bruto, em testes batelada, por uma cultura isolada de *Enterobacter* sp., demonstraram que o aumento na concentração do glicerol de 5 a 10 g.L⁻¹ favoreceu a rota redutiva.

Sittijunda; Reungsang (2017) avaliaram a influência da carga de glicerol, em um reator UASB inoculado com lodo granular, nos rendimentos de H₂, etanol e 1,3-PDO. O aumento na carga de 25 a 50 g.L⁻¹.d⁻¹ causou aumento nas concentrações de etanol e de 1,3-PDO. Embora seus resultados não sejam comparáveis aos deste trabalho, os autores demonstraram que a carga orgânica influenciou significativamente as rotas metabólicas de degradação do glicerol, resultando em diferentes produtos. Os autores relacionaram a presença de *Klebsiella pneumoniae* à máxima produção de 1,3-PDO e *Enterobacter* sp. com a de etanol.

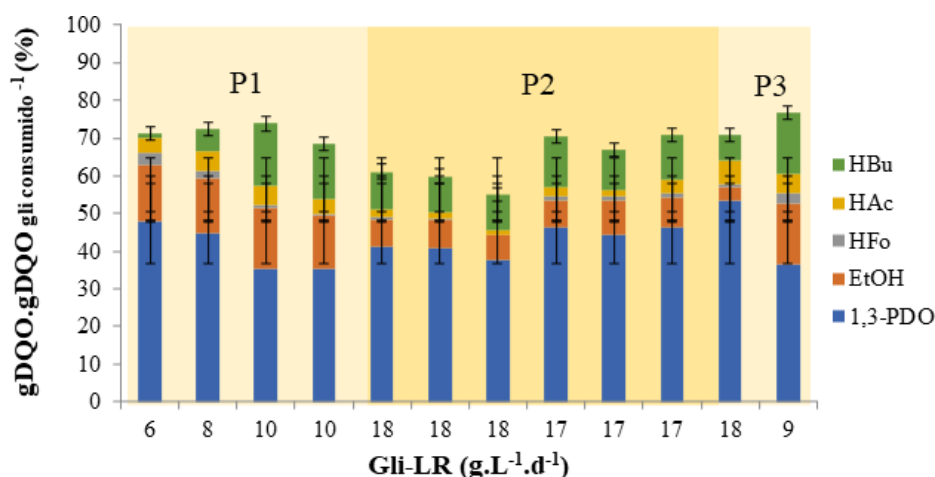
No presente estudo, o balanço de massa (em termos de grama de DQO por grama de glicerol consumido) demonstrou que 1,3-PDO sempre foi o produto principal, mas houve uma maior contribuição de etanol quando as cargas foram ≤ 10 g.L⁻¹.d⁻¹, justificando a diminuição nas frações de 1,3-PDO (Figura 25).

Em resumo, a partir dos nossos resultados e dos já publicados, se o objetivo é produzir etanol, cargas baixas e pH alcalino devem ser aplicados. Em caso de que a produção de 1,3-PDO seja prioritária, deve-se evitar essas condições.

Figura 24 - Correlação de Gli-LR com os rendimentos molares de etanol (a) e 1,3-PDO (b)



Fonte: A autora (2023)

Figura 25 - Balanço de massa do R_T durante as três fases operacionais

Fonte: A autora (2023)

Nota: Os dias 0-7 não foram considerados para o balanço, uma vez que corresponde à fase de adaptação do reator e de baixa eficiência.

5.2.3 Caracterização da comunidade microbiana do reator R_T

Após a filtragem de qualidade, 91914 e 70013 sequências foram consideradas (Tabela 12). Os comprimentos (próximos a 450 bp) permitiram a classificação confiável em unidade taxonômica operacional (OTU) com similaridade maior do que 97%, equivalente ao nível de espécie. Apenas seis (inóculo) e onze (reator) gêneros responderam por 98,6% e 89,5%, respectivamente, do total de sequências. Além disso, *raretons* (sequências presentes apenas uma ou duas vezes) significam 99% do total das sequências atribuídas de forma confiável. Além dessas porcentagens, o índice Gini foi próximo a 1 em ambas as amostras. Estes fatos indicam que a comunidade microbiana foi dominada por poucos gêneros que realizavam a maior parte do trabalho metabólico. O índice Shannon mostrou que a biodiversidade aumentou do inóculo (baixa) ao reator (biodiversidade média-alta). Isto é confirmado pelos índices de uniformidade Shannon e Simpson (Tabela 12).

S_{obs} idêntico ao número de OTUs, índice de cobertura de Good próximo a 100% e as curvas de rarefação, que atingiram um patamar, apontaram que se alcançou um censo completo das bactérias presentes, tanto no inóculo como no reator.

Tabela 12 - Leituras, diversidade e índices de uniformidade para o inóculo e o reator R_T após um ano de operação

	Inóculo	Reator (final)
Total de leituras	102760	81646
Leituras de alta qualidade	91914	70013
Comprimento médio (pb)	463	446
Número de OTUs/S _{obs}	991	1664
<i>Raretons</i> (%)	985 (99,4)	1583 (95,1)
Shannon	1,33±0,01	2,88±0,01
Cobertura de Good (%)	99	98
Simpson	0,469±0,003	0,122±0,001
Shannon <i>eveness</i>	0,193	0,388
Gini	0,981	0,936

Fonte: A autora (2023)

A biodiversidade do inóculo foi muito baixa: 98% do total de sequências confiáveis foi afiliado a apenas dois filos: *Proteobacteria* e, em muito menor extensão, *Firmicutes* (Figura 26(a)). Dentro de *Proteobacteria*, 67% do total de sequências recuperadas pertence ao gênero *Pseudomonas* (Figura 26(d)), micro-organismo aeróbio quimiorganotrófico. Este resultado foi um pouco surpreendente, considerando a origem do inóculo: um biorreator anaeróbio degradador de glicerol.

A biomassa originária do reator anterior, utilizada como inóculo, foi mantida sob refrigeração por cerca de 2 anos. Embora a temperatura ótima para crescimento da maioria de espécies *Pseudomonas* é de 28 °C, algumas espécies são psicrotolerantes, com boa taxa de crescimento a 4 °C (PALLERONI, 2005). Nesta condição, *Pseudomonas* poderia ter crescido utilizando os produtos de decaimento celular das outras bactérias presentes na biomassa, que foram incapazes de sobreviver por um longo período à baixa temperatura e oxigênio. O segundo gênero predominante dentro de *Proteobacteria* foi *Raoultella* (7,1 % do total de sequências), uma bactéria entérica anaeróbia facultativa.

Todas as sequências recuperadas do inóculo incluídas no filo *Firmicutes* foram afiliadas ao gênero *Lactobacillus* (18,2% Figura 26(d)). As bactérias ácido lácticas são fermentativas anaeróbias aerotolerantes. *Raoultella*, antes *Klebsiella* (DRANCOURT *et al.*, 2001), e *Lactobacillus* são típicas bactérias consumidoras de glicerol, muitas vezes detectadas na conversão de glicerol em 1,3-PDO.

A presença destas bactérias em biomassa coletada de um reator produtor de 1,3-PDO é esperada e já foi reportada (GALLARDO *et al.*, 2014; LEE; JUNG; OH, 2018; SUN *et al.*, 2019; VARRONE *et al.*, 2017; VERAS *et al.*, 2019a; VERAS *et al.*, 2020; VIVEK; PANDEY; BINOD, 2016; YANG *et al.*, 2017). A tolerância ao oxigênio pode justificar a resiliência de tais bactérias no inóculo. As duas OTUs majoritárias do gênero *Lactobacillus* tiveram uma homologia superior a 99% com *L. casei/paracasei* e *L. parabuchneri*, ambas heterofermentativas, que poderiam ser responsáveis pelo etanol detectado na fase P1 do reator.

Após um ano de operação, a população bacteriana foi radicalmente modificada. *Proteobacteria* diminuiu drasticamente em paralelo ao aumento do filo *Firmicutes*. Além disso, a biodiversidade aumentou notavelmente, conforme indicado pelos índices de diversidade e uniformidade.

Enquanto *Pseudomonas*, *Lactobacillus* e *Raoultella* caíram a valores residuais (menos de 1%), a ordem *Clostridiales* apareceu como predominante: de 0,2% a 62,6% do total de sequências (Figuras 26(b), (d)). Todos os gêneros pertencentes a esta ordem são anaeróbios obrigatórios, geralmente quimio-organotróficos, ganham energia por fermentação e produzem mistura de ácidos orgânicos, como lactato, formato, acetato ou butirato. As sequências afiliadas à ordem *Clostridiales* no reator foram distribuídas entre cinco famílias diferentes (Figura 26(c)), confirmando a biodiversidade das bactérias presentes ao final da operação e mostrando a adaptação às condições operacionais do reator.

O uso de glicerol como única fonte de carbono e energia promoveu o desenvolvimento de gêneros adaptados a sua degradação. *Lacrimispora* (28,2 % do total de sequências recuperadas do reator) mostrou 98,9% de similaridade com *Lacrimispora sphenoides*. *L. sphenoides* é uma reclassificação de *Clostridium sphenoides* (HAAS; BLANCHARD, 2020), que foi reportada em reator UASB adaptado ao consumo de glicerol (VERAS *et al.*, 2019a).

Membros do gênero *Clostridium* são usualmente detectados em reatores degradadores de glicerol (CHATZIFRAGKOU *et al.*, 2011; DIETZ; ZANG, 2014; SITTIJUNDA; REUNGSANG, 2017; TEE *et al.*, 2017; VARRONE *et al.*, 2018; ZHOU *et al.*, 2017;). *Clostridium pasteurianum* foram predominantes (75,9%) na biomassa aderida a um suporte de silicone de um reator produtor de 1,3-PDO alimentado com glicerol (VERAS *et al.*, 2019a). No presente estudo, 70% das sequências afiliadas ao gênero *Clostridium* mostrou 99,3% de similaridade com *C. pasteurianum*. Outro gênero de presença notável no reator, *Caproiciproducens*, também é capaz de crescer utilizando glicerol (KIM *et al.*, 2015).

A maioria das sequências afiliadas aos outros dois filos encontrados no reator, *Actinobacteria* e *Bacteroidetes*, foi classificada nos gêneros *Actinomyces*, *Dysgonomonas*, *Parabacteroides* e *Bacteroides* (Figura 26(d)). Todas são quimio-organotróficas com metabolismo fermentativo. *Bacteroides* e *Parabacteroides* são anaeróbias obrigatórias, enquanto *Dysgonomonas* e *Actinobacteria* são anaeróbias facultativas. O uso de glicerol não foi reportado para a maioria delas, com exceção (até onde sabemos) de *A. graevenitzii* e *A. neuii*.

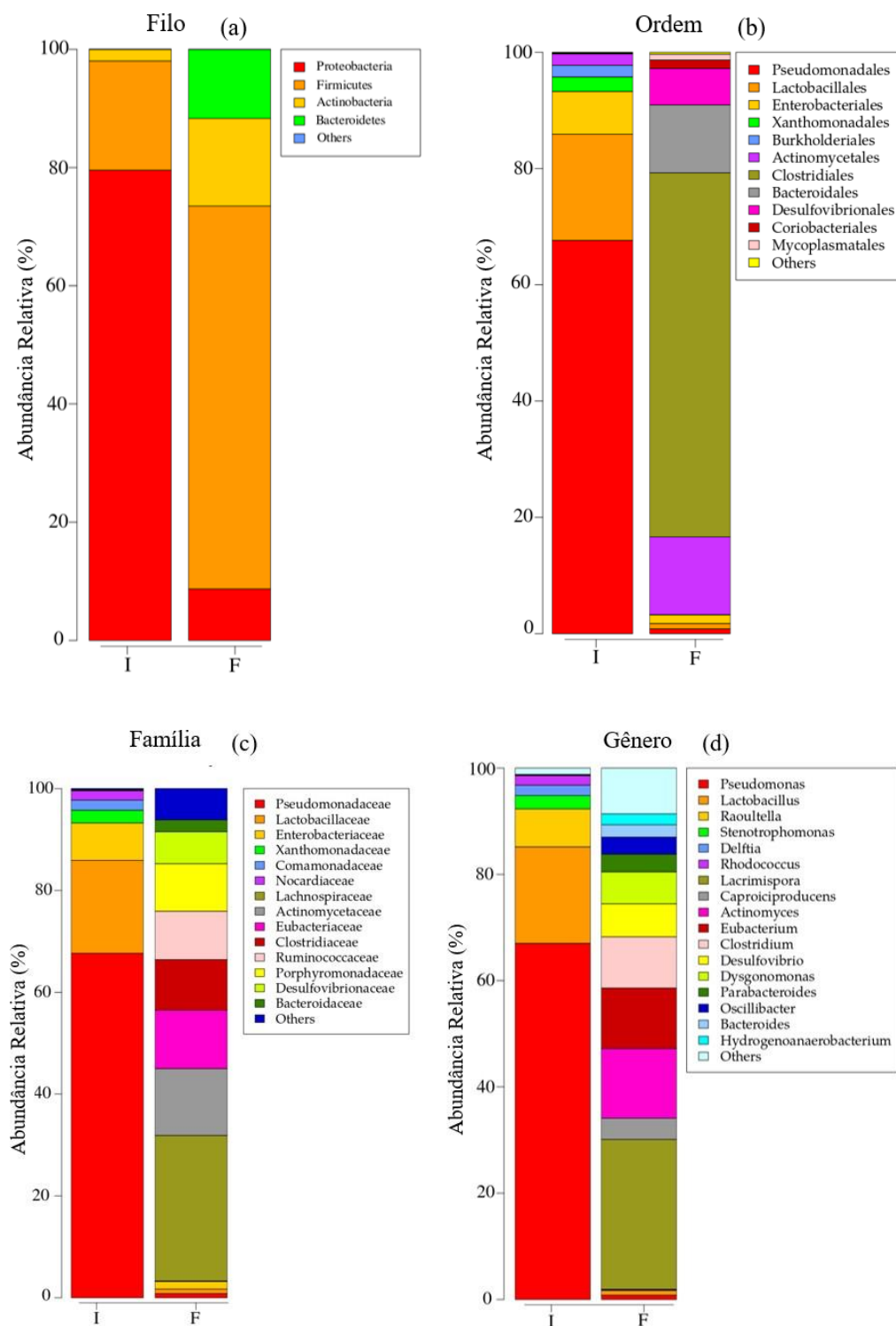
Uma vez que *Actinomyces* crescem bem apenas em meios complexos contendo ricos ingredientes biológicos (SCHALL; YASSIN, 2012) e que *Bacteroides* e familiares são habitantes típicos da microbiota intestinal e das águas residuais, pode-se considerar que estas bactérias sobreviveram no reator utilizando compostos liberados pelo decaimento celular de bactérias incapazes de utilizar glicerol como única fonte de carbono e energia.

Resumidamente, a comunidade microbiana presente no inóculo sofreu uma drástica mudança, como resultado de ter glicerol como única fonte de carbono e energia, e das condições operacionais impostas ao reator ao longo de um ano. *Pseudomonas*, os organismos degradadores aeróbios que foram dominantes no inóculo, desapareceram e foram substituídos por bactérias anaeróbias. Estas incluíram os gêneros conhecidos pela conversão de glicerol a 1,3-PDO, tais como *Lacrimispora* e *Clostridium*, que corresponderam a 40% das sequências recuperadas.

Contudo, uma parte significativa da população microbiana foi de bactérias fermentativas que não utilizam glicerol, bem adaptadas ao crescimento em detrimento de produtos liberados pela decomposição celular de outras bactérias. Isto pode justificar os rendimentos relativamente baixos de 1,3-PDO obtidos e os

produtos da fermentação (etanol, formato, acetato, butirato e lactato) detectados no reator, conforme foi indicado no balanço de massa em DQO (Figura 25).

Figura 26 - Caracterização da comunidade microbiana do reator R_T quanto à filo (a), ordem (b), família (c) e gênero (d)



Fonte: A autora (2023)

Neste estudo foram observadas mudanças nas espécies dominantes da comunidade bacteriana, influenciadas pela carga de glicerol aplicada (gli-LR) e pelas variações de pH ocasionadas pelas diferentes dosagens de NaHCO_3 .

Diante dos resultados obtidos em termos de rendimentos de produtos, a produção de etanol no início do período operacional esteve relacionada não somente às condições aplicadas, mas também às espécies dominantes no inóculo. Os resultados obtidos mostraram que a produção máxima de etanol ocorreu quando a gli-LR foi $< 10 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ e o pH foi levemente alcalino, enquanto a produção de 1,3-PDO foi favorecida quando a gli-LR foi mais elevada.

A comunidade microbiana sofreu uma drástica mudança, como resultado da alimentação com glicerol como única fonte de carbono e energia, bem como das condições operacionais aplicadas ao reator durante um ano. As bactérias aeróbias dominantes no inóculo (*Pseudomonas*) desapareceram e foram substituídas por bactérias anaeróbias, incluindo gêneros conhecidos por converter glicerol a 1,3-PDO, como *Lacrimispora* e *Clostridium*, que foram responsáveis por 40% das sequências.

Os resultados são interessantes para a produção em grande escala: um consórcio microbiano complexo mostrou robustez e adaptação a condições operacionais variáveis. Embora o objetivo deste estudo fosse obter, principalmente, 1,3-PDO como produto da fermentação de glicerol, a tendência observada para o etanol poderia ser útil para a sua produção, caso as condições de alcalinidade ($\text{pH} > 8$) e baixa carga fossem aplicadas para esta finalidade. Devido ao fato de que poucas espécies podem fermentar glicerol e outras podem sobreviver utilizando os compostos liberados pelo decaimento celular de bactérias não fermentadoras de glicerol, estudos adicionais devem ser realizados para esclarecer a relação entre as espécies dominantes e os produtos obtidos a diferentes condições de pH, gli-LR e produtos obtidos.

6 PRODUÇÃO DE 1,3-PROPANODIOL POR FERMENTAÇÃO DE GLICEROL EM REATOR ANAERÓBIO COM BIOFILME ADERIDO AO SUPORTE DE SILICONE

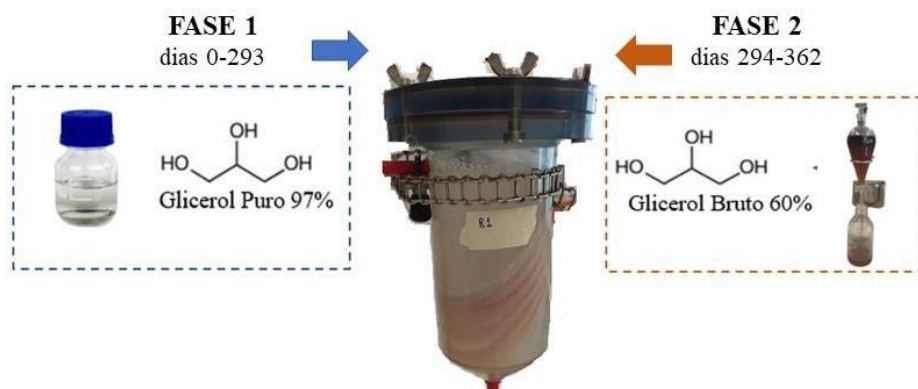
A maioria dos estudos reportados na literatura que tem demonstrado rendimentos de 1,3-PDO a partir da fermentação de glicerol próximos ao rendimento teórico de 0,72 mol 1,3-PDO.mol-gli⁻¹ refere-se a experimentos em batelada e/ou a partir de glicerol puro e culturas microbianas puras, isoladas ou geneticamente modificadas. Também são poucos os estudos em que se utilizam reatores em escala de bancada em modo de operação contínua.

As condições de operação em modo contínuo e com cultura mista de bactérias são de grande importância e necessitam de uma maior exploração científica a fim de promover a aplicação de reatores em grande escala, contribuindo para o aproveitamento do excesso de glicerol gerado (VARRONE *et al.*, 2018).

Além da redução de custos, a robustez das culturas mistas permite que estas utilizem substratos complexos como o glicerol bruto, que contém impurezas provenientes do processo de produção do biodiesel (SITTIJUNDA; REUNGSANG, 2020; VERAS *et al.*, 2019a; ZHOU *et al.*, 2017). Também se faz necessário aprofundar as técnicas e os conhecimentos de imobilização de biomassa visando à melhoria do rendimento de produtos de valor agregado na fermentação (GUNGORMUSLER-YILMAZ *et al.*, 2016).

6.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Nesta seção serão apresentados os resultados obtidos a partir da operação em contínuo do reator anaeróbio R_S, de volume 900-mL, cujo meio suporte contendo a biomassa imobilizada conforme metodologia apresentada na seção 3.4 foi disposto em formato espiral no interior do reator. As condições aplicadas foram descritas na seção 3.4. A operação foi dividida em duas fases, conforme apresentado na Figura 27.

Figura 27 - Esquema experimental da operação do reator R_S

Fonte: A autora (2023)

Inicialmente, o reator foi alimentado com glicerol puro e sem adição de reagente para correção do pH. Foram aplicados pH inicial 7,0 e TDH (em média) de 4,06 dias, enquanto gli-LR média foi de $5,43 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$. A operação do reator foi dividida em duas fases: P1, de 0 a 293 dias, e P2, de 294 a 392 dias. O reator foi alimentado inicialmente com baixa concentração de glicerol para evitar o se colapso. Após isto, as concentrações foram elevadas de 15 a 30 g.L^{-1} (em P1) e depois de 10 a 60 g.L^{-1} (em P2). As condições foram detalhadas na Tabela 13.

A partir do oitavo dia de operação e em diante, adicionou-se bicarbonato de sódio (NaHCO_3) à solução de alimentação (i) para fornecer alcalinidade e evitar a queda de pH; (ii) para manter o pH afluente próximo ao neutro. O sistema foi operado em ambiente com temperatura controlada ($30 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$).

6.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os experimentos cujos resultados serão apresentados a seguir tiveram como objetivo estudar a influência da carga orgânica volumétrica aplicada, utilizando os substratos glicerol puro e bruto, nos rendimentos de 1,3-PDO e subprodutos, além de caracterizar a comunidade microbiana entre as diferentes fases de operação do reator.

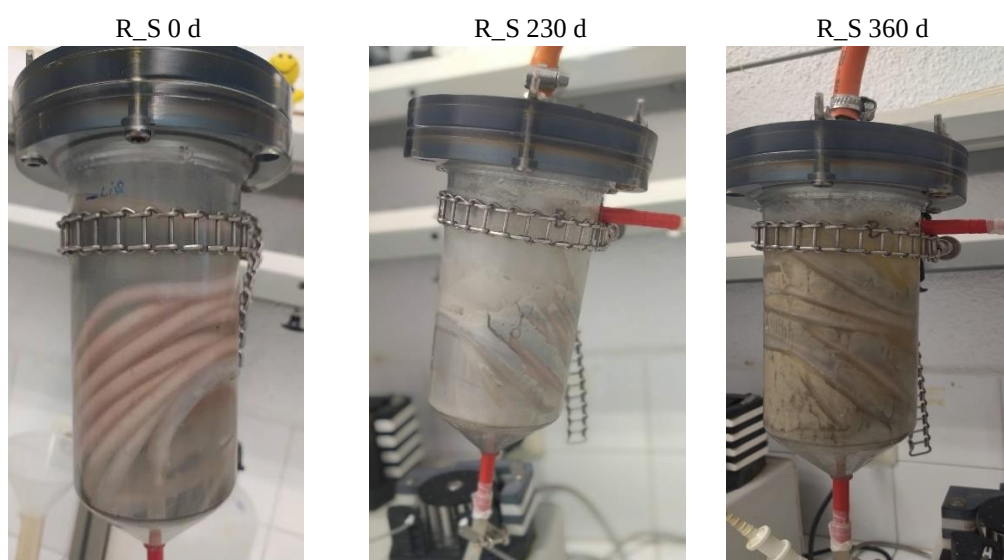
Parte dos resultados foi publicada no periódico *Waste and Biomass Valorization*, intitulado: *Enhanced production of 1,3-propanediol by glycerol*

fermentation using an attached-to-silicone biofilm reactor, sob autoria de: Cândida N. Cordeiro, Shyrlane T.S. Veras, Mario T. Kato, Lourdinha Florencio, José L. Sanz (DOI: 10.1007/s12649-023-02188-3).

6.2.1 Eficiência do reator: efeito da carga orgânica de glicerol

A Figura 28 apresenta a evolução da biomassa no sistema reator-meio suporte ao longo da operação.

Figura 28 - Reator R_S ao longo do período operacional



Fonte: A autora (2023)

Nos sete primeiros dias de operação do reator não se adicionou reagente para fornecer alcalinidade e, portanto, o pH efluente caiu até um valor mínimo 4,5. Por isso, foi adicionado 1 g de NaHCO_3 por g de DQO-glicerol à solução de alimentação, resultando em um aumento de pH afluente na faixa de 8,4-8,6. Entretanto, o pH inicial nesta faixa foi maior do que o ideal para a atuação da enzima glicerol desidratase (6,0 – 8,0), o que poderia limitar a produção de 1,3-PDO (BIEBL *et al.*, 1999; TALARICO *et al.*, 1990).

Por isso, diminuiu-se a quantidade de NaHCO_3 à metade (dia 25) para manter o pH afluente próximo a 8,0 e o efluente a 5,5, aproximadamente. Neste estudo, com o objetivo de minimizar os custos, aplicou-se a mínima dosagem possível de NaHCO_3 para fornecer alcalinidade suficiente.

Com a aplicação de gli-LR média de 16,9 g.L⁻¹.d⁻¹, foram alcançados rendimentos elevados de 1,3-PDO (0,43 mol.mol-gli⁻¹, em média) e estabilidade, com eficiência de consumo de glicerol acima de 90% (Figura 29). Quando a carga gli-LR foi aumentada a 30 g.L⁻¹.d⁻¹, houve uma drástica diminuição do rendimento de 1,3-PDO e do consumo de glicerol, a 0,15 mol.mol-gli⁻¹ e 40% (dias 236-238), respectivamente. Após isto, a gli-LR foi reduzida a 25 g.L⁻¹.d⁻¹ (dias 273-293), resultando em uma recuperação do rendimento de 1,3-PDO a 0,39 mol.mol-gli⁻¹ e consumo de glicerol acima de 90%. Portanto, essa foi considerada a carga máxima de glicerol puro que poderia ser aplicada ao reator.

Tabela 13 - Condições operacionais aplicadas e eficiência do reator R_S durante as fases P1 e P2

Tempo (d)	Gli-LR (g L ⁻¹ d ⁻¹)	pH _(afluente)	pH _(efluente)	Glicerol consumido (%)	1,3-PDO	
					Rendimento (mol.mol ⁻¹)	Produtividade (g.L ⁻¹ .d ⁻¹)
Glicerol Puro						
0-96	5,43 ± 1,66	8,04 ± 0,38	6,77 ± 0,88	95,98 ± 6,26	0,35 ± 0,09	1,15 ± 0,53
97-196	9,56 ± 1,54	7,73 ± 0,39	6,64 ± 0,57	99,50 ± 1,96	0,37 ± 0,11	2,28 ± 0,85
197-230	16,90 ± 1,08	7,72 ± 0,29	5,94 ± 0,60	98,84 ± 2,44	0,43 ± 0,07	4,53 ± 0,82
231-272	30,06 ± 5,49	8,02 ± 0,26	6,08 ± 0,68	84,97 ± 0,11	0,33 ± 0,09	5,63 ± 2,38
273-293	25,73 ± 0,92	7,72 ± 0,14	5,48 ± 0,32	92,56 ± 7,62	0,39 ± 0,05	5,93 ± 1,34
Glicerol Bruto						
294-307	10,36 ± 0,44	7,88 ± 0,13	6,75 ± 0,08	100	0,48 ± 0,08	2,97 ± 1,23
308-316	19,65 ± 0,40	7,95 ± 0,13	7,04 ± 0,13	99,80 ± 0,32	0,49 ± 0,04	5,55 ± 1,33
317-323	26,75 ± 1,19	8,08 ± 0,24	7,23 ± 0,19	99,60 ± 0,55	0,54 ± 0,01	8,75 ± 0,84
324-342	32,82 ± 2,37	8,03 ± 0,17	7,20 ± 0,32	99,76 ± 0,09	0,56 ± 0,02	10,48 ± 1,98
343-350	39,70 ± 2,84	8,02 ± 0,22	7,12 ± 0,12	99,79 ± 0,06	0,58 ± 0,02	13,94 ± 0,99
351-355	46,00 ± 0,23	8,36 ± 0,14	7,22 ± 0,20	88,90 ± 0,10	0,62 ± 0,03	14,68 ± 2,03
356-362	59,91 ± 3,23	8,11 ± 0,04	7,45 ± 0,03	50,30 ± 0,03	0,44 ± 0,04	10,95 ± 4,55

Fonte: A autora (2023)

Alguns estudos relataram rendimentos próximos ou menores do que os obtidos neste trabalho: Gallardo *et al.* (2014) obtiveram rendimento de 1,3-PDO de 0,52 mol.mol-gli⁻¹ utilizando cultura mista em reator tipo EGSB, continuamente alimentado. Nakazawa *et al.* (2017) obtiveram máximo rendimento médio de 1,3-PDO de 0,43 mol.mol-gli⁻¹ em reator tipo UASB, em ambos se trabalhou com reatores de lodo granular anaeróbio.

Após atingir a máxima gli-LR com glicerol puro (25 g.L⁻¹.d⁻¹), foi iniciada a operação da fase P2, com glicerol bruto como substrato. A princípio, adotou-se uma carga menor (aproximadamente 10 g.L⁻¹.d⁻¹) para evitar que as impurezas contidas

no glicerol bruto causassem inibição da atividade bacteriana. Ao alcançar a estabilidade nos rendimentos de 1,3-PDO ($0,48 \pm 0,08 \text{ mol.mol-gli}^{-1}$) e no consumo de glicerol, a gli-LR foi aumentada (Tabela 13). Ao elevar a gli-LR até $39,7 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, o reator teve eficiência de consumo de glicerol maior do que 99% e rendimento médio de 1,3-PDO de $0,53 \text{ mol.mol-gli}^{-1}$. Embora a máxima carga aplicada foi de $59,9 \pm 3,2 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, pode-se considerar que a carga ótima para glicerol bruto foi $46,0 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, uma vez que foram alcançados os valores máximos de produtividade média ($14,7 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) e de rendimento médio de 1,3-PDO ($0,62 \text{ mol.mol-gli}^{-1}$). Este último é um resultado notável, uma vez que está próximo do máximo rendimento teórico de $0,72 \text{ mol.mol-gli}^{-1}$ (ZENG, 1996) e por ter sido obtido em um reator contínuo com cultura mista.

Estudos anteriores a este obtiveram menores rendimentos de 1,3-PDO a partir de glicerol bruto. Por exemplo, Metsoviti *et al.* (2013) obtiveram $0,48 \text{ mol.mol-gli}^{-1}$ em seus trabalhos com uma cultura isolada de *Citrobacter freundii*. Veras *et al.* (2019a) obtiveram um rendimento similar quando trabalharam com cultura mista em reator UASB com biomassa aderida. Sittijunda; Reungsang (2017, 2020) obtiveram rendimentos de $0,36 \text{ mol.mol-gli}^{-1}$ e $0,25 \text{ mol.mol-gli}^{-1}$ aplicando carga de glicerol bruto de $50 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, com culturas mistas termofílicas e mesofílicas, respectivamente.

O rendimento de 1,3-PDO depende da combinação das rotas redutiva e oxidativa. Moscoviz; Trably; Bernet (2016), trabalhando com experimentos em batelada, relataram que o rendimento de 1,3-PDO foi máximo quando acetato foi o único subproduto, mas diminuiu quando etanol e formato foram coproduzidos. No presente trabalho, durante a fase P1, houve produção considerável de etanol e ácido fórmico quando foi aplicada gli-LR média de $5,0 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ (Figura 30(a)), o que pode ter afetado o rendimento de 1,3-PDO. Quando a carga foi aumentada a cerca de $17,0 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, as concentrações de etanol e ácido fórmico diminuíram e o rendimento de 1,3-PDO aumentou. Assim, esta foi considerada a gli-LR ótima para a produção de 1,3-PDO durante a fase P1.

Na fase P2 (Figura 29), a rota redutiva foi favorecida. Uma explicação para isto é que houve uma mudança na comunidade microbiana, como também foi observado por Veras *et al.* (2019). Isto explica por que o rendimento de 1,3-PDO foi muito mais elevado, mesmo quando a carga de glicerol aumentou, especialmente quando acetato foi o principal subproduto, e um percentual elevado (85-90%) de glicerol bruto foi

convertido em produtos, com o remanescente sendo utilizado para a manutenção e crescimento bacteriano (Figura 30(b)).

Portanto, a produtividade e o rendimento elevados alcançados neste estudo, com glicerol bruto, junto à baixa quantidade de NaHCO_3 adicionada, sugeriram um potencial promissor para a produção de 1,3-PDO em escala real, fornecendo as condições operacionais ótimas para a viabilidade do processo. Estudos adicionais precisariam ser realizados para avaliar a viabilidade econômica da aplicação de um meio suporte de silicone para aumentar o rendimento de 1,3-PDO da fermentação de glicerol em escala real.

6.2.2 Efeitos do glicerol bruto e da imobilização da biomassa na eficiência do reator

Estudos anteriores relataram o efeito das impurezas contidas no glicerol sob o metabolismo das bactérias e a importância de um pré-tratamento (PAN *et al.*, 2019; SAMUL; LEJA; GRAJEK, 2014; SITTIJUNDA; REUNGSANG, 2020). Condições de estresse devido a algumas características do glicerol bruto, capazes de afetar o metabolismo das bactérias, também foram descritas (SUN *et al.*, 2019).

Veras *et al.* (2019a) demonstraram em reator UASB que a mudança na alimentação de glicerol puro ao bruto teve um efeito muito expressivo nas populações de *Clostridium* spp. com parte sendo substituída por *K. pneumoniae* e *Lactobacillus* spp. Apesar das mudanças ocorridas na comunidade, como as espécies consumidoras de glicerol foram substituídas por outras com a mesma capacidade, os rendimentos de 1,3-PDO foram similares com glicerol puro e bruto.

No presente estudo, a pré-acidificação com HCl foi realizada para eliminar a gordura residual do glicerol bruto, para evitar a inibição de bactérias e a flotação da biomassa no reator. A Tabela 14 apresenta os resultados da caracterização após a acidificação do glicerol bruto utilizado, que continha alguns nutrientes como fósforo, sódio e enxofre. Após a devida diluição e suplementação com macro e micronutrientes, sua utilização no reator com cultura mista mostrou-se viável. As impurezas remanescentes não causaram influência negativa na atividade das bactérias produtoras de 1,3-PDO; ao invés disso, os resultados mostraram o

favorecimento da fermentação de glicerol mesmo quando aplicada carga gli-LR tão elevada quanto 50 g.L⁻¹.d⁻¹.

Tabela 14 - Caracterização do glicerol bruto

Glycerol ¹	60
Cr	0,05
Cu	0,49
Fe	6,99
K	141
Mg	10,80
Mn	0,120
Na	22374
Ni	0,03
P	9,70
Pb	0,13
S	99

Fonte: A autora (2023)

¹ valores em mg.L⁻¹, exceto glicerol em %

Com relação às condições operacionais, a estratégia utilizada de aplicação de gli-LR menor após trocar o glicerol puro pelo bruto, aumentando progressivamente, pode ter favorecido a adaptação das bactérias (SZYMANOWSKA-POWAŁOWSKA, 2015) capazes de tolerar cargas elevadas, resultando em uma produtividade de 1,3-PDO muito alta (15 g.L⁻¹.d⁻¹) para este tipo de reator e condições operacionais. Ainda existem poucos estudos que apresentem rendimentos elevados de 1,3-PDO a partir da fermentação de glicerol bruto por cultura mista, bem como sobre as condições ótimas de operação de reator anaeróbio contínuo com biomassa imobilizada (GUNGORMUSLER-YILMAZ *et al.*, 2016; ZHU *et al.*, 2021).

Veras *et al.* (2019a) usando glicerol puro e bruto, obtiveram rendimentos elevados de 1,3-PDO (0,54 e 0,48 mol.mol-gli⁻¹), porém com cargas muito menores (18 e 20 g.L⁻¹.d⁻¹, respectivamente) e pH efluente 5,0-5,5.

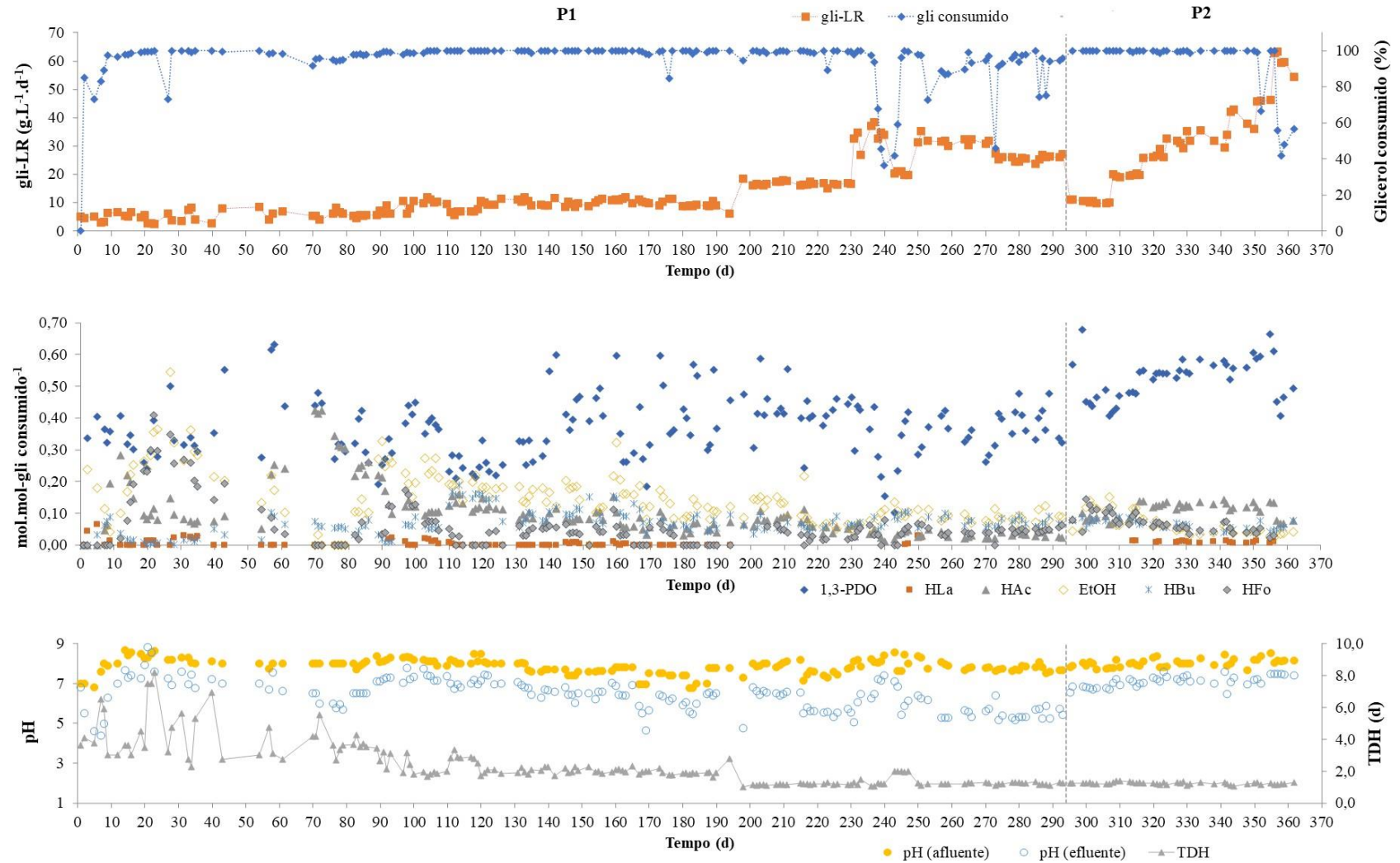
Rendimentos elevados de 1,3-PDO e bom funcionamento do reator têm sido demonstrados quando se utiliza imobilização da biomassa, sugerindo uma habilidade dos produtores de 1,3-PDO em aderirem a certos suportes (CASALI, 2012; GUNGORMUSLER; GONEN; AZBAR, 2011a, 2011b; VERAS *et al.*, 2020). Algumas explicações relacionadas à adesão de micro-organismos como biofilme em

silicone foram relacionadas ao efeito combinado da pressão e formação de gás dentro da mangueira de silicone e a configuração em que foi disposta dentro do reator, que resultou em uma eficiente retenção da biomassa ativa (VERAS, 2019).

Neste trabalho, uma fração do glicerol consumido foi convertida a etanol, ácido fórmico e outros subprodutos minoritários, além de uma fração para o crescimento bacteriano. A proporção entre 1,3-PDO e subprodutos indesejados dependeu das condições operacionais impostas e do tipo de substrato. Durante a fase P1, o rendimento de 1,3-PDO aumentou de 0,35 a 0,43 mol.mol gli⁻¹ (Figura 30(a)). Durante a fase P2, os rendimentos e produtividade de 1,3-PDO (Figura 29, Tabela 13) mostraram que as condições foram favoráveis ao crescimento dos micro-organismos consumidores de glicerol bruto e produtores de 1,3-PDO. Portanto, para ambas as fases, o uso do meio suporte de silicone para a adesão de bactérias consumidoras de glicerol mostrou uma grande eficácia.

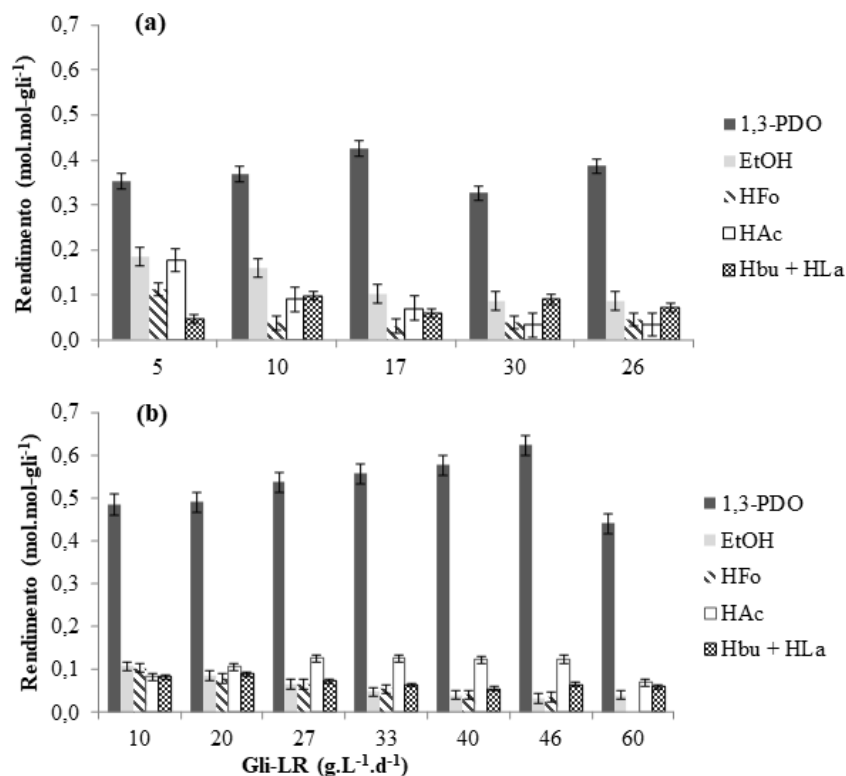
Assim, os resultados com glicerol bruto (P2) mostraram que o cultivo microbiano e a imobilização celular em mangueira de silicone parecem ser promissores para aumentar a produção de 1,3-PDO a partir de uma matéria-prima de baixo custo, como o glicerol bruto. Estudos adicionais precisam ser realizados quanto à aplicação em grande escala.

Figura 29 - Condições operacionais (gli-LR, pH e TDH), consumo de glicerol e rendimentos de metabólitos durante a operação do reator R_S



Fonte: A autora (2023)

Figura 30 - Rendimentos de 1,3-PDO e outros subprodutos em função da carga de glicerol aplicada com (a) glicerol puro e (b) glicerol bruto



Fonte: A autora (2023)

6.2.3 Caracterização da comunidade microbiana do reator R_S

A Tabela 15 resume o total de leituras geradas por Illumina, as sequências consideradas para análise após remoção das leituras de baixa qualidade e os comprimentos médios, que foram adequados para análise filogenética confiável a nível de gênero. Os índices mais utilizados em ecologia molecular microbiana também foram incluídos.

Tabela 15 - Dados numéricos das sequências, biodiversidade, abundância e índices de cobertura das biomassas analisadas

	S1	S2	S3	S4	S5	S6
Total de leituras (sequências)	128453	106423	84623	140013	135274	154812
Leituras de alta qualidade	111538	96518	76599	130198	125517	138217
Comprimento médio (bp)	462	448	447	444	446	444
S _{obs}	1292	1859	1697	2947	2875	2933
Chao	25769	13954	12744	24287	20231	23261
	±2412	±2351	±2244	±3542	±2740	±3317
Cobertura	0,9893	0,9836	0,9813	0,9810	0,9809	0,9821
Shannon (H)	1,7011	2,4278	2,4437	3,4640	3,1142	2,6446
	±0,008	±0,013	±0,015	±0,008	±0,011	±0,010
Simpson	0,2593	0,2372	0,2289	0,0603	0,1087	0,1691
	±0,001	±0,002	±0,003	±0,001	±0,001	±0,001
Shannon evenness	0,2374	0,3225	0,3286	0,4336	0,3910	0,3312
Gini	0,9862	0,9541	0,9585	0,9454	0,9502	0,9858

Fonte: A autora (2023)

As amostras foram codificadas conforme descrito na seção 3.8, sendo: biofilme aderido à mangueira usada como inóculo (S1), biofilme aderido à mangueira e biomassa em suspensão coletados ao final do período de alimentação com glicerol puro (S2 e S3, respectivamente), biofilme aderido à mangueira, biomassa em suspensão e biomassa sedimentada coletados ao final da operação/alimentação com glicerol bruto (S4, S5 e S6, respectivamente).

A abundância específica (S_{obs}), índices Shannon (H) e Chao 1, mostraram maior diversidade ao final da operação do reator (S4, S5) em comparação à população microbiana do reator alimentado com glicerol puro (S2, S3). O índice Gini, próximo a 1 em todas as amostras, evidencia uma alta desigualdade, especialmente para as amostras S1 e S6, o índice Simpson confirma essa afirmação. O índice de cobertura de Good estimou que menos de 2% de OTUs provavelmente não foram cobertas durante o sequenciamento. Da mesma forma, as curvas de rarefação mostraram que se alcançou quase o censo completo das bactérias.

6.2.3.1 Comunidade microbiana do biofilme aderido – inóculo (amostra S1)

A diversidade bacteriana do inóculo foi baixa, o filo *Firmicutes* representou 72% das sequências e, junto ao filo *Proteobacteria*, representaram 97,7% do total de

sequências. Das sequências afiliadas a *Clostridiales*, o gênero *Clostridium* representou somente 0,3% das sequências, o que foi um resultado surpreendente, uma vez que se esperava uma maior representatividade de *Clostridium*, por ser consumidor de glicerol.

Lactobacillales e *Enterobacteriales* foram as ordens mais predominantes. Todas as sequências incluídas nestas ordens foram afiliadas, respectivamente, às famílias *Lactobacillaceae* e *Enterobacteriaceae*. Apenas dois gêneros: *Lactobacillus* (70,6%) e *Raoultella* (23,3%) foram considerados relevantes.

A taxonomia dos gêneros *Raoultella*/*Klebsiella* é confusa; árvores filogenéticas sugeriram que o gênero *Klebsiella* deve ser reorganizado. Então, Drancourt *et al.* (2001) criaram o gênero *Raoultella* para incluir algumas espécies de *Klebsiella*. Recentemente, Ma *et al.* (2021) propuseram a reunificação de ambos os gêneros. A fim de facilitar a discussão, neste estudo considerou-se ambos os gêneros como apenas um.

Os gêneros *Klebsiella* e *Lactobacillus* são usualmente reportados na produção de 1,3-PDO por fermentação de glicerol (WESTBROOK *et al.*, 2019; ZHU *et al.*, 2021).

Três de quatro OTUs majoritários do inóculo foram classificados como *Lactobacillus* e apresentaram similaridade maior do que 99% com *L. parabuchneri*, *L. casei/paracasei* e *L. coryniformis*, respectivamente. Tais espécies foram identificadas em reator degradador de glicerol com elevada produção de 1,3-PDO (VERAS *et al.*, 2019a).

A abundância de *Lactobacillus* no inóculo (70% das sequências) não foi surpreendente, uma vez que espécies *L. brevis* (SZYMANOWSKA-POWAŁOWSKA *et al.*, 2013), *L. reuteri* (RICCI *et al.*, 2015; SUPPURAM *et al.*, 2019), *L. diolivorans* (PFLUG *et al.*, 2014), *L. parabuchneri*, *L. casei/paracasei*, e *L. coryniformis* (VERAS *et al.*, 2019a), dentre outros, foram previamente reportadas em reatores anaeróbios degradando glicerol.

Contudo, o glicerol não pode ser utilizado como única fonte de carbono por *Lactobacillus* spp, que necessitam de substrato adicional na fermentação, para seu crescimento e geração de equivalentes redutores para a produção de 1,3-PDO (VEIGA DA CUNHA; FOSTER, 1992; ZHU *et al.*, 2021). Sua predominância elevada no inóculo pode ser atribuída à manutenção da biomassa usada como inóculo, que esteve sob refrigeração por dois anos.

Tais bactérias podem ter sobrevivido devido a (i) lactobacilos serem aerotolerantes, (ii) algumas serem psicrotolerantes, e.g. *L. casei*, *L. paracasei*, *L.*

parabuchneri, *L. brevis*, *L. diolivorans*, e (iii) fermentação de componentes de carboidratos a partir de células em decomposição de bactérias estritamente anaeróbias para obter energia.

6.2.3.2 Comunidade microbiana do reator alimentado com glicerol puro (amostras S2, S3, S4) e glicerol bruto (S5 e S6)

Após 295 dias de alimentação do reator com glicerol puro, o filo *Firmicutes* permaneceu como majoritário, cobrindo mais de 75% em ambas as amostras (Figura 6.5b). Uma drástica mudança ocorreu a nível de ordem: *Lactobacillales* foram quase completamente substituídas por *Clostridiales*, com o gênero *Clostridium* majoritário (47% das sequências). Comparando-se ao inóculo (S1), observou-se maior diversidade. Outros gêneros afiliados a *Clostridiales*, como *Eubacterium* e diversos membros da família *Ruminococcaceae*: *Caproiciproducens*, *Oscillibacter*, abrangeram 20% das sequências (Figura 31(d)).

A nível de filo, *Proteobacteria* diminuiu à metade, enquanto sequências afiliadas a *Actinobacteria* aumentaram quatro vezes (Figura 31(a)). As sequências afiliadas a enterobactéria *Klebsiella/Raoultella* diminuíram de 23,3% no inóculo a 9,7% e 7,4% na biomassa aderida (S2) e em suspensão (S3), respectivamente. Por outro lado, actinobactérias *Actinomyces* e *Olsenella* aumentaram de 0,4% no inóculo a 8% e 9,3% em S2 e S3, respectivamente (Figura 31(d)). O filo *Bacteroidetes* (*Bacteroides*, *Dysgonomonas*), passou de menos que 0,01% no inóculo a 1% (Figura 31(b)).

Quanto a *Lactobacillus*, que antes predominaram no inóculo (S1), após não menos do que 10 meses de operação do reator alimentado exclusivamente com glicerol, com a consequente adaptação da comunidade microbiana ao uso de glicerol como única fonte de carbono e energia, o número de sequências afiliadas a *Lactobacillus* reduziu a cerca de um décimo (amostras S2, S3 e S4, Figura 31). Além disso, praticamente desapareceram nas biomassas suspensas e sedimentadas ao final da operação do reator.

O filo *Firmicutes*, ordem *Clostridiales*, permaneceu como majoritário após a alimentação com glicerol bruto na biomassa em suspensão e aderida (cerca de 70%). Contudo, a família *Clostridiaceae* diminuiu notavelmente, especialmente na biomassa em suspensão (S5), onde foi reduzida a um terço. Em seu lugar, surgiram outras famílias *Clostridiales*, i.e., *Eubacteriaceae*, *Lachnospiraceae* e *Porphyromonadaceae*.

Outros *Firmicutes*, afiliados à ordem *Clostridiales*, surgiram no reator. O sistema mostrou maior uniformidade e menor desigualdade: cinco famílias dentro desta ordem tiveram presença significativa no reator (Figura 31(c)). *Clostridium* foi o gênero dominante; 98% das sequências pertencente a esse gênero foram afiliadas a *C. pasteurianum* na biomassa aderida, enquanto *C. sulfidigenes*, *C. sporogenes* (S4) e *C. sulfidigenes* (S5) também foram encontrados na biomassa em suspensão. A alimentação com glicerol bruto resultou em um notável decaimento nas sequências afiliadas a *Clostridium* (41% e 64% nas biomassas aderida e suspensa, respectivamente), com o consequente desenvolvimento de outros clostridials.

Embora o gênero *Clostridium* tenha permanecido majoritário na biomassa aderida (S4), outros gêneros, e.g., *Lacrimispora* e *Hydrogenoanaerobacterium*, muito raros no inóculo e no reator quando foi alimentado com glicerol puro, estiveram entre os mais numerosos no reator quando alimentado com glicerol bruto. Além disso, *Eubacterium* foi dominante (27,6%) na biomassa suspensa coletada do reator (S5).

Especialmente notáveis foram os gêneros de *Eubacterium*, de menos do que 1% no inóculo passaram a ser dominantes em S5; *Caproiciproducens*, de menos do que 0,1% a cerca de 10%; *Lacrimispora* e *Hydrogenoanaerobacterium*, os dois últimos sofreram um grande aumento, de menos de 0,1% a 9,4% após a alimentação com glicerol bruto (Figura 31(d)).

Todos esses gêneros são obrigatoriamente anaeróbios quimiorganotróficos, produzem grandes quantidades de ácidos, e.g. butírico, acético, fórmico ou capróico e, algumas espécies, etanol e/ou H₂. Para a maioria das espécies descritas, o uso de glicerol não foi avaliado. Assim, sabe-se que das 45 espécies de *Eubacterium* descritas, apenas 5 haviam sido testadas, com o mesmo resultado: não fermentam glicerol (WADE, 2009).

Lacrimispora é um novo gênero para espécies erroneamente classificadas em *Clostridium*, que filogeneticamente se encontravam dentro da família *Lachnospiraceae* (HAAS; BLANCHARD, 2020). Já foi reportado que *L. sphenoides* não fermentam glicerol. Em geral, para espécies incluídas na família *Lachnospiraceae*, glicerol não é utilizado para crescimento e, até onde se sabe, há apenas uma exceção: *Roseburia cecicola*.

Similarmente, como uma regra geral, membros da família *Ruminococcaceae* não fermentam glicerol, e.g., *Hydrogenoanaerobacterium* (SONG; DONG, 2009). Contudo,

Caproiciproducens, segundo terço mais abundante na comunidade microbiana do reator, o fermentam (KIM *et al.*, 2015). Além disso, *Ruminococcus* spp. foram identificadas como utilizadores de glicerol (ENGELS *et al.*, 2016).

É difícil afirmar se as bactérias dominantes no reator depois da alimentação com glicerol como única fonte de carbono e energia durante um ano, cresceram às custas do glicerol ou utilizando os produtos liberados após a morte de parte das bactérias fermentadoras de glicerol.

O segundo filo mais abundante, *Proteobacteria*, teve sua presença diminuída quando o reator foi alimentado com glicerol bruto. Esta diminuição foi associada com a redução da família *Enterobacteriaceae*, gêneros *Klebsiella*/*Raoultella* (menos de 1%), especialmente na biomassa em suspensão, onde praticamente desapareceram.

Klebsiella-Raoultella, o segundo gênero mais abundante no inóculo, manteve presença significativa no reator alimentado com glicerol puro (9,7-7,4%), mas após o período de alimentação com glicerol bruto, chegou ao mínimo na biomassa aderida (S4) e residual na biomassa em suspensão (S5). O potencial inibitório do glicerol bruto sobre a produção de 1,3-PDO por *K. pneumoniae* foi destacado por Laura *et al.* (2020).

As sequências afiliadas a outros filós aumentaram notavelmente como resposta da comunidade microbiana do reator ao uso de glicerol como única fonte de carbono e energia e às condições operacionais impostas por um longo período. *Actinobacteria*, gênero *Actinomyces*, aparentemente não depende do uso de glicerol puro ou bruto: a cobertura foi similar e a espécie mais provável foi, em ambos os casos, *A. polynesiensis* (99% de similaridade). Muitas *Actinomyces* são anaeróbias facultativas, embora *A. polynesiensis* cresça somente anaerobicamente, produzindo ácidos a partir de glicerol (CIMMINO *et al.*, 2016).

Por outro lado, as abundâncias de *Thermodesulfator* (filo *Thermodesulfobacteria*), *Bacteroides* e *Dysgonomonas* (filo *Bacteroidetes*) parecem ter sido fortemente influenciadas pela alimentação, aumentando significativamente na comunidade microbiana após a alimentar o reator com glicerol bruto.

O papel de *Bacteroidales* como produtores de 1,3-PDO a partir de glicerol não foi reportado. De fato, *Bacteroides graminisolvens* e *Dysgonomonas oryzae*, a duas OTUs bacteroidales mais abundantes, não utilizam glicerol (KODAMA *et al.*, 2012). Contudo,

elas foram dominantes em digestores anaeróbios alimentados com resíduos ricos em glicerol (FERGUSON *et al.*, 2018).

A presença do filo *Bacteroidetes* e *Thermodesulfobacteria* aumentou, surgindo o gênero *Bacteroides* na biomassa suspensa (S4) e *Thermodesulfatator* na biomassa aderida (S5). A presença proeminente na comunidade microbiana do *Thermodesulfator*, bem como o incremento de *Desulfovibrio* e *Clostridium desulfidigenes* (45% das sequências dentro do gênero *Clostridium* em S5), após alimentar o reator com glicerol bruto está relacionada com o conteúdo de sulfato no glicerol bruto utilizado.

Thermodesulfobacteria, assim como *Desulfovibrio* se classificam em estritamente anaeróbios e são incapazes de utilizar acetato como doador de elétrons, ao invés disso, utilizam lactato, piruvato e etanol como doadores e reduzem o sulfato a H_2S . Certas espécies de *Desulfovibrio* são peculiares dentre os redutores de sulfato, por sua capacidade de crescer quimiolitotrófica e autotroficamente, utilizando H_2 como doador de elétrons, sulfato como aceptor de elétrons e CO_2 como única fonte de carbono (MADIGAN *et al.*, 2016). Assim, a presença desses micro-organismos em decorrência da alimentação com glicerol bruto também teve uma importante contribuição no favorecimento da rota redutiva e produção de 1,3-PDO.

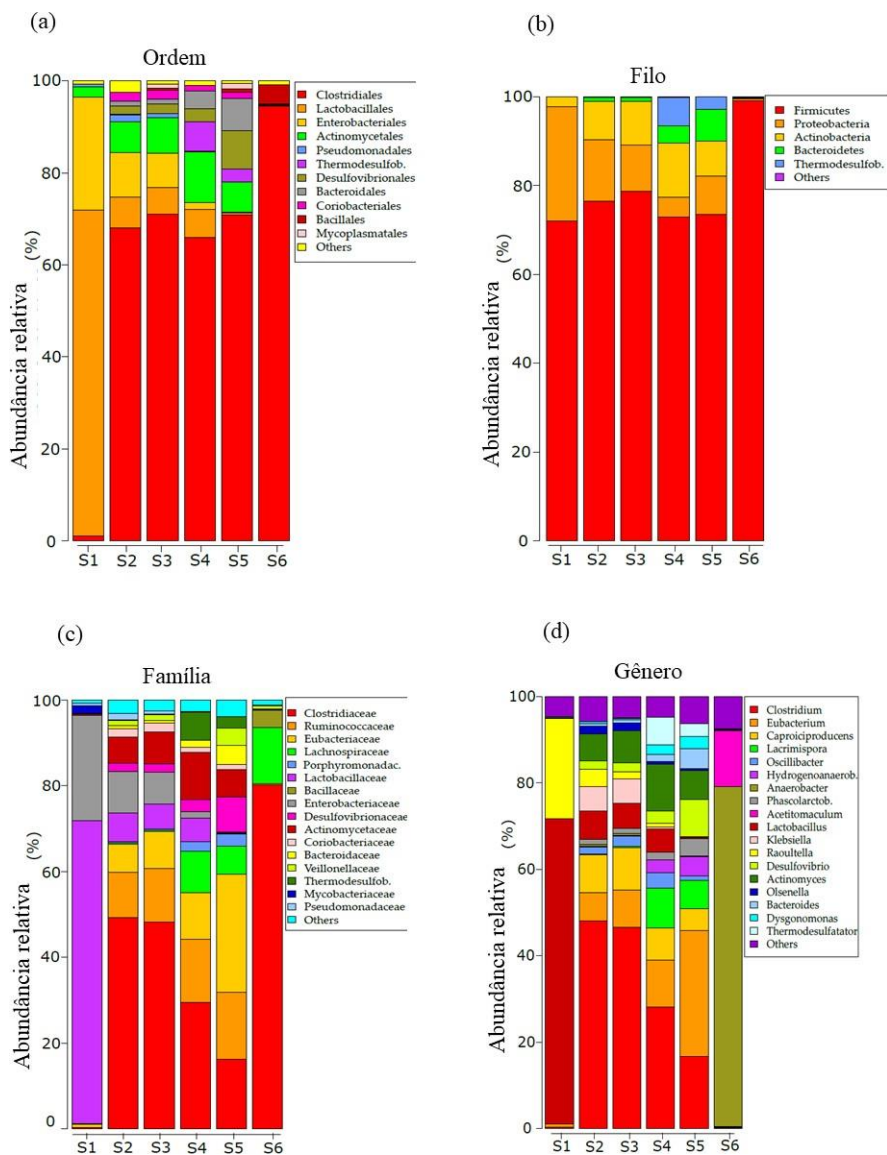
A amostra da biomassa que se acumulou progressivamente ao fundo do reator, analisada após um ano de operação (S6) forneceu um resultado relevante para a discussão: 99% das sequências recuperadas dessa biomassa pertenceram ao filo *Firmicutes*, ordem *Clostridiales*, família *Clostridiaceae*, com dominância dos gêneros *Anaerobacter* (78,7%) e, em menor extensão, *Acetitomaculum* (12,9%).

Anaerobacter é anaeróbio obrigatório fermentador de carboidratos. Plecha *et al.* (2013) reportaram que o enriquecimento de cultura de amostras do solo foi dominado por *Sarcina*, *Anaerobacter* e *Clostridium*. *Anaerobacter* cresceu na faixa de pH de 5,5 a 8,5, com temperatura ótima de 25 a 35 °C. O pH (5,5) e a temperatura (30 °C) do reator podem ajudar a entender seu predomínio na amostra S6.

Acetitomaculum é um acetogênico que forma acetato a partir de H_2 e CO_2 . A predominância de ambos os gêneros na biomassa acumulada no fundo do reator sugere que eles podem participar da utilização de componentes de decomposição celular e da liberação de hidrogênio durante a fermentação desses componentes no reator.

Diante do exposto, em uma visão geral dos grupos bacterianos encontrados nas amostras, revelou-se que a diversidade bacteriana do inóculo foi menor do que a das amostras coletadas ao longo da operação do reator, demonstrando o aumento da biodiversidade relacionado às condições operacionais e à alimentação com glicerol puro ou bruto como única fonte de carbono e energia.

Figura 31 - Perfis taxonômicos a nível de ordem (a), filo (b), família (c) e gênero (d)



Fonte: A autora (2023)

O reator anaeróbio de fluxo ascendente inoculado com biomassa aderida a suporte de silicone destacou-se como uma configuração promissora para a produção de 1,3-PDO pela fermentação de glicerol, especialmente considerando que (i) foi operado continuamente; (ii) uma cultura ativa mista e densa se desenvolveu muito bem na mangueira de silicone e; (iii) utilizou-se glicerol bruto.

Foram obtidos altos rendimentos e produtividades de até $0,62 \text{ mol.mol}^{-1}\text{gli}^{-1}$ e $14,7 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, respectivamente. A aplicação de cargas elevadas até $46 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ de glicerol bruto sem afetar negativamente a atividade dos micro-organismos abre a possibilidade de seu uso em escala industrial.

A análise da comunidade microbiana do reator mostrou as tendências observadas nas diferentes fases operacionais do reator. Embora para o inóculo tenha se observado baixa diversidade microbiana, com dominância de *Lactobacillus* (cerca de 70% de abundância) e *Klebsiella/Raoultella* (cerca de 23%), após 295 dias de operação com glicerol puro, houve uma mudança na comunidade aderida ao meio suporte, com diminuição significativa da abundância de *Klebsiella/Raoultella*.

No final da alimentação com glicerol puro (fase P1), uma maior diversidade microbiana foi observada, com presença de micro-organismos consumidores de glicerol, demonstrando que as condições operacionais aplicadas foram adequadas à seleção de uma comunidade consumidora do substrato disponível.

Contudo, foi durante a alimentação com glicerol bruto (fase P2), que o rendimento máximo de 1,3-PDO foi alcançado e onde houve uma diversidade ainda maior em relação à fase de alimentação com glicerol puro, inclusive com a drástica mudança observada.

Ao final da fase P2, a família *Clostridiaceae* diminuiu notavelmente, principalmente na biomassa suspensa. *Clostridium* permaneceu como gênero majoritário na biomassa aderida ao suporte, o que é muito positivo e reforça que o meio utilizado como suporte foi favorável às bactérias consumidoras de glicerol e produtoras de 1,3-PDO.

Outros gêneros que foram muito raros no inóculo e no reator alimentado com glicerol puro, *Lacrimispora* e *Hydrogenoanaerobacterium*, sofreram um grande aumento de menos de 0,1% a 9,4% após a alimentação com glicerol bruto, aparecendo entre os mais abundantes. Além disso, o surgimento de *Thermodesulfator*, *Bacteroides* e *Dysgonomonas* parecem ter sido fortemente influenciadas pela alimentação com glicerol bruto.

Por fim, os experimentos realizados demonstraram uma forte relação do tipo de glicerol utilizado na alimentação e os produtos obtidos. Os rendimentos de 1,3-PDO alcançados foram muito elevados, inclusive com o aumento da carga de glicerol aplicada, o que também é bastante favorável a uma situação de escala real.

O meio suporte utilizado mostrou-se favorável ao crescimento das bactérias de interesse ao consumo de glicerol bruto e produção de 1,3-PDO; estudos futuros podem ser realizados para o melhor entendimento da relação do material utilizado como meio suporte e o favorecimento da adesão de tais bactérias.

7 DISCUSSÃO GERAL

No presente estudo, diferentes condições operacionais foram aplicadas na fermentação do glicerol por culturas mistas de bactérias, tanto em testes em batelada quanto em reatores anaeróbios de operação contínua. A finalidade foi relacionar as condições aplicadas e os produtos obtidos, além de caracterizar a comunidade microbiana.

Seguindo uma lógica experimental, cada etapa realizada neste trabalho contribuiu para o avanço no entendimento da capacidade dos micro-organismos anaeróbios consumidores de glicerol de produzir 1,3-PDO e de adaptarem-se às diversas condições operacionais aplicadas aos biorreatores.

Em estudos anteriormente realizados em reator utilizando mangueira de silicone como meio suporte, levantou-se a hipótese de que o hidrogênio retido na mangueira poderia favorecer a seleção dos micro-organismos produtores de 1,3-PDO (VERAS, 2019). Por isso, neste trabalho, inicialmente foram realizados testes em batelada para avaliar diferentes concentrações de H_2 no *headspace* dos reatores. Além disso, concentrações variáveis de glicerol foram estudadas.

Nos testes em que se avaliou a relação hidrogênio:glicerol, verificou-se uma tendência de rendimento de 1,3-PDO mais elevado quando a relação 1:1 (H_2 :glicerol) foi aplicada, estando de acordo com o balanço de equivalente redox, onde 1 mol de H_2 é necessário para reduzir 1 mol de glicerol. Contudo, as diferenças foram pouco significativas e o efeito do H_2 sobre a produção de 1,3-PDO não ficou clara.

Além disso, observou-se que independente da concentração de glicerol aplicada, o 1,3-PDO foi o produto majoritário, ainda que os subprodutos fossem distintos. O rendimento de 1,3-PDO foi favorecido quando ácido acético foi o principal subproduto, estando em acordo com o que diz a literatura quanto ao favorecimento da rota redutiva quando este ácido é produzido (GARLAPATI *et al.*, 2016; MOSCOVIZ; TRABLY; BERNET, 2016; ZENG; BIEBL, 2002).

Simultaneamente aos testes em bateladas, promoveu-se a formação de biofilme em mangueiras de silicone, visto que se pretendia trabalhar com reatores tipo filtro (com biofilme sobre um suporte). Alguns autores relataram rendimentos elevados de 1,3-PDO quando se aplicou a imobilização de biomassa, sugerindo a habilidade dos produtores de 1,3-PDO em aderir aos suportes (GUNGORMUSLER *et al.*, 2011a; GUNGORMUSLER

et al., 2011b; VERAS *et al.*, 2020). O consumo de glicerol aliado à produção de 1,3-PDO (analisados mediante cromatografia líquida) foram interpretados como confirmação da formação do biofilme no interior das mangueiras de silicone.

Na sequência, conforme se formou o biofilme nas mangueiras de silicone, pretendia-se estudar a produção de 1,3-PDO em modo contínuo em duas configurações diferentes de reatores de fluxo ascendente com a biomassa aderida: (i) reator tipo filtro, onde a mangueira foi cortada em pedaços que preencheram o reator até cerca de metade do volume (R_T); (ii) reator tipo fluxo pistão, onde a mangueira em espiral foi conectada a sua parte inferior (R_S). O reator R_T foi alimentado com glicerol puro durante todo o período de operação; o reator R_S foi alimentado com glicerol puro até atingir a carga máxima e, então, foi alimentado com glicerol bruto até o final do período operacional. Em ambos os reatores foram avaliadas condições variáveis de carga de glicerol (gli-LR) aplicada e dosagens de bicarbonato de sódio.

Os resultados em R_T, tanto quando se variou a carga a pH constante como quando se manteve a carga constante e se variou o pH, levaram à hipótese de que a carga poderia estar influenciando nos rendimentos de 1,3-PDO e outros subprodutos, especialmente o etanol. A última fase experimental permitiu a confirmação da hipótese mencionada, comparando duas cargas diferentes (9 e 18 g.L⁻¹.d⁻¹), mantendo constante a quantidade de NaHCO₃ adicionado: foi observada uma relação inversa entre a gli-LR e os rendimentos de etanol, os quais foram mais elevados a cargas menores do que 10 g.L⁻¹.d⁻¹. Com respeito ao 1,3-PDO, a gli-LR não teve influência significativa nos rendimentos. Portanto, caso o objetivo fosse obter etanol, o reator deveria ser operado com cargas baixas e pH levemente alcalino. Por outro lado, estas condições deveriam ser evitadas para produzir 1,3-PDO.

Na literatura, a discussão sobre a influência de condições operacionais como o pH e a carga orgânica aplicada nas fermentações de glicerol ainda é pouco conclusiva, especialmente tratando-se de consórcio microbiano, onde há uma complexidade maior quando se pretende discutir o metabolismo microbiano.

De acordo com Biebl *et al.* (1999), os gêneros *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Lactobacillus* e *Clostridium*, são capazes de produzir 1,3-PDO. Porém, a mistura dos produtos que derivam da formação de piruvato é variável e depende do micro-organismo. Enquanto *Klebsiella* podem formar etanol, formato, lactato, acetato e 2,3-butanodiol, *Clostridium* também pode produzir butirato e butanol. Os produtos variam e

dependem tanto dos micro-organismos quanto das condições de crescimento, incluindo pH e concentração de glicerol (ROSENBERG *et al.*, 2013; ZHU *et al.*, 2021b).

Especificamente para a fermentação de glicerol, um dos primeiros estudos reportando a produção de etanol foi realizado por Jarvis *et al.* (1997), onde etanol e formato foram produzidos por *Klebsiella planticola* em quantidades equimolares (30 e 32 mmol.L⁻¹, respectivamente). Zhang *et al.* (2006) estudaram o metabolismo de glicerol por *Klebsiella pneumoniae* YMU2 e demonstraram que a produção de 1,3-PDO foi diminuída quando etanol também foi produzido.

Além disso, em experimentos realizados simultaneamente em um reator independente do reator R_T, os rendimentos de etanol foram próximos a 0,30 mol.mol⁻¹ quando foram mantidos o pH afluente alcalino (8,5-8,8) e baixa gli-LR, (de 5,0 a 8,0 g.L⁻¹.d⁻¹). Ademais, não houve produção de 1,3-PDO, o que representou um limite máximo de pH para a sua obtenção.

Temudo *et al.* (2008) realizaram experimentos para a fermentação de glicerol em reator tipo CSTR com cultura mista e pH controlado a 8,0. Os ácidos orgânicos (acetato e butirato) foram quase insignificantes, enquanto etanol foi produzido em quantidades muito maiores. Os autores também avaliaram a variação da concentração inicial de glicerol (4 a 25 g.L⁻¹) e observaram que em condições limitantes de substrato, os rendimentos de etanol-formato foram maiores que 60% do carbono convertido.

Vikromvarasiri *et al.* (2016) obtiveram etanol pela fermentação em batelada com lodo granular, variando a concentração do glicerol puro, de 10 a 128 g.L⁻¹, e o pH inicial (4 a 7). Os rendimentos variaram de 0,66 a 0,85 mol etanol/mol glicerol, sendo o máximo obtido a pH 7 e menor concentração de glicerol (10 g.L⁻¹). *Enterobacter* e *Klebsiella* foram identificadas como as maiores produtoras de etanol.

Assim como foi observado neste trabalho, nos estudos supracitados a condição de menos glicerol disponível esteve relacionada à tendência em se produzir mais etanol. Porém, em nosso caso, o máximo que se obteve de etanol foi cerca de 0,30 mol.mol⁻¹, sendo 1,3-PDO sempre o produto majoritário. Com relação ao pH alcalino, apesar de o pH maior do que 8,5 ter sido mais favorável à produção de etanol, uma maior exploração se faz necessária.

Na análise da comunidade microbiana, ambos os reatores (R_T e R_S) apresentaram biodiversidade muito baixa no inóculo e isto pode ser explicado pelo fato de que a biomassa de partida (utilizada para a formação do biofilme nas mangueiras), esteve por cerca de dois anos armazenada a 4 °C, sem receber nova alimentação.

Em R_T, 98% das sequências foram associadas a dois filos: *Proteobacteria* (67% das sequências pertencentes ao gênero *Pseudomonas*; 7,1% ao gênero *Raoultella*) e *Firmicutes* (18,2% gênero *Lactobacillus*). Dentre as bactérias presentes no inóculo, apenas *Raoultella* e *Lactobacillus* são conhecidas por consumir glicerol e converter em 1,3-PDO.

As duas OTUs majoritárias de *Lactobacillus* apresentaram homologia > 99% com as bactérias heterofermentativas *L. casei/paracasei* e *L. parabuchneri*, o que pode explicar a produção inicial de etanol. Os resultados do inóculo também explicam a baixa produção de 1,3-PDO no reator.

Após um ano, com as diversas condições operacionais aplicadas, a comunidade do R_T sofreu uma importante mudança. Destaca-se que as anteriormente dominantes *Pseudomonas*, *Lactobacillus* e *Raoultella* caíram a abundâncias menores que 1%. Já a ordem *Clostridiales* mudou de 0,2% no inóculo para 62,6% ao final da operação no reator. Os gêneros pertencentes a esta ordem são anaeróbios obrigatórios e, em geral, quimio-organotróficos, que produzem uma mistura de ácidos orgânicos (lactato, formato, acetato ou butirato), o que explica a ocorrência desses subprodutos ao longo da operação do reator.

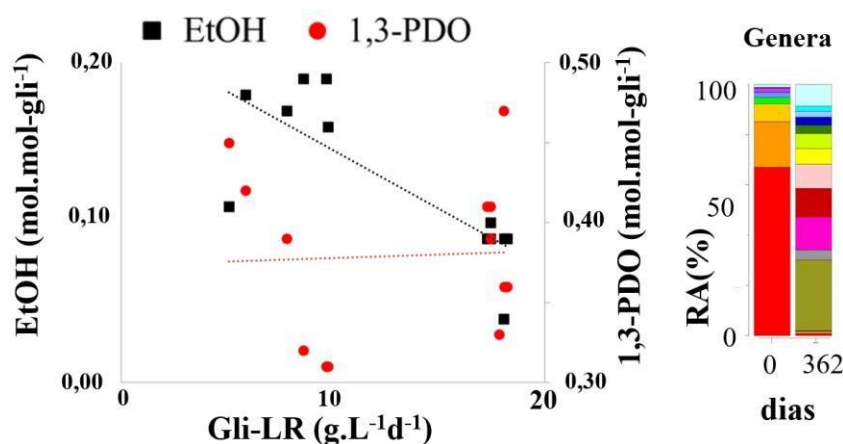
A comunidade microbiana presente no inóculo do R_T sofreu esta drástica mudança como resultado da alimentação com glicerol como única fonte de carbono e energia, e das condições operacionais aplicadas. *Pseudomonas* foram substituídas por bactérias anaeróbias, incluindo gêneros bem conhecidos por converter glicerol a 1,3-PDO, como *Lacrimispora* e *Clostridium*, que juntos formaram 40% das sequências recuperadas.

A presença do gênero *Clostridium* era esperada, uma vez que são usualmente detectados em reatores degradadores de glicerol (CHATZIFRAGKOU *et al.*, 2011; DIETZ; ZANG, 2014; SITTIJUNDA; REUNGSANG, 2017; TEE *et al.*, 2017; VARRONE *et al.*, 2018; VERAS *et al.*, 2019a; ZHOU *et al.*, 2017). A aplicação de pH afluente alcalino ao reator durante um longo período pode estar relacionada com o fato

de *Clostridium* não haver dominado, já que a maioria das espécies desse gênero cresce mais rápido a pH 6,5-7,0 (RAINEY *et al.*, 2009).

A Figura 32 apresenta, resumidamente, a operação do reator R_T e a relação entre as cargas aplicadas e os rendimentos dos principais produtos.

Figura 32 - Rendimentos de etanol (EtOH) e 1,3-PDO em função da carga de glicerol aplicada (Gli-LR) em R_T; Mudanças na diversidade por Abundância Relativa (RA) de gêneros no início (dia 0) e ao final da operação (dia 362)



Fonte: A autora (2023)

Com respeito à operação do reator R_S, onde foram avaliadas as condições mais favoráveis à produção de 1,3-PDO, primeiramente a partir da fermentação de glicerol puro e depois a partir de glicerol bruto, os resultados obtidos demonstraram uma excelente adaptação dos micro-organismos ao reator e ao meio suporte, especialmente quando ocorreu a mudança de substrato a glicerol bruto, inclusive a cargas maiores do que as aplicadas com glicerol puro.

Embora os maiores rendimentos médio e máximo de 1,3-PDO ($0,43 \text{ mol.mol-gli}^{-1}$ e $0,60 \text{ mol.mol-gli}^{-1}$, respectivamente) tenham sido obtidos quando a carga de glicerol puro, em média, foi de $16,9 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, a carga máxima tolerada pelo reator foi de $25 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$. Alguns estudos em reator contínuo obtiveram rendimentos de 1,3-PDO menores ou aproximados ao máximo do presente estudo, como Gallardo *et al.* (2014), que obtiveram $0,52 \text{ mol.mol-gli}^{-1}$ utilizando uma cultura mista em reator EGSB, e Nakazawa *et al.* (2017), que relataram $0,43 \text{ mol.mol-gli}^{-1}$ em reator UASB alimentado com glicerol puro.

Quando o reator foi alimentado com glicerol bruto, embora a máxima carga aplicada foi de $59,9 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, a carga ótima de operação foi $46,0 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, onde o máximo

rendimento de 1,3-PDO ($0,62 \text{ mol.mol-gli}^{-1}$) foi alcançado. Este foi um resultado muito relevante, tanto por se tratar da fermentação de glicerol bruto por um consórcio microbiano em reator contínuo, quanto por se aproximar do máximo rendimento teórico ($0,72 \text{ mol.mol-gli}^{-1}$) reportado por Zeng (1996).

Comparativamente, em outros trabalhos em que se alimentaram reatores anaeróbios com glicerol bruto, os rendimentos de 1,3-PDO obtidos foram menores que os aqui apresentados. Valores próximos a $0,48 \text{ mol}$ de 1,3-PDO/mol de glicerol foram relatados em estudos com cultura isolada de *Citrobacter freundii* (METSOVITI *et al.*, 2013) e com cultura mista em reator UASB com biomassa aderida (VERAS *et al.*, 2019b). Sittijunda; Reungsang (2017, 2020), trabalhando com culturas mistas, obtiveram $0,36$ e $0,25 \text{ mol.mol-gli}^{-1}$ a cargas tão altas quanto as do presente estudo ($50 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$).

Uma possível explicação para os melhores rendimentos obtidos na fase de alimentação com glicerol bruto foram as estratégias operacionais de imobilização da biomassa em um meio suporte favorável ao desenvolvimento e adesão de um biofilme, além do aumento progressivo da carga de glicerol (aguardando uma estabilização da eficiência do reator a cada carga aplicada), favorecendo a adaptação das bactérias com maior capacidade de tolerar condições mais robustas.

As mangueiras de silicone foram excelentes para a imobilização de micro-organismos fermentadores de glicerol e produtores de 1,3-PDO, que foram capazes de aderir ao suporte e se desenvolver no interior dos reatores anaeróbios, especialmente na configuração tipo fluxo pistão (R_S). Veras (2019) propôs como possível explicação para a eficiente retenção da biomassa ativa, o efeito combinado da pressão e formação de gás no interior da mangueira. Neste trabalho, não foi possível confirmar tal hipótese.

A partir dos resultados obtidos, pode-se afirmar que o reator anaeróbio com biofilme aderido a um suporte de silicone na configuração tipo fluxo pistão é promissor para a produção de 1,3-PDO, especialmente pela operação em modo contínuo, com cultura mista que se desenvolveu no interior de uma mangueira de silicone (destacando-se como uma inovação em meio suporte). Estudos subsequentes podem ser realizados para avaliar a viabilidade econômica do material utilizado para aplicação em grande escala.

Os resultados obtidos pela análise da comunidade microbiana do R_S foram mais complexos e demonstrou-se uma importante mudança na comunidade, que se analisou a

partir de seis amostras coletadas: inóculo (biomassa inicialmente aderida ao suporte); biomassa aderida ao suporte e em suspensão no reator após alimentação com glicerol puro; biomassa aderida ao suporte e em suspensão no reator após alimentação com glicerol bruto; além da biomassa depositada ao fundo do reator no final da operação.

Apesar de o biofilme aderido aos tubos de silicone com o que foi inoculado o reator ter apresentado baixa diversidade, com dominância dos gêneros *Lactobacillus* (70,6%) e *Klebsiella/Raoultella* (23,3%), a comunidade aderida ao meio suporte foi modificada após 293 dias de alimentação com glicerol puro, com diminuição da abundância de *Klebsiella/Raoultella* na biomassa aderida e na suspensão (9,7% e 7,4%, respectivamente). Além disso, houve maior diversidade microbiana, com presença de consumidores de glicerol, sendo os majoritários *Clostridium* e membros da família *Ruminococcaceae*, demonstrando que as condições operacionais favoreceram à seleção de uma comunidade consumidora do substrato.

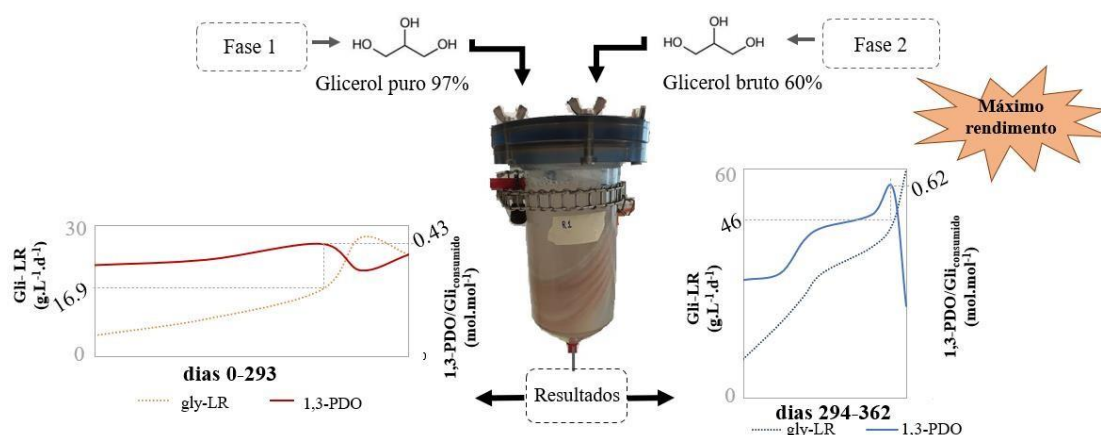
O rendimento máximo de 1,3-PDO foi alcançado quando o reator foi alimentado com glicerol bruto, fase em que também a diversidade microbiana foi maior. A família *Clostridiaceae* diminuiu notavelmente, principalmente na biomassa suspensa, onde o gênero *Clostridium* foi parcialmente substituído por *Eubacterium*.

Já na biomassa aderida ao meio suporte após alimentação com glicerol bruto, *Clostridium* permaneceu como gênero majoritário, o que nos leva a concluir que as bactérias aderidas ao meio suporte foram responsáveis pela conversão de glicerol em 1,3-PDO. Foi notável a evolução da biomassa do reator R_S, com uma importante dominância do gênero *Clostridium* aderido ao suporte, o que explica os excelentes resultados de rendimentos para 1,3-PDO. Estes resultados concordam com o que também foi reportado nos estudos de Veras (2019).

Na biomassa que se acumulou ao fundo do reator, coletada ao final da operação, houve dominância de dois gêneros que, até onde se sabe, não degradam glicerol: *Anaerobacter* (78,7%) e *Acetitomaculum* (12,9%). Portanto, admitiu-se que estas bactérias cresceram utilizando componentes da decomposição celular, assim como de H₂ e CO₂ liberados, no caso de *Acetitomaculum*.

A Figura 33 apresenta resumidamente o esquema da operação do reator R_S e os principais resultados.

Figura 33 - Esquema da operação do reator R_S e principais resultados de rendimentos de 1,3-PDO



Fonte: A autora (2023)

Ao final do período de operação dos reatores, se analisou o efeito da concentração de glicerol (10, 30 e 40 g.L^{-1}) e do pH (neutro e alcalino) sobre a atividade da biomassa de cada reator. Ressalta-se que se usou glicerol puro como fonte de carbono para biomassa do R_T e glicerol bruto para biomassa do R_S, a fim de manter as condições a que se aclimataram.

Nos testes com biomassa do R_T, os rendimentos de 1,3-PDO foram mais elevados ($\sim 0,4 \text{ mol.mol-gli}^{-1}$) a pH 7, independente da concentração inicial de glicerol. Em relação ao etanol, o rendimento foi maior ($\sim 0,3 \text{ mol.mol-gli}^{-1}$) na condição de menor concentração de glicerol (10 g.L^{-1}) e pH 8,2, demonstrando que houve influência da quantidade de glicerol disponível, mesmo após a mudança da comunidade bacteriana adaptada ao reator.

Em estudos que relacionaram diferentes concentrações de glicerol aos produtos da fermentação (KONGJAN *et al.*, 2021; TEMUDO *et al.*, 2008; WU *et al.*, 2011) foram relatados maiores rendimentos de etanol para menores concentração do substrato.

Vikromvarasiri *et al.* (2016) em seus experimentos em batelada com lodo granular de reator UASB como inóculo, variando a concentração do glicerol de 10 a 128 g.L^{-1} e o pH inicial de 4 a 7, obtiveram rendimentos de 0,66 a 0,85 mol etanol/mol glicerol, sendo o maior rendimento obtido a pH 7 e com a menor concentração de glicerol (10 g.L^{-1}). Em seu caso, *Enterobacter* e *Klebsiella* foram identificadas como as maiores produtoras de etanol.

Zhang *et al.*, (2006) em um estudo do metabolismo de glicerol por *K. pneumoniae* YMU2 demonstraram que a produção de 1,3-PDO por tal espécie é diminuída quando etanol também é produzido.

Os resultados obtidos nas bateladas foram coerentes com o que se obteve na operação do reator contínuo. Contudo, os rendimentos de 1,3-PDO e etanol foram menores do que os encontrados na literatura em testes em *batch*.

Os resultados convergem com o que a maioria dos estudos citados obteve com relação à tendência em se produzir mais etanol quando o glicerol está a baixas concentrações; contudo, poucos relacionaram a produção de etanol ao pH alcalino e esta condição precisaria ser melhor explorada experimentalmente, buscando-se realizar uma relação entre pH alcalino, espécies dominantes e os produtos obtidos pela fermentação de glicerol.

Nos testes com biomassa do reator R_S, os rendimentos de 1,3-PDO (0,6 e 0,4 mol.mol-gli⁻¹) foram maiores a pH 8,2 e concentrações de 10 e 30 g.L⁻¹, respectivamente, de glicerol bruto. A produção de etanol foi menor (0,1- 0,2 mol.mol-gli⁻¹) em comparação ao inóculo de R_T e só ocorreu a pH alcalino, nas concentrações de 10 e 30 g.L⁻¹. Esses resultados se devem às diferenças na comunidade microbiana entre as duas biomassas, havendo maior tendência em se produzir etanol em condição alcalina e, especialmente, pelas bactérias presentes na biomassa do reator R_T e a concentração 10 g.L⁻¹.

Verifica-se que aplicando as mesmas condições de pH e concentrações de glicerol, os rendimentos de 1,3-PDO e etanol foram diferentes para cada inóculo utilizado, mantendo-se a tendência de produção máxima de 1,3-PDO pelo cultivo do reator R_S. É interessante ressaltar que para este cultivo o etanol só foi produzido na condição de pH alcalino. Por outro lado, o cultivo oriundo de R_T produziu etanol nas concentrações de glicerol de 10 e 30 g.L⁻¹ e ambos os valores de pH. Porém, a menor concentração e o pH alcalino foram significativamente mais favoráveis.

Como os experimentos em bateladas, chegaram-se às observações já discutidas: as condições de pH e concentração de glicerol influenciam a fermentação e a diversidade microbiana, o que irá refletir nos produtos obtidos. Isto foi discutido por diversos autores que foram capazes de correlacionar os produtos e os micro-organismos presentes (KAUR *et al.*, 2020; MOSCOVIZ; TRABLY; BERNET, 2016; VIKROMVARASIRI *et al.*, 2016; ZHUR *et al.*, 2021).

A partir da avaliação das biomassas analisadas ao final da operação dos reatores contínuos, foi possível entender que a maior diversidade e abundância de micro-organismos

consumidores de glicerol e produtores de 1,3-PDO levaram aos melhores desempenhos do inóculo do R_T também em batelada.

Além disso, demonstrou-se que a fermentação do glicerol bruto pode ser favorecida pela utilização de culturas mistas, de composição complexa não definida. Apesar dos desafios que englobam a competição entre espécies e o controle operacional para favorecer determinada rota metabólica, eliminam-se as exigências de esterilização e aplicação de meio complexo de nutrientes, que são requisitos para as culturas puras.

Os resultados também mostraram a importância do controle dos parâmetros operacionais, que influenciam as rotas metabólicas e a distribuição dos produtos da fermentação tanto quanto os micro-organismos dominantes.

8 CONCLUSÕES

HIGHLIGHTS

- Biofilme aderido a mangueira de silicone como meio suporte degrada eficientemente o glicerol em reatores anaeróbios de fluxo ascendente
- O 1,3-PDO foi o produto majoritário em todas as condições
- O rendimento mais elevado de 1,3-PDO foi alcançado com alta carga de glicerol bruto
- A produção de etanol é favorecida a baixas cargas e valores de pH maiores que 8
- A microbiota presente no inóculo se adaptou a glicerol como única fonte externa de carbono e energia
- Gêneros fermentadores de glicerol e produtores de 1,3-PDO, tais como *Clostridium* e *Lacrimispora* foram dominantes ao final da operação dos reatores
- O consórcio microbiano mostrou robustez, adaptando-se muito bem às condições operacionais mais adversas, inclusive cargas elevadas de glicerol bruto

Os diferentes experimentos realizados nesta tese contribuíram para o conhecimento mais aprofundado da influência de algumas condições operacionais aplicadas aos reatores anaeróbios com cultura mista de bactérias fermentadoras de glicerol. Os resultados permitiram avaliar a eficiência dos reatores tanto em condições de batelada quanto em condições contínuas.

Os testes em batelada permitiram avaliar em menor escala a influência de condições como o pH do meio, a concentração de substrato e a presença de doadores de elétrons na atividade dos microrganismos fermentadores de glicerol. Por outro lado, os reatores contínuos, operados ao longo de um ano em distintas condições de carga, pH, tipo de substrato e de meio suporte, permitiram apresentar as melhores condições para a obtenção do principal produto estudado (o 1,3-propanodiol) a partir de glicerol e a possibilidade de aproveitamento do glicerol bruto para obtenção de tal produto de valor agregado em reatores tipo filtro anaeróbio, de simples operação.

Diante dos resultados obtidos em todas as etapas desse trabalho, tem-se como conclusões gerais que:

- As mangueiras de silicone apresentaram-se como excelentes meios de suporte para a imobilização de microrganismos fermentadores de glicerol e produtores de 1,3-PDO, capazes de aderir ao suporte e se desenvolverem no interior dos reatores anaeróbios sob as mais diversas condições operacionais;
- A configuração da mangueira disposta em formato espiral, com circulação do afluente por seu interior, mostrou-se a mais favorável ao desenvolvimento de bactérias produtoras de 1,3-PDO e degradadoras de glicerol puro e bruto;
- Nas bateladas para o estudo da influência da concentração de hidrogênio e glicerol e a variação do volume gasoso (*headspace*), houve uma tendência a maiores rendimentos de 1,3-PDO na condição de 90% de volume gasoso; uma avaliação da correlação entre o volume gasoso e os rendimentos de etanol mostrou que 80% foi a condição mais favorável para a produção de etanol, além de 1,3-PDO;
- Nas bateladas em que foram adicionados doadores de elétrons ao meio reacional, os rendimentos de 1,3-PDO variaram de 0,52 a 0,67 mol.mol-gli⁻¹. Contudo, os doadores não foram consumidos e os rendimentos foram similares ao do teste controle. A partir disso, concluiu-se que as bactérias já estavam adaptadas aos reatores operados sem adição de doador, alcançando rendimentos de 1,3-PDO muito elevados. Tais resultados são muito positivos e apontaram não ser necessário adicionar doadores para melhorar os rendimentos;
- Na operação do reator R_T (configuração de filtro com fluxo ascendente), observou-se que a carga de glicerol aplicada (gli-LR) e, possivelmente, as variações de pH ocasionadas pelas diferentes dosagens de NaHCO₃, ocasionaram mudanças na comunidade bacteriana, de modo que apenas as bactérias capazes de adaptar-se às diferentes condições aplicadas permaneceram em atividade;
- Com relação aos produtos do reator R_T, o etanol no início da operação esteve relacionado não somente às condições aplicadas, mas também às espécies dominantes no biofilme aderido usado como inóculo. Na última fase (P3), apesar das mudanças na comunidade microbiana, a gli-LR aplicada influenciou fortemente os rendimentos de 1,3-PDO e de etanol. A produção máxima de etanol ocorreu quando a gli-LR foi de 9 g.L⁻¹.d⁻¹, enquanto a de 1,3-PDO ocorreu quando a gli-LR foi maior (18 g.L⁻¹.d⁻¹);
- A comunidade microbiana presente no biofilme aderido usado como inóculo do R_T sofreu uma drástica mudança, resultado da alimentação com glicerol e das

condições operacionais aplicadas. *Pseudomonas* foram substituídas por bactérias anaeróbias, incluindo gêneros conhecidos por converter glicerol a 1,3-PDO, como *Lacrimispora* e *Clostridium*.

- O reator inoculado com biomassa aderida a suporte de silicone em espiral (R_S), configuração parcial de fluxo-pistão, destacou-se como uma configuração promissora para a produção de 1,3-PDO por fermentação de glicerol, especialmente considerando que (i) o reator foi operado continuamente; (ii) uma cultura ativa mista e densa se desenvolveu muito bem na mangueira de silicone e; (iii) utilizou-se glicerol bruto como fonte de carbono e energia;
- Em R_S foram obtidos rendimentos elevados e produtividades de até 0,62 mol.mol⁻¹gli⁻¹ e 14,7 g.L⁻¹.d⁻¹, respectivamente. Além disso, foi possível aplicar cargas altas de glicerol bruto (até 46 g.L⁻¹.d⁻¹) sem afetar negativamente a atividade dos micro-organismos, possibilitando seu uso em escala industrial;
- Quanto à comunidade microbiana do R_S, apesar de o biofilme com que o reator foi inoculado ter apresentado baixa diversidade microbiana, com dominância de *Lactobacillus* e *Klebsiella/Raoultella*, após 295 dias de operação com glicerol puro (fase P1), a comunidade aderida ao meio suporte foi modificada, com diminuição significativa da abundância de *Klebsiella/Raoultella*. No final da fase P1, houve maior diversidade, com presença de consumidores de glicerol, demonstrando que as condições operacionais foram favoráveis à seleção de uma comunidade consumidora do substrato;
- Na fase P2 do reator R_S, com alimentação por glicerol bruto, o rendimento máximo de 1,3-PDO foi alcançado e a diversidade foi ainda maior, inclusive com uma drástica mudança. Ao final, a família *Clostridiaceae* diminuiu notavelmente, principalmente na biomassa suspensa. *Clostridium* permaneceu como gênero majoritário na biomassa aderida, o que confirma a eficiência do suporte utilizado em reter os produtores de 1,3-PDO; gêneros muito raros no inóculo e no reator alimentado com glicerol puro, *Lacrimispora* e *Hydrogenoanaerobacterium*, estiveram entre os mais abundantes. Além disso, *Thermodesulfator*, *Bacteroides* e *Dysgonomonas* aumentaram significativamente após a alimentação do reator com glicerol bruto;
- Da mesma forma que ocorreu com o reator R_T, uma parte significativa da população foi de bactérias não consumidoras de glicerol, que cresceram às

expensas de produtos do decaimento celular de outras bactérias, o que justifica os demais subprodutos da fermentação: etanol, formato, acetato, butirato e lactato, encontrados no reator;

- Os altos rendimentos de 1,3-PDO alcançados na fase P2 do reator R_S são resultados muito relevantes, uma vez que foram obtidos a partir do glicerol bruto e alta carga orgânica, o que favorece sua aplicação a escala real;
- Nos testes em batelada inoculados com biomassa do reator R_T, já adaptada ao consumo de glicerol puro, os rendimentos de 1,3-PDO não foram influenciados pelas variações no pH inicial. Quanto ao etanol, o pH alcalino e a concentração inicial de glicerol mais baixa favoreceram os melhores rendimentos;
- Nos testes em batelada inoculados com a biomassa do reator adaptado ao consumo de glicerol bruto (R_S), os rendimentos de 1,3-PDO foram maiores na condição de pH 8 e nas concentrações de 10 e 30 g.L⁻¹ de glicerol bruto. A produção de etanol com glicerol a 10 g.L⁻¹ foi muito menor em comparação às bateladas com o inóculo do reator R_T, o que se explica pela diferença na comunidade microbiana;
- Em ensaios em batelada, a concentração de 40 g.L⁻¹ foi inibitória às comunidades microbianas de ambos os reatores em condições de batelada, cujos consumos médios de glicerol não foram maiores que 30 %;
- Com relação à influência do pH na fermentação de glicerol, notou-se uma tendência ao aumento do rendimento de etanol e diminuição nos rendimentos de 1,3-PDO quando o pH inicial foi alcalino (> 8,0) em todos os experimentos;
- Para ambos os reatores contínuos (R_T e R_S), os resultados foram interessantes para a produção em grande escala: um consórcio microbiano complexo mostrou robustez e adaptação a condições operacionais variáveis. Embora o 1,3-PDO tenha sido o produto mais desejável, a tendência observada para o etanol poderia ser útil para a sua produção, caso as condições de alcalinidade (pH > 8) e baixa carga fossem aplicadas para esta finalidade;
- Conforme demonstrado pela análise das comunidades microbianas, algumas espécies são capazes de fermentar glicerol e outras podem sobreviver utilizando os compostos liberados pelo decaimento celular. Por isso, estudos adicionais devem ser realizados para esclarecer a relação entre as espécies dominantes e os produtos obtidos a diferentes condições de pH, gli-LR e produtos obtidos.

REFERÊNCIAS

- AGLER, M. T.; WRENN B.A.; ZINDER, S.H.; ANGENENT, L.T. Waste to bioproduct conversion with undefined mixed cultures: The carboxylate platform. **Trends in Biotechnology**, v. 29, n. 2, p. 70–78, 2011.
- ANITHA, M.; KAMARUDIN, S. K.; KOFLI, N. T. The potential of glycerol as a value-added commodity. **Chemical Engineering Journal**, v. 295, p. 119-130, 2016.
- ARDI, M. S.; AROUA, M. K.; HASHIM, N. A. Progress, prospect and challenges in glycerol purification process: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 42, p. 1164–1173, 2015.
- ARSLAN, D.; STEINBUSCH, K.J.J.; DIELS, L.; HAMELERS, H.V.M; STRIK, D.P.B.T.B; BUISMAN, C.J.N.; *et al.* Selective short-chain carboxylates production: A review of control mechanisms to direct mixed culture fermentations. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 46, n. 6, p. 592–634, 2016.
- BART, J. C. J.; PALMERI, N.; CAVALLARO, S. Valorisation of the glycerol by-product from biodiesel production. **Biodiesel Science and Technology**, p. 571–624, 2010.
- BIEBL, H.; MENZEL, K.; ZENG, A.P.; DECKWER, W.D. Microbial production of 1,3-propanediol. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 52, n. 3, 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, p. 24-29, 1998.
- BRASIL, 2023. Serviços e Informações do Brasil, Energia, Minerais e Combustíveis. Governo oficializa ampliação da mistura de biodiesel no diesel vendido no país. [Brasília]: 29 mar. 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/pt-br/noticias/energia-minerais-e-combustiveis/2023/03/governo-oficializa-ampliacao-da-mistura-de-biodiesel-no-diesel-vendido-no-pais> Acesso em: maio de 2023.
- CASALI, S.; GUNGORMUSLER, M.; BERTIN, L.; FAVA, F.; AZBAR, N. Development of a biofilm technology for the production of 1,3-propanediol (1,3-PDO) from crude glycerol. **Biochemical Engineering Journal**, v. 64, p. 84-90, 2012.
- CHA, H. G.; KIM, Y.O.; CHOI, W.Y.; KANG, D.H.; LEE, H.Y.; JUNG, K.H. Ethanol production from glycerol using immobilized pachysolen tannophilus during microaerated Repeated-Batch fermentor culture. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 3, p. 366–374, 2015.
- CHATZIFRAGKOU, A.; PAPANIKOLAOU, S.; DIETZ, D.; DOULGERAKI, A. I.; NYCHAS, G. J. E.; ZENG, A. P. Production of 1, 3-propanediol by *Clostridium butyricum* growing on biodiesel-derived crude glycerol through a non-sterilized fermentation process. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, p. 101-112, 2011.

CHOI, W. J., HARTONO, M.R.; CHAN, W.H.; YEO, S.S. Ethanol production from biodiesel-derived crude glycerol by newly isolated *Kluyvera cryocrescens*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, fev. 2011. v. 89, n. 4, p. 1255–1264.

CIMMINO, T.; METIDJI, S.; LABAS, N.; LE PAGE, S.; MUSSO, D.; RAOULT, D.; ROLAIN, J. M. Genome sequence and description of *Actinomyces polynesiensis* str. MS2 sp. nov. isolated from the human gut. **New Microbes and New Infections**, v. 12, p. 1-5, 2016.

CLOMBURG, J. M.; GONZALEZ, R. Anaerobic fermentation of glycerol: a platform for renewable fuels and chemicals. **Trends in biotechnology**, v. 31, n. 1, p. 20-28, 2013.

DA SILVA RUY, A. D.; FERREIRA, A. L. F.; BRESCIANI, A. É.; DE BRITO ALVES, R. M.; PONTES, L. A. M. Market prospecting and assessment of the economic potential of glycerol from biodiesel. 2020.

DIETZ, D.; ZENG, A. Efficient production of 1, 3-propanediol from fermentation of crude glycerol with mixed cultures in a simple medium. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 37, p. 225-233, 2014.

DRANCOURT, M.; BOLLET, C.; CARTA, A.; ROUSSELIER, P. Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov. and *Raoultella planticola* comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, n. 3, p. 925-932, 2001.

ENGELS, C.; RUSCHEWEYH, H. J.; BEERENWINKEL, N.; LACROIX, C.; SCHWAB, C. The common gut microbe *Eubacterium hallii* also contributes to intestinal propionate formation. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 713, 2016.

FERGUSON, R. MW; COULON, F.; VILLA, R. Understanding microbial ecology can help improve biogas production in AD. **Science of The Total Environment**, v. 642, p. 754-763, 2018.

FLORENCIO, L.; JENIČEK, P.; FIELD, J. A.; LETTINGA, G. Effect of cobalt on the anaerobic degradation of methanol. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 75, n. 5, p. 368-374, 1993.

FOKUM, E.; ZABED, H.M.; RAVIKUMAR, Y.; ELSHOBARY, M.E.; CHANDANKERE, R.; ZHANG, Y.; *et al.* Co-fermentation of glycerol and sugars by *Clostridium beijerinckii*: Enhancing the biosynthesis of 1, 3-propanediol. **Food Bioscience**, v. 41, p. 101028, 2021.

GARRITY, G. M. **Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology: Volume 2: The Proteobacteria Part C**. Springer US, 2005.

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.

GARLAPATI, V. K.; SHANKAR, U.; BUDHIRAJA, A. Bioconversion technologies of crude glycerol to value added industrial products. **Biotechnology Reports**, v. 9, p. 9–14, 2016.

GUNGORMUSLER, M.; GONEN, C.; AZBAR, N. Use of ceramic-based cell immobilization to produce 1,3-propanediol from biodiesel-derived waste glycerol with *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111, n. 5, p. 1138–1147, 2011a.

GUNGORMUSLER, M.; GONEN, C.; AZBAR, N. Continuous production of 1,3-propanediol using raw glycerol with immobilized *Clostridium beijerinckii* NRRL B-593 in comparison to suspended culture. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 34, n. 6, p. 727–733, 2011b.

GUNGORMUSLER-YILMAZ, M.; CICEK, N.; LEVIN, D.B.; AZBAR, N. Cell immobilization for microbial production of 1,3-propanediol. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 36, n. 3, p. 482–494, 2016.

GUO, Y.; DAI, L.; XIN, B.; TAO, F.; TANG, H.; SHEN, Y.; *et al.* 1,3-Propanediol production by a newly isolated strain, *Clostridium perfringens* GYL. **Bioresource Technology**, v. 233, p. 406–412, 2017.

GRIMONT, P.A.D., GRIMONT, F. Genus XVI. *Klebsiella*. In: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT (eds) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn. Vol. 2: The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria. Springer, NY, USA, pp 685–692, 2005.

HAAS, K.N.; BLANCHARD, J.L. Reclassification of the *Clostridium* clostridioforme and *Clostridium sphenoides* clades as *Enterocloster* gen. nov. and *Lacrimispora* gen. nov., including reclassification of 15 taxa. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 1, p. 23–34, 2020.

HARPER, S. R., & POHLAND, F. G. Recent developments in hydrogen management during anaerobic biological wastewater treatment. **Biotechnology and Bioengineering**, 28(4), p. 585–602, 1986.

HU, S.; LUO, X.; WAN, C.; LI, Y. Characterization of crude glycerol from biodiesel plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 23, p. 5915–5921, 2012.

ITO, T.; NAKASHIMADA, Y.; SENBA, K.; MATSUI, T.; NISHIO, N. Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 100, n. 3, p. 260–265, 2005.

JARVIS, G. N.; MOORE, E. R. B.; THIELE, J. H. Formate and ethanol are the major products of glycerol fermentation produced by a *Klebsiella planticola* strain isolated from red deer. **Journal of Applied Microbiology**, 1997.

KAUR, J.; SARMA, A.K.; JHA, M.K.; GERA, P. Valorisation of crude glycerol to value-added products: Perspectives of process technology, economics and environmental issues. **Biotechnology Reports**, v. 27, 2020.

KIM, B.; SEUNG JEON, B.; KIM, S.; KIM, H.; UM, Y.; SANG, B. I. *Caproiciproducens galactitolivorans* gen. nov., sp. nov., a bacterium capable of producing caproic acid from galactitol, isolated from a wastewater treatment plant. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 65, p. 4902–4908, 2015.

KNIFTON *et al.* **One-step production of 1, 3-propanediol from ethylene oxide and syngas with a catalyst with a phospholanoalkane ligand.** US6576802B2, United States Patent. 2003.

KODAMA, Y.; SHIMOYAMA, T.; WATANABE, K. *Dysgonomonas oryzae* sp. nov., isolated from a microbial fuel cell. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, n. Pt_12, p. 3055-3059, 2012.

KONGJAN, P.; JARIYABOON, R.; REUNGSANG, A.; SITTIJUNDA, S. Co-fermentation of 1, 3-propanediol and 2, 3-butanediol from crude glycerol derived from the biodiesel production process by newly isolated *Enterobacter* sp.: Optimization factors affecting. **Bioresource Technology Reports**, v. 13, p. 100616, 2021.

LAURA, M.; MONICA, T.; DAN-CRISTIAN, V. The effect of crude glycerol impurities on 1, 3-propanediol biosynthesis by *Klebsiella pneumoniae* DSMZ 2026. **Renewable Energy**, v. 153, p. 1418-1427, 2020.

LEE, C. S.; AROUA, M.K.; DAUD, W.M.A.W.; COGNET, P.; PÉRÈS-LUCHESE, Y.; FABRE, P.L.; *et al.* A review: conversion of bioglycerol into 1, 3-propanediol via biological and chemical method. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 42, p. 963-972, 2015.

LEE, J. H.; JUNG, M.; OH, M. High-yield production of 1, 3-propanediol from glycerol by metabolically engineered *Klebsiella pneumoniae*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, n. 1, p. 1-13, 2018.

LENG, L.; NOBU, M.K.; NARIHIRO, T.; YANG, P.; TAN, G.; YU, A.; LEE, P.H. Shaping microbial consortia in coupling glycerol fermentation and carboxylate chain elongation for co-production of 1, 3-propanediol and caproate: pathways and mechanisms. **Water research**, v. 148, p. 281-291, 2019.

MA, Y.; WU, X.; LI, S.; TANG, L.; CHEN, M.; AN, Q. Proposal for reunification of the genus *Raoultella* with the genus *Klebsiella* and reclassification of *Raoultella electrica* as *Klebsiella electrica* comb. nov. **Research in Microbiology**, v. 172, n. 6, p. 103851, 2021.

MADIGAN, Michael T. *et al.* **Microbiologia de Brock-14ª Edição.** Artmed Editora, 2016.

MARKETANDMARKETS. 2019. **1,3-Propanediol (PDO) Market worth \$870 million by 2024.** Disponível em: <<https://www.marketsandmarkets.com/PressReleases/1-3-propanediol-pdo.asp>>. Acesso em: dez. 2022.

MELLENDEZ, J. R.; MÁTYÁS, B.; HENA, S.; LOWY, D.A.; EL SALOUS, A. Perspectives in the production of bioethanol: A review of sustainable methods, technologies, and bioprocesses. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 160, p. 112260, 2022.

METSOVITI, M.; PARAMITHIOTIS, S.; DROSINOS, E.H.; GALIOTOU-PANAYOTOU, M.; NYCHAS, G.J.E.; ZENG, A.P.; *et al.* Screening of bacterial strains capable of converting biodiesel-derived raw glycerol into 1, 3-propanediol, 2, 3-butanediol and ethanol. **Engineering in Life Sciences**, v. 12, n. 1, p. 57-68, 2012.

METSOVITI, M.; PARASKEVAIDI, K.; KOUTINAS, A.; ZENG, A.P.; 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, n. 4, p. 408-418, 2013

MONTEIRO, M. R.; KUGELMEIER, C.L.; PINHEIRO, R.S.; BATALHA, M.O.; DA SILVA, C.A. Glycerol from biodiesel production: Technological paths for sustainability. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 88, n. March, p. 109-122, 2018.

MOSCOVIZ, R.; TRABLY, E.; BERNET, N. Consistent 1,3-propanediol production from glycerol in mixed culture fermentation over a wide range of pH. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 1, p. 1-11, 2016.

NAKAZAWA, M. M.; FLORENCIO, L.; KATO, M.T.; GAVAZZA, S.; SANZ, J.L. Effects of the operational conditions on the production of 1,3-propanediol derived from glycerol in anaerobic granular sludge reactors. **Water Science and Technology**, v. 75, n. 4, p. 963-970, 2017.

OECD-FAO Agricultural Outlook 2021-2030. OECD (2021). Disponível em: <<https://doi.org/10.1787/19428846-en>> (2021). Acesso em: Maio de 2022.

OECD. Policy Responses on the Impacts of the War in Ukraine, 2022. The impacts and policy implications of Russia's aggression against Ukraine on agricultural markets. 5 ago, 2022. Disponível em: <<https://www.oecd.org/ukraine-hub/policy-responses/the-impacts-and-policy-implications-of-russia-s-aggression-against-ukraine-on-agricultural-markets-0030a4cd/>> Acesso em: maio de 2023.

OKASANEN, A.J., BLANCHET, F.G., FRIENDLY, M., KINDT, R., LEGENDRE, P., MCGLINN, D., MINCHIN, P.R., HARA, R.B.O., SIMPSON, G.L., SOLYMOS, P., STEVENS, M.H.H., SZOEC, E., 2010. Package 'vegan' (Version 2.4-0). Disponível em: <https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/index.html>

PALLERONI, N.J. Genus I. *Pseudomonas*. In: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT (eds) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd edn. Vol. 2: The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria. Springer, NY, USA, pp 323-379, 2005.

PAN, C.; TAN, G. A.; GE, L.; CHEN, C.; WANG, J. Two-stage microbial conversion of crude glycerol to 1,3-propanediol and polyhydroxyalkanoates after pretreatment. **Journal of Environmental Management**, v. 232, p. 615-624, 2019.

PLECHA, S.; HALL, D.; TIQUIA-ARASHIRO, S. M. Screening for novel bacteria from the bioenergy feedstock switchgrass (*Panicum virgatum* L.). **Environmental Technology**, v. 34, n. 13-14, p. 1895-1904, 2013.

PFLÜGL, S.; MARX, H.; MATTANOVICH, D.; SAUER, M. Heading for an economic industrial upgrading of crude glycerol from biodiesel production to 1, 3-propanediol by *Lactobacillus diolivorans*. **Bioresource Technology**, v. 152, p. 499-504, 2014.

RAINEY, F.A.; HOLLEN, B.J., SMALL, A. Genus I. *Clostridium*. In: De Vos P, Garrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer CH, Whitman WB (eds) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd edn. Vol. 3: The Firmicutes. Springer, NY, USA, pp 738-829, 2009.

RICCI, M. A.; RUSSO, A.; PISANO, I.; PALMIERI, L.; DE ANGELIS, M.; AGRIMI, G. Improved 1, 3-propanediol synthesis from glycerol by the robust *Lactobacillus reuteri*

strain DSM 20016. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 25, n. 6, p. 893-902, 2015.

ROSENBERG, E.; DELONG, E.I.C.E.F.; LORY, S.; STACKEBRANDT, E.; THOMPSON, F. (Ed.). **The prokaryotes: Applied bacteriology and biotechnology**. Springer Berlin Heidelberg, 2013.

SAMUL, D.; LEJA, K.; GRAJEK, W. Impurities of crude glycerol and their effect on metabolite production. **Annals of Microbiology**, v. 64, n. 3, p. 891–898, 2014.

SARRIS, D.; PAPANIKOLAOU, S. Biotechnological production of ethanol: Biochemistry, processes and technologies. **Engineering in Life Sciences**, v. 16, n. 4, p. 307-329, 2016.

SAXENA, R. K.; ANAND, P.; SARAN, S.; ISAR, J. Microbial production of 1, 3-propanediol: recent developments and emerging opportunities. **Biotechnology advances**, v. 27, n. 6, p. 895-913, 2009.

SCHALL, K.P.; YASSIN, A.A. Genus I. *Actinomyces*. In: Goodfellow M, Kämpfer P, Busse HJ, Trujillo ME, Suzuki K, Ludwig W, Whitman WB (eds) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn. Vol. 5: The Actinobacteria, Part A. Springer, NY, USA, p. 342–109, 2012.

SCHLOSS, P.D.; WESTCOTT, S. L.; RYABIN, T.; HALL, J. R.; HARTMANN, M.; HOLLISTER, E. B.; *et al.* Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**. 75, 7537–7541, 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, n. 6, p. 1098–1106, 2009.

SILVA, I. J. S., LAVORANTE, A. F., PAIM, A. P. S., DA SILVA, M. J. Microwave-assisted digestion employing diluted nitric acid for mineral determination in rice by ICP OES. **Food Chem.** 319, 126435, 2020.

SITTIJUNDA, S.; REUNGSANG, A. Fermentation of hydrogen, 1,3-propanediol and ethanol from glycerol as affected by organic loading rate using up-flow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 45, p. 27558–27569, 2017.

SITTIJUNDA, S.; REUNGSANG, A. Valorization of crude glycerol into hydrogen, 1,3-propanediol, and ethanol in an up-flow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor under thermophilic conditions. **Renewable Energy**, v. 161, p. 361–372, 2020.

SONG, L., DONG, X. *Hydrogenoanaerobacterium saccharovorans* gen. nov., sp. nov., isolated from H₂-producing UASB granules. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 59, 295–299, 2009.

SUN, Y. Q. *et al.* Advances in bioconversion of glycerol to 1,3-propanediol: Prospects and challenges. **Process Biochemistry**, v. 71, p. 134–146, 2018.

SUN, Y.; ZHENG, Y.; WANG, X.; ZHOU, J.; XIU, Z. Fermentation performance and mechanism of a novel microbial consortium DUT08 for 1,3-propandiol production from

biodiesel-derived crude glycerol under non-strictly anaerobic conditions. **Process Biochemistry**, v. 83, n. 2, p. 27–34, 2019.

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, n. 3, p. 246–253, 2014.

SZYMANOWSKA-POWAŁOWSKA, D. The effect of high concentrations of glycerol on the growth, metabolism and adaptation capacity of *Clostridium butyricum* DSP1. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 18, n. 2, p. 128–133, 2015.

SZYMANOWSKA-POWAŁOWSKA, D.; DROŹDŹYŃSKA, A.; REMSZEL, N. Isolation of new strains of bacteria able to synthesize 1,3-propanediol from glycerol. **Advances in Microbiology**, v.3, p. 171–80. 2013.

TALARICO, T. L.; AXELSSON, L. T.; NOVOTNY, J.; FIUZAT, M.; DOBROGOSZ, W. J. Utilization of glycerol as a hydrogen acceptor by *Lactobacillus reuteri*: Purification of 1,3-propanediol:NAD⁺ oxidoreductase. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 4, p. 943–948, 1990.

TEE, Z. K.; JAHIM, J.M.; TAN, J.P.; KIM, B.H. Preeminent productivity of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* JKT37 and the role of using calcium carbonate as pH neutraliser in glycerol fermentation. **Bioresource Technology**, v. 233, p. 296–304, 2017.

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, n. 6, p. 1088–1098, 2008.

VARRONE, C.; SKIADAS, I. V.; GAVALA, H. N. Effect of hydraulic retention time on the modelling and optimization of joint 1,3 PDO and BuA production from 2G glycerol in a chemostat process. **Chemical Engineering Journal**, v. 347, n. February, p. 525–534, 2018.

VARRONE, C.; FLORIOTIS, G.; HEGGESET, T.M.B.; LE, S.B.; MARKUSSEN, S.; SKIADAS, I.V.; *et al.* Continuous fermentation and kinetic experiments for the conversion of crude glycerol derived from second-generation biodiesel into 1,3 propanediol and butyric acid. **Biochemical Engineering Journal**, v. 128, p. 149–161, 2017.

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, n. 3, p. 1319–1331, 2013.

VEIGA DA CUNHA, M., FOSTER, M.A. Sugar-glycerol cofermentations in *Lactobacilli*: the fate of lactate. **J. Bacteriol.** 174 (3), 1013–1019, 1992.

VERAS, S.T.S.; ROJAS, P.; FLORENCIO, L.; KATO, M.T.; SANZ, J.L. 1, 3-Propanediol production from glycerol in polyurethane foam containing anaerobic reactors: performance and biomass cultivation and retention. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 36, p. 45662–45674, 2020.

VERAS, S.T.S (2019). **Tese de doutorado**. Produção de compostos com valor agregado a partir da degradação anaeróbia do glicerol.

VERAS, S.T.S.; ROJAS, P.; FLORENCIO, L.; KATO, M.T.; SANZ, J.L. Production of 1,3-propanediol from pure and crude glycerol using a UASB reactor with attached biomass in silicone support. **Bioresource Technology**, v. 279, p. 140–148, 2019a.

VERAS, S.T.S.; CAVALCANTE, W.A.; GEHRING, T.A.; RIBEIRO, A.R.; FERREIRA, T.J.T.; KATO, M.T.; *et al.* Anaerobic production of valeric acid from crude glycerol via chain elongation. **International Journal of Environmental Science and Technology**, 2019b.

VIKROMVARASIRI, N.; HAOSAGUL, S.; BOONYAWANICH, S.; PISUTPAISAL, N. Microbial dynamics in ethanol fermentation from glycerol. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, n. 35, p. 15667-15673, 2016.

VIVEK, N.; SINDHU, R.; MADHAVAN, A.; ANJU, A. J.; CASTRO, E.; FARACO, V.; *et al.* Recent advances in the production of value added chemicals and lipids utilizing biodiesel industry generated crude glycerol as a substrate–metabolic aspects, challenges and possibilities: an overview. **Bioresource technology**, v. 239, p. 507-517, 2017.

VIVEK, N.; PANDEY, A.; BINOD, P. Biological valorization of pure and crude glycerol into 1,3-propanediol using a novel isolate *Lactobacillus brevis* N1E9.3.3. **Bioresource Technology**, v. 213, p. 222–230, 2016.

VOS, P. *et al.* (Ed.). Bergey's manual of systematic bacteriology: Volume 3: The Firmicutes. Springer Science & Business Media, 2011.

WADE, W.G. Genus I. *Eubacterium*. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd ed. Vol. 3: The *Firmicutes*. De Vos, P., Garrity, G.M., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K-H., Whitman, W.B. (eds). Pp. 865-891. Springer, N.Y, USA, 2009.

WANG, Q.; GARRITY, G. M.; TIEDJE, J. M.; COLE, J. R. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 16, p. 5261-5267, 2007.

WESTBROOK, A. W.; MISCEVIC, D.; KILPATRICK, S.; BRUDER, M. R.; MOO-YOUNG, M.; CHOU, C.P. Strain engineering for microbial production of value-added chemicals and fuels from glycerol. **Biotechnology Advances**, v. 37, n. 4, p. 538-568, 2019.

WIEGEL, J. *et al.* An introduction to the family Clostridiaceae. **The prokaryotes**, v. 4, p. 654-678, 2006.

WISCHRAL, D.; ZHANG, J.; CHENG, C.; LIN, M.; DE SOUZA, L.M.G.; PESSOA, F.L.P.; *et al.* Production of 1,3-propanediol by *Clostridium beijerinckii* DSM 791 from crude glycerol and corn steep liquor: Process optimization and metabolic engineering. **Bioresource Technology**, v. 212, p. 100–110, 2016.

WU, K.; LIN, Y.; LO, Y.; CHEN, C.; CHEN, W.; CHANG, J. Converting glycerol into hydrogen, ethanol, and diols with a *Klebsiella* sp. HE1 strain via anaerobic fermentation. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 42, n. 1, p. 20–25, 2011.

YANG, X. *et al.* Improved production of 1,3-propanediol from biodiesel-derived crude glycerol by *Klebsiella pneumoniae* in fed-batch fermentation. **Chemical Engineering Journal**, v. 349, p. 25–36, 2018a.

YANG, B.; LIANG, S.; LIU, H.; LIU, J.; CUI, Z.; WEN, J. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for 1,3-propanediol biosynthesis from glycerol. **Bioresource Technology**, v. 267, n. May, p. 599–607, 2018b.

YANG, X.; CHOI, H.S.; LEE, J.H.; LEE, S.K.; HAN, S.O.; PARK, C.; *et al.* Repeated batch production of 1,3-propanediol from biodiesel derived waste glycerol by *Klebsiella pneumoniae*. **Chemical Engineering Journal**, v. 314, p. 660–669, 2017.

YANG, F.; HANNA, M. A.; SUN, R. Value-added uses for crude glycerol-a byproduct of biodiesel production. **Biotechnology for biofuels**, v. 5, n. 1, p. 1-10, 2012.

ZENG, A. P.; BIEBL, H. Bulk chemicals from biotechnology: the case of 1,3-propanediol production and the new trends. **Advances in biochemical engineering/biotechnology**, v. 74, p. 239–259, 2002.

ZENG, A.P. Pathway and kinetic analysis of 1, 3-propanediol production from glycerol fermentation by *Clostridium butyricum*. **Bioprocess Engineering**, v. 14, p. 169-175, 1996.

ZHANG, Y.; LI, Y.; DU, C.; LIU, M.; CAO, Z. Inactivation of aldehyde dehydrogenase: A key factor for engineering 1,3-propanediol production by *Klebsiella pneumoniae*. **Metabolic Engineering**, v. 8(6), p. 578–586, 2006.

ZHOU, J.; SHEN, J.; JIANG, L.; SUN, Y.; MU, Y.; XIU, Z. Selection and characterization of an anaerobic microbial consortium with high adaptation to crude glycerol for 1,3-propanediol production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, p. 5985–5996, 2017.

ZHU, Y.; WANG, Y.; GAO, H.; WANG, H.; WAN, Z.; JIANG, Y.; *et al.* Current advances in microbial production of 1,3-propanediol. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v.15(5), p. 1566–1583, 2021.

APÊNDICE A - FERMENTAÇÃO EM REATORES CONTÍNUOS PARA OBTENÇÃO DE ETANOL E 1,3-PDO EM CONDIÇÕES ALCALINAS

Durante o período de operação da Fase 1 dos reatores contínuos para produção de 1,3-PDO (R_T e R_S), foi observada uma produção de etanol elevada e, no período em que isto ocorreu, a alimentação estava sendo preparada com um pH do meio alcalino (>8) devido à adição de NaHCO_3 (1 g.gDQO^{-1}). A partir disso, levantou-se a hipótese de que o aumento no pH estaria causando uma queda nos rendimentos de 1,3-PDO e aumento da produção de etanol e ácido fórmico.

Além disso, observou-se um crescimento de biomassa na mangueira de alimentação dos reatores (mangueiras de PVC) e, ao coletar alíquotas do líquido na saída da mangueira, observou-se que havia consumo de glicerol e produção de etanol.

Por isso, decidiu-se iniciar estudos simultâneos, em reatores secundários (volume total de 130 mL e útil de 100 mL), aplicando um pH afluente mais elevado, que foi definido com base em testes de batelada com o pH inicial variando de 7,0 a 8,8 para comparar os rendimentos de etanol.

Para o início dos testes em batelada, dois frascos sorológicos de 100 mL foram preenchidos com 50 mL do meio de nutrientes e glicerol, com adição de NaHCO_3 a 1 g.gDQO^{-1} ($\text{pH} > 8$). Após a esterilização por autoclave, os frascos foram purgados com a mistura de gases $\text{N}_2:\text{CO}_2$ (80:20) e logo foram inoculados. Um dos frascos foi inoculado com pedaços da mangueira de PVC da alimentação do reator em que se observou consumo de glicerol e produção de etanol, contendo a biomassa aderida em seu interior (MA); o segundo frasco foi inoculado com a biomassa suspensa no interior da mesma mangueira (MS) e novos pedaços de mangueira de PVC esterilizada, a fim de verificar se a biomassa suspensa era capaz de aderir ao meio suporte (Figura A1).

Com base nos resultados obtidos no estudo entre os inóculos MA e MS, definiu-se a configuração que seria aplicada aos testes com reatores em operação contínua para a produção de etanol.

A concentração inicial de glicerol foi mantida constante em todas as transferências (15 g.L^{-1}) e o pH variou, partindo do mais alto (8,8). À medida em que se consumia todo o glicerol, efetuavam-se transferências dos inóculos para outro frasco com novo meio.

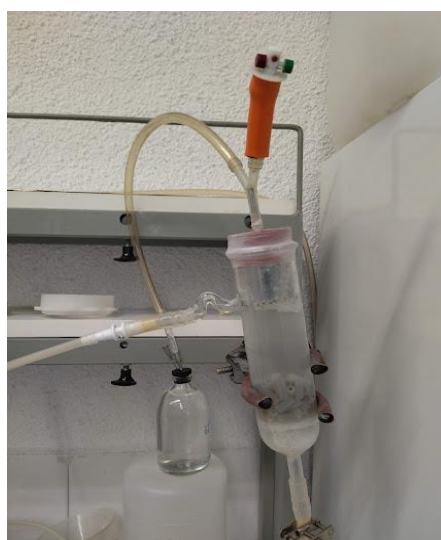
Figura A1 - Testes em batelada para produção de etanol



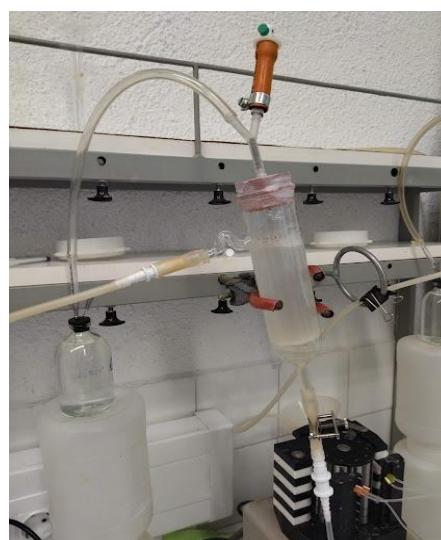
Fonte: A autora (2023)

Após as bateladas, os reatores anaeróbios contínuos, R3 e R4, de 130 mL (100 mL de volume útil) foram montados. Para o reator R3, utilizaram-se os pedaços de mangueira contidos no interior da garrafa correspondente à última transferência dos testes em batelada. O reator R4 foi inoculado com uma mistura das biomassas em suspensão dos reatores R_T e R_S (2% v/v) e decidiu-se não usar meio suporte, para verificar a atividade da biomassa em suspensão (Figura A2). Os reatores foram operados com variação das condições de gli-LR, TDH e pH.

Figura A2 - Sistema experimental dos reatores contínuos para produção de etanol



R3 dia 0



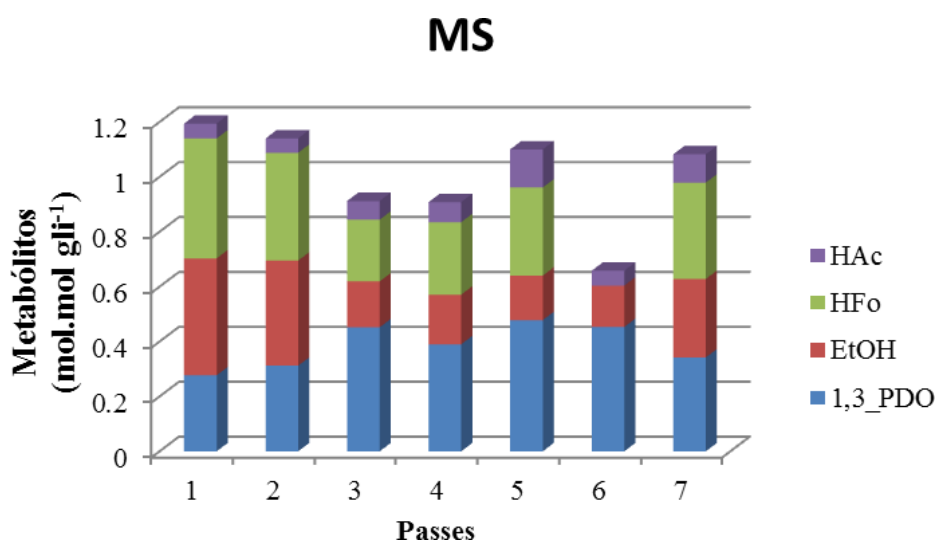
R4 dia 0

Fonte: A autora (2023)

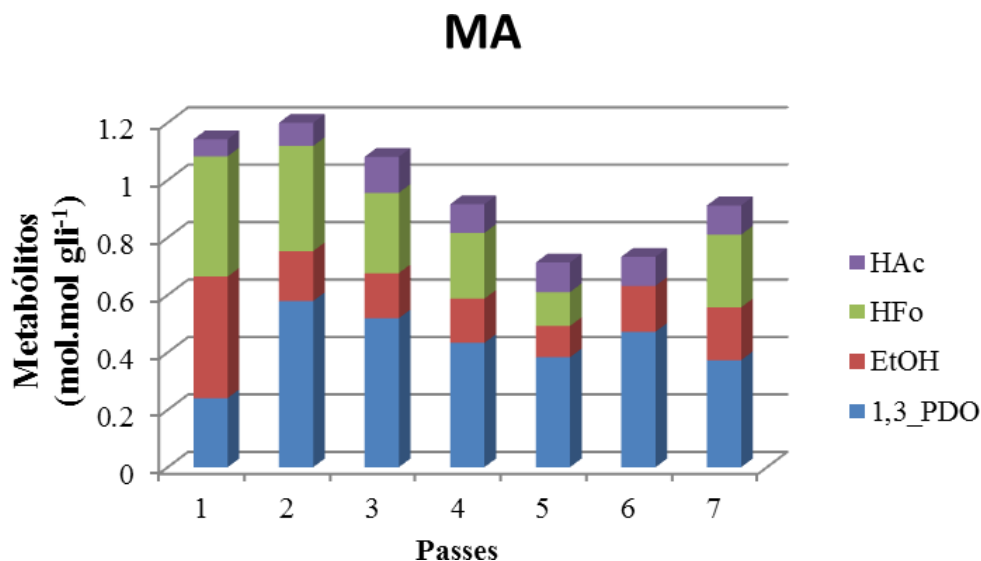
Nas Figuras A3 e A4 são apresentados os resultados dos metabólitos produzidos nos passes MS e MA, respectivamente. Os passes 1, 2, 3 e 4 foram realizados a pH 8,8, o 5 a pH 8,5, 6 a pH 7,0 e o passe 7 a pH 8,0.

Os testes em batelada demonstraram que não havia diferença entre os inóculos MA e MS no primeiro passe, mas ao longo das transferências o comportamento foi mudando, de modo que a biomassa em suspensão (MS) foi um pouco melhor em relação aos rendimentos de etanol. Quanto aos diferentes valores iniciais de pH, a suposição inicial de que pH acima de 8 estava influenciando ainda não pôde ser confirmada nesta etapa. Assim, decidiu-se dar partida aos reatores contínuos com inóculo aderido aos pedaços de mangueira de PVC (R3) e em suspensão (R4) para avaliar a produção de etanol e 1,3-PDO.

Figura A3 - Metabólitos produzidos nos passes do inóculo MS



Fonte: A autora (2023)

Figura A4 - Metabólitos produzidos nos passes do inóculo MA

Fonte: A autora (2023)

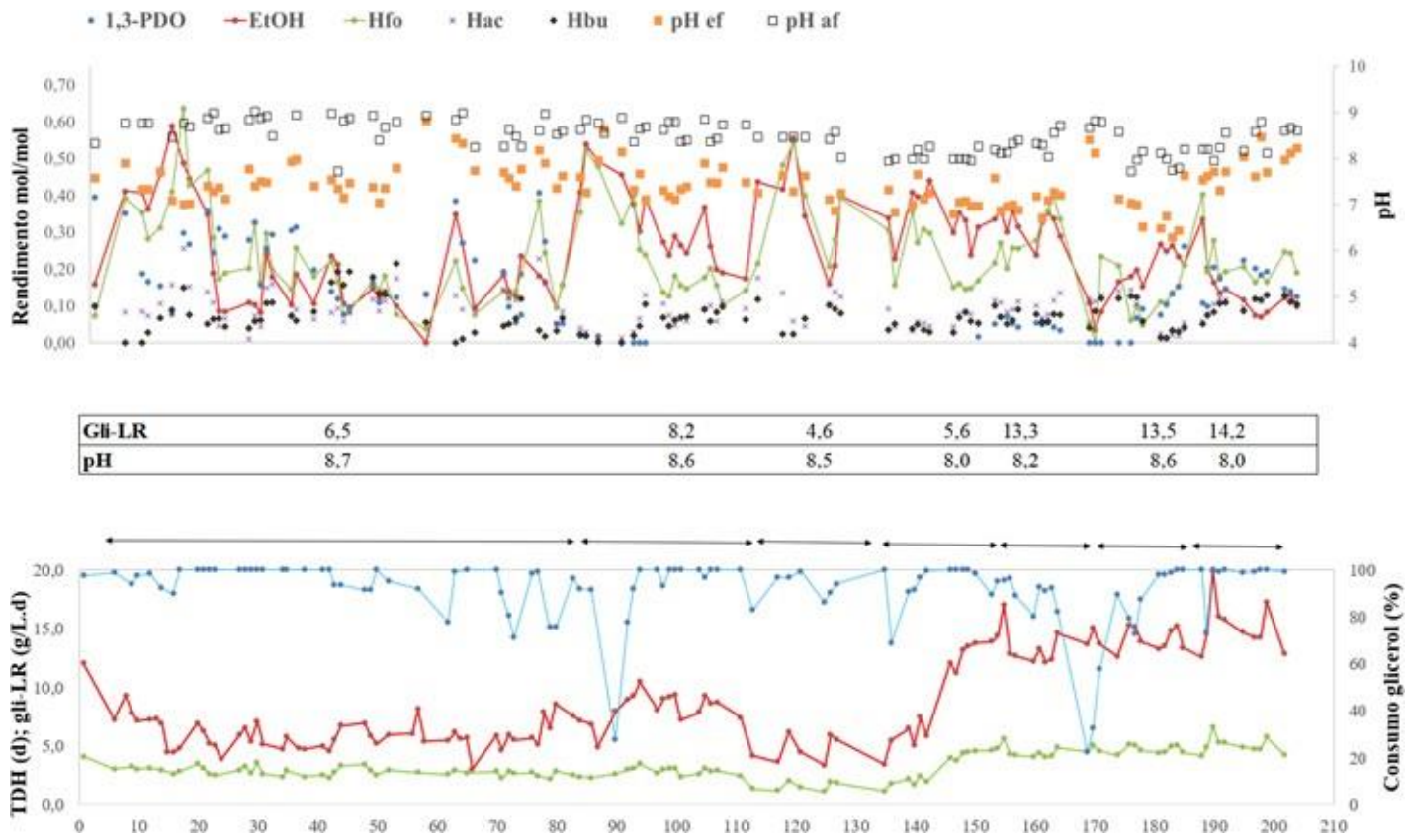
Nos testes com os reatores de operação contínua, o R3 produziu 1,3-PDO, contudo houve pouca produção de etanol ao longo do tempo. Além disso, este reator apresentou grande instabilidade na vazão e nos rendimentos dos produtos. Após 90 dias de operação do R3, não foi possível chegar a uma estabilidade do sistema, levando-nos a concluir que a configuração com meio suporte (pedaços de mangueira de PVC) não foi viável para o tipo de reator utilizado. Assim, decidiu-se seguir os experimentos apenas com o reator com a biomassa suspensa (R4), uma vez que este apresentou resultados relevantes na produção de etanol a $\text{pH} > 8,0$.

Um ponto interessante a discutir é que a produção de 1,3-PDO no R4 foi completamente inibida entre os dias 95 e 150 (Figura A5), após um longo período de operação com pH alto pela adição de NaHCO_3 na relação máxima de $1,0 \text{ g.gDQO}^{-1}$. Após isto, quando se diminuiu o pH inicial a 8, o 1,3-PDO voltou a ser produzido, porém com rendimentos menores que $0,30 \text{ mol.mol.gli}^{-1}$.

A partir desses resultados foi possível inferir que o pH alto influenciou a atividade dos micro-organismos produtores de 1,3-PDO a ponto de inibi-los e que, por isso, em pH maior que 8, mais etanol foi produzido, devido ao favorecimento da rota oxidativa de digestão do glicerol.

Outra hipótese levantada a partir dos testes com esse reator, foi a de que a carga aplicada também exercia influência na atividade microbiana e formação dos produtos, de modo que com cargas menores havia maior produção de etanol. Por isso, decidiu-se seguir estudando tais condições nos reatores contínuos de maior volume, cuja configuração fornecia maior capacidade de manter as condições operacionais mais estáveis. Tal hipótese foi confirmada, conforme os resultados apresentados para o reator R_T (seção 5).

Figura A5 - Parâmetros de operação e rendimentos dos metabólitos líquidos em R4



Fonte: A autora (2023)

APÊNDICE B - RESUMEN EXTENSO EM CASTELLANO

1 INTRODUCCIÓN

El mercado de los biocombustibles está influenciado por la demanda de combustibles y las políticas de incentivos nacionales. La Unión Europea es el principal productor mundial de biodiésel, habiendo producido el 32,3% en 2021, seguido de EE.UU. (18,1%), Indonesia (15,0%) y Brasil (12,2%). Se estima que la producción mundial de biodiesel aumentará a 50 mil millones de litros para 2030, con una mayor producción de los países emergentes. En Brasil, actualmente, se requiere que el 10% del diésel sea biodiesel, mientras que Indonesia introdujo B30 (30%) en 2020 (OECD-FAO, 2021).

El biodiésel se produce a partir de la reacción de transesterificación de grasas vegetales o animales en medio alcalino, siendo el glicerol el principal subproducto. Un factor preocupante es el exceso de glicerol, cuyo proceso de purificación es costoso y, dependiendo de la fuente de producción del biodiesel (aceites vegetales o grasa animal), contiene impurezas como grasas residuales, sales, metanol, jabones y catalizadores, que lo hacen difícil su utilización. Así, la demanda de alternativas para valorizar el glicerol crudo aumenta con la demanda mundial de biodiesel, siendo de gran importancia el estudio de técnicas que posibiliten su reutilización.

El glicerol se puede convertir biológicamente, a través de la fermentación, en varios productos de interés comercial. La conversión se produce por dos vías metabólicas: la vía reductora, en la que se obtiene exclusivamente como subproducto el 1,3-propanodiol (1,3-PDO), y la vía oxidativa, en la que se pueden obtener otros productos, como como H₂, etanol, butanol y ácidos carboxílicos (GARLAPATI; SHANKAR; BUDHIRAJA, 2016; MOSCOVIZ; TRABLY; BERNET, 2016; MONTEIRO *et al.*, 2018). Por lo tanto, los estudios de tecnologías para la obtención de productos de valor añadido a partir del glicerol mediante procesos biológicos pueden contribuir a la valorización del residuo.

El 1,3-PDO es un compuesto orgánico de valor agregado que se utiliza como materia prima principal del poli(tereftalato de trimetileno) (PTT), una fibra de poliéster con aplicación en la industria textil, que es su principal consumidor (KAUR *et al.*, 2020; MARKET&MARKETS, 2022).

Los métodos químicos tradicionales para obtener 1,3-PDO son costosos, especialmente debido a requisitos como el uso de catalizadores y condiciones de alta temperatura y presión. Por otro lado, es posible producir 1,3-PDO biológicamente, siendo el glicerol el sustrato más estudiado, cuya ruta de fermentación reductora resulta en 1,3-PDO como producto final.

Algunos microorganismos son capaces de convertir el glicerol en 1,3-PDO, ácidos grasos (formiato, acetato, butirato) y etanol. Otros oxidan el etanol y promueven el alargamiento de la cadena de ácidos grasos. La sinergia entre las especies permite lograr una coproducción eficiente de 1,3-PDO y otros subproductos de interés (LENG *et al.*, 2019; YANG; HANNA; SUN, 2012).

El rendimiento teórico máximo es de $0,72 \text{ mol.mol-gly}^{-1}$. La mayoría de los estudios que obtuvieron rendimientos de 1,3-PDO cercanos a éste, utilizaron cultivos puros de bacterias fermentadoras de glicerol. Sin embargo, en este caso, son necesarios algunos requisitos, tales como condiciones de esterilidad y, en algunos casos, un medio nutritivo más complejo, lo que dificulta la producción a gran escala.

La producción de 1,3-PDO por cultivos mixtos de bacterias favorece la aplicación a gran escala, sin requisitos de esterilización y con la posibilidad de utilizar glicerol crudo, lo que lo hace más ventajoso frente a cultivos puros (GALLARDO *et al.*, 2014; MOSCOVIZ; TRABLY; BERNET, 2016; VARRONE *et al.*, 2017; DIETZ; ZENG, 2014). Los datos publicados son todavía insuficientes para garantizar su viabilidad. Por lo tanto, es necesario avanzar científicamente para aclarar la influencia de algunos parámetros operativos, con el objetivo de maximizar el rendimiento de 1,3-PDO.

Entre los desafíos encontrados en la aplicación de cultivos mixtos, se destacan la competencia por el sustrato y el control operativo para favorecer una ruta específica. Como ventaja, los cultivos mixtos ofrecen mayor robustez y capacidad para adaptarse a condiciones extremas y metabolizar el glicerol crudo, a pesar de sus impurezas.

En el presente estudio se evaluaron las mejores condiciones de operación para la alcanzar altos rendimientos de 1,3-PDO mediante la fermentación de glicerol puro y crudo por cultivos mixtos de bacterias en experimentos discontinuos y en reactores anaerobios de operación continua, además de la caracterización de la comunidad microbiana como herramienta para complementar el estudio a nivel microbiológico, aportando los datos necesarios y las bases para incentivar la aplicación del proceso con mayor sencillez operativa.

El objetivo general del estudio fue estudiar la fermentación de glicerol (puro y

crudo) en reactores anaeróbicos continuos, aplicando diferentes condiciones operacionales y dos configuraciones de medios soporte, con el objetivo de optimizar la obtención de productos con valor añadido.

El estudio se desarrolló con el fin de cumplir con los siguientes objetivos específicos:

- Estudiar la influencia de las condiciones de pH, la concentración de glicerol y los donadores de electrones en los rendimientos de 1,3-propanodiol en sistemas discontinuos;
- Conseguir el crecimiento y adhesión (formación de una biopelícula) de un cultivo mixto de bacterias anaerobias degradadoras de glicerol en un medio soporte (silicona) que pueda utilizarse en reactores continuos;
- Definir las mejores condiciones de operación, tales como tiempo de retención hidráulica (TRH), pH y carga de glicerol aplicada, para obtener mejores rendimientos de 1,3-propanodiol en reactores anaeróbicos continuos con medio de soporte (configuración filtro ascendente anaeróbico);
- Evaluar la producción de etanol versus 1,3-propanodiol en reactores continuos alimentados con glicerol puro y en condiciones alcalinas por adición de bicarbonato de sodio;
- Caracterizar la comunidad microbiana de los reactores mediante extracción de ADN y secuenciación genética del gen rRNA a partir de las biomasas recolectadas;
- Verificar la ocurrencia de cambios en las especies dominantes influenciados por las condiciones aplicadas a los reactores a lo largo de la operación.

2 EXPERIMENTO EN REACTOR CONTINUO: REACTOR R_T

R_T Como inóculo se utilizó la biomasa de una biopelícula formada utilizando como soporte una manguera de silicona. Dicha manguera se repartió en piezas de aproximadamente 2 cm, que se introdujeron en un reactor de 900 mL, rellenando hasta mitad de su volumen con las piezas, formando un “lecho” con la biomasa inmovilizada.

La operación del reactor se dividió en tres fases: (P1) estudio del efecto de la carga orgánica de glicerol (gli-LR) aplicada, de 6 a 10 g.L⁻¹.d⁻¹; (P2) se mantuvo constante la gli-LR, cercano a 18 g.L⁻¹.d⁻¹ y se aplicaron – al igual que en P1- dosis variables de

bicarbonato de sodio (NaHCO_3); (P3) evaluación de la influencia de gli-LR (9 y 18 $\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$), manteniendo constante la dosis de NaHCO_3 ($1,0 \text{ g.gDQO}^{-1}$).

La dosis de bicarbonato añadida se varió para (i) proporcionar alcalinidad y evitar la disminución del pH; (ii) verificar la influencia en los rendimientos de 1,3-PDO y etanol. El reactor se alimentó continuamente con solución nutritiva de micro y macronutrientes junto al glicerol, a temperatura controlada ($30 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) durante 362 días.

Durante la formación de biopelícula, paso previo a su introducción en el reactor, el producto principal fue 1,3-PDO ($\sim 0,30 \text{ mol.mol-gli}^{-1}$), seguido por ácido acético y etanol ($\sim 0,10 \text{ mol.mol-gli}^{-1}$ cada uno). El consumo de glicerol y la formación de 1,3-PDO y subproductos era índice de que bacterias consumidoras de glicerol estaban adheridas al interior del soporte. Durante el tiempo de operación del reactor, la biomasa también creció en la superficie exterior de los tubos de silicona.

En los primeros siete días de operación no se agregó alcalinidad al medio y esto resultó en un bajo consumo de glicerol (31%) y descenso del pH a 4,0. Por tanto, se pasó a añadir bicarbonato al medio ($1,0 \text{ g.gDQO}^{-1}$ de glicerol). Con esto, los rendimientos de etanol y ácido fórmico aumentaron, mientras 1,3-PDO y acetato disminuyeron. Así, en la fase P1 (0-197 días) se aplicaron dosis más bajas de bicarbonato ($0,5$ y $0,25 \text{ g.gDQO}^{-1}$ de glicerol), aumentando progresivamente la carga, de $5,1$ a $9,8 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ (en promedio).

En la fase P1, los rendimientos de etanol aumentaron de $0,11$ a $0,18 \text{ mol.mol-gli}^{-1}$ con la adición de alcalinidad. Cuando se redujo la dosis de bicarbonato hubo poca diferencia en los rendimientos de etanol ($0,16$ a $0,19 \text{ mol.mol-gli}^{-1}$), mientras los de 1,3-PDO disminuyeron de $0,45$ a $0,31 \text{ mol.mol}^{-1}$. Los resultados llevaron a dos hipótesis: (i) la carga entre $5 - 10 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ no favoreció la producción de 1,3-PDO y aumentó la producción de etanol; (ii) la alcalinidad proporcionada estaría aumentando los rendimientos de etanol.

Así, en P2 se mantuvo la carga más alta ($\sim 18 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) y se varió el bicarbonato ($0,14$, $0,25$ y $0,50 \text{ g.gDQO}^{-1}$). Se alcanzaron rendimientos de 1,3-PDO entre $0,36$ y $0,41 \text{ mol.mol-gli}^{-1}$ y etanol de $\sim 0,1 \text{ mol.mol-gli}^{-1}$. Así, la mayor carga de glicerol favorecía la producción de 1,3-PDO, mientras que el etanol no fue poco afectado, lo que permitió operar el reactor con una cantidad de bicarbonato añadida muy baja.

En P3, los rendimientos de etanol fueron $0,19 \text{ mol.mol}^{-1}$ y $0,04 \text{ mol.mol-gli}^{-1}$, y 1,3-PDO de $0,32$ y $0,47 \text{ mol.mol-gli}^{-1}$ para cargas del orden de $9,0$ y $18,0 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, respectivamente.

La carga de glicerol aplicada influyó en los rendimientos de etanol, que fueron mayores cuando se aplicaron cargas inferiores a $10 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ y pH alcalino (>8). Temudo et al. (2008) variaron glicerol de 4 a $25 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ y observaron que era un factor limitante, con disminución en los rendimientos de etanol y aumento de 1,3-PDO cuando aumentaba el glicerol. Sittijunda; Reungsang (2017) evaluaron la influencia de la carga de glicerol en reactor UASB; el aumento de la carga de 25 a $50 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ provocó aumento de las concentraciones de etanol y 1,3-PDO. Los autores relacionaron a *Klebsiella pneumoniae* con la producción máxima de 1,3-PDO y a *Enterobacter* sp. con la del etanol.

Wu et al. (2011) investigaron el efecto del pH en el rango de 5,5–7,0, trabajando con concentraciones de glicerol de 10–70 g.L^{-1} en fermentador de 2,5 L inoculado con *Klebsiella* sp. HE1; los rendimientos más altos de etanol se produjeron a concentraciones más bajas de glicerol y pH 6.

La mayoría de las especies de *Clostridium* crecen más rápido a pH de 6,5 a 7 (Rainey et al. 2009). Varios estudios han demostrado a *Clostridium* spp. como fermentadores de glicerol y productores de 1,3-PDO (CHATZIFRAGKOU et al., 2011; DIETZ; ZENG, 2014; SITTIJUNDA; REUNGSANG, 2017; TEE et al., 2017; VARRONE et al., 2018; ZHOU et al., 2017). En el presente estudio, el pH del efluente estuvo en el rango óptimo para *Clostridium* y 1,3-PDO fue el producto principal. Estudios adicionales realizados a pHs alcalinos (8,5 - 8,8) y gli-LR en el rango 5,0 - 8,0 $\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ resultaron en rendimientos de etanol cercanos a $0,30 \text{ mol.mol-gli}^{-1}$; no hubo producción de 1,3-PDO, excepto cuando se disminuyó el pH a 8, marcando un límite máximo de pH para la producción de 1,3-PDO.

La biodiversidad del inóculo era muy baja: el 98% del total de secuencias estaban afiliadas a dos filos: *Proteobacteria* y, en mucha menor cantidad, *Firmicutes*. Dentro de *Proteobacteria*, el 67% de las secuencias pertenecía al género *Pseudomonas*, un microorganismo aeróbico quimiorganotrofo, lo que resultó bastante sorprendente. El segundo género predominante dentro de *Proteobacteria* fue *Raoultella* (7,1%), una bacteria entérica anaeróbica facultativa.

Todas las secuencias recuperadas del inóculo incluidas en el filo *Firmicutes* fueron afiliadas al género *Lactobacillus* (18,2%), que son bacterias anaerobias aerotolerantes fermentativas. *Raoultella* y *Lactobacillus* son conocidas bacterias que degradan el glicerol, a menudo detectadas en su conversión a 1,3-PDO. Las dos OTUs mayoritarias del género *Lactobacillus* tienen una homología superior al 99% con las

heterofermentativas *L. casei/paracasei* y *L. parabuchneri*, lo que podría explicar el etanol detectado en la fase P1 del reactor.

Después de 1 año de operación, la población bacteriana cambió radicalmente y la biodiversidad aumentó. Mientras *Pseudomonas*, *Lactobacillus* y *Raoultella* disminuyeron a valores residuales (menos del 1%), el orden *Clostridiales* surgió como predominante (62,6% del total de secuencias). La mayoría de las secuencias afiliadas a los otros dos filos encontrados, *Actinobacteria* y *Bacteroidetes*, se clasificaron en los géneros *Actinomyces*, *Dysgonomonas*, *Parabacteroides* y *Bacteroides*. No se conoce la utilización de glicerol para la mayoría de ellos y se puede considerar que pudieron mantenerse en el reactor utilizando los compuestos liberados por descomposición celular de otras bacterias, lo que justificaría los rendimientos relativamente bajos de 1,3-PDO obtenidos y los productos de fermentación (etanol, formiato, acetato, butirato y lactato) que se encontraron en el reactor.

El empleo de glicerol como única fuente de carbono y energía promovió el desarrollo de géneros adaptados a su degradación. *Lacrimispora* (28,2% del total de secuencias) mostró una similitud del 98,9% con *Lacrimispora sphenoides*, una reclasificación de *Clostridium sphenoides* (HAAS; BLANCHARD, 2020) que había sido descrita en un reactor UASB adaptado al consumo de glicerol (VERAS *et al.*, 2019a). El 70% de las secuencias afiliadas a *Clostridium* mostraron 99,3% de similitud con *C. pasteurianum*.

En resumen, la comunidad microbiana del inóculo sufrió un cambio drástico, como consecuencia del uso de glicerol como única fuente de carbono y energía, además de las condiciones operativas impuestas durante 1 año.

3 EXPERIMENTO EN REACTOR CONTINUO: REACTOR R_S

Como inóculo del reactor R_S se utilizó la biomasa unida a una tubería de silicona. Durante la formación de la biopelícula, el producto principal fue 1,3-PDO ($\sim 0,41$ mol.mol-gli⁻¹). Los subproductos mayoritarios fueron etanol y ácido acético ($\leq 0,10$ mol.mol-gli⁻¹). El consumo de glicerol y la formación de 1,3-PDO y subproductos indicó que bacterias consumidoras de glicerol estaban adheridas al interior de la manguera. Posteriormente se analizó la composición de la biomasa mediante secuenciación masiva. Una explicación para la adhesión de microorganismos a silicona puede estar relacionada con el efecto combinado de la presión y la formación de gas dentro de la manguera de

silicona y la configuración dentro del reactor, que resultó en retención eficiente de biomasa activa (VERAS, 2019).

La manguera 286 cm de longitud, con una biopelícula anaerobia degradadora de glicerol en su interior, se enrolló en forma espiral y acopló a la entrada de un reactor (flujo ascendente) de 900 mL. La operación del reactor se dividió en dos fases: P1 (0 a 293 días) y P2 (294 a 362 días), dónde se utilizó glicerol puro y glicerol crudo, respectivamente. La carga aplicada de glicerol (gli-LR) fue aumentada progresivamente, para no causar un colapso del reactor, subiendo las concentraciones de glicerol de 15 a 30 g.L⁻¹ y de 10 a 60 g.L⁻¹ en las fases P1 y P2, respectivamente. El reactor se alimentó continuamente con solución nutritiva de micro y macronutrientes + glicerol a temperatura controlada (30 ± 2 °C) durante 362 días.

Durante la fase P1, con aplicación de gli-LR promedio de 16,9 g.L⁻¹.d⁻¹, se alcanzaron rendimientos elevados de 1,3-PDO (0,43 en promedio y máximo de 0,60 mol.mol-gli⁻¹) y eficiencia del consumo de glicerol por encima del 90%. Cuando se incrementó la carga a 30 g.L⁻¹.d⁻¹, hubo una disminución drástica del rendimiento de 1,3-PDO y del consumo de glicerol a 0,15 mol.mol-gli⁻¹ y 40% (días 236-238), respectivamente. Luego, gli-LR fue reducida a 25 g.L⁻¹.d⁻¹ (días 273-293), lo que resultó en recuperación de rendimiento de 1,3-PDO a 0,39 mol.mol-gli⁻¹ y consumo > 90%. Por lo tanto, esta fue la carga máxima de glicerol puro que podría aplicarse.

Gallardo *et al.* (2014) obtuvieron 0,52 mol.mol-gli⁻¹ de 1,3-PDO usando reactor EGSB alimentado continuamente. Nakazawa *et al.* (2017) obtuvieron un rendimiento máximo de 1,3-PDO de 0,43 mol.mol-gli⁻¹ en reactor UASB.

En la fase P2, de inicio, se adoptó una carga más baja de glicerol bruto (~10 g.L⁻¹.d⁻¹). Tras alcanzar estados estacionarios, considerando el consumo de glicerol y rendimiento en 1,3-PDO, se fue incrementando paulatinamente la carga. Al elevar gli-LR hasta 39,7 g.L⁻¹.d⁻¹, el rendimiento promedio de 1,3-PDO fue 0,53 mol.mol-gli⁻¹. La carga óptima para el glicerol bruto fue de 46,0 g.L⁻¹.d⁻¹, con una productividad volumétrica promedio de 14,7 g.L⁻¹.d⁻¹ y un rendimiento promedio de 1,3-PDO de 0,62 mol.mol-gli⁻¹. Este valor es notable al obtenerse en un reactor continuo con cultivo mixto, pues se acerca del rendimiento teórico máximo de 0,72 mol.mol-gli⁻¹ (ZENG, 1996).

En la fase P2, usando glicerol bruto, la ruta reductora fue favorecida y el rendimiento de 1,3-PDO fue mucho mayor, incluso cuando la carga de glicerol aumentó, especialmente cuando el acetato era el subproducto principal, y un alto porcentaje (85-90%) de glicerol crudo se convirtió en productos. La estrategia de aumentar

progresivamente la gli-LR al cambiar el glicerol puro a bruto puede haber favorecido la adaptación de las bacterias (SZYMANOWSKA-POWALOWSKA, 2015), capaces de tolerar las cargas altas, con el consiguiente cambio en la comunidad microbiana.

Para comprender el cambio observado en las dos fases, se realizó secuenciación masiva por Illumina. Las muestras analizadas fueron: biopelícula adherida a la manguera utilizada como inóculo (S1), biopelícula adherida a la manguera y biomasa en suspensión recolectada al final del período de alimentación con glicerol puro (S2 y S3, respectivamente), biopelícula adherida a la manguera, biomasa en suspensión y biomasa sedimentada recolectada al final de la alimentación de glicerol crudo (S4, S5 y S6, respectivamente).

En S1 (inóculo), la diversidad bacteriana fue baja. El filo *Firmicutes* representó el 72% y junto con *Proteobacteria* formaron el 97,7% del total de secuencias. De las secuencias afiliadas a *Clostridiales*, el género *Clostridium* representó solo el 0,3%. *Lactobacillales* (*Firmicutes*) y *Enterobacteriales* (*Proteobacteria*) fueron los órdenes muy predominantes. Solo dos géneros: *Lactobacillus* (70,6%) y *Raoultella* (23,3%) fueron relevantes.

Después de 293 días de alimentación del reactor con glicerol puro, los *Firmicutes* permanecieron mayoritarios representando más del 75% de la biomasa, tanto en suspensión (S2) como adherida (S3). *Klebsiella* / *Raoultella* pasó de 23,3% en el inóculo a 9,7 y 7,4% en S2 y S3, respectivamente. Por otro lado, *Actinomyces* y *Olsenella* aumentaron de 0,4% en el inóculo a 8% y 9,3% en S2 y S3, respectivamente.

Al final de la operación, el phylum *Firmicutes* se mantuvo mayoritario (alrededor del 70%). Sin embargo, la familia *Clostridiaceae* se redujo a un tercio en S2 y aparecieron otras familias *Clostridiales*, es decir, *Eubacteriaceae*, *Lachnospiraceae* y *Porphyromonadaceae*.

Aunque el género *Clostridium* siguió siendo mayoritario en la biomasa adherida, otros géneros, por ejemplo, *Lacrimispora* y *Hydrogenoanaerobacterium*, se encontraban entre los más numerosos. Además, *Eubacterium* fue dominante (27,6%) en la biomasa suspendida.

El segundo filo más abundante, *Proteobacteria*, disminuyó cuando el reactor se alimentó con glicerol crudo, lo que se asoció con una reducción en la familia *Enterobacteriaceae*, géneros *Klebsiella* / *Raoultella* (menos del 1%). La presencia de los phylum *Bacteroidetes* y *Thermodesulfobacteria* aumentó, con la emergencia del género *Bacteroides* en la biomasa suspendida y *Thermodesulfatator* en la biomasa adherida.

En resumen, la biodiversidad aumentó a lo largo de la operación del reactor, siendo mayor al final de la operación (muestras S4, S5) en comparación con la población microbiana del reactor alimentado con glicerol puro (muestras S2, S3). En la biomasa depositada en el fondo del reactor (S6), el 99% de las secuencias pertenecían al orden *Clostridiales*, familia *Clostridiaceae*, géneros *Anaerobacter* (78,7%) y *Acetomaculum* (12,9%).

La abundancia de *Lactobacillus* en el inóculo (70%) no sorprende. *L. brevis* (SZYMANOWSKA *et al.*, 2013), *L. reuteri* (RICCI *et al.*, 2015; SUPPURAM *et al.*, 2019), *L. diolivorans* (PFLÜGL *et al.*, 2014), *L. parabuchneri*, *L. casei/paracasei* y *L. coryniformis* (VERAS *et al.*, 2019a) se han descrito previamente en reactores anaeróbicos que degradan glicerol.

Sin embargo, *Lactobacillus* spp., no utilizan glicerol como única fuente de carbono y requieren un sustrato adicional para la fermentación. El alto predominio en el inóculo se puede atribuir al mantenimiento de la biomasa utilizada como inóculo, que estuvo dos años a 4 °C. Con la consiguiente adaptación de la comunidad microbiana a glicerol como única fuente de carbono y energía, *Lactobacillus* prácticamente desapareció en las biomasas suspendidas y sedimentadas al final de la operación.

Especialmente notables fueron los géneros de *Eubacterium*, desde menos del 1% en el inóculo hasta ser dominante en S5; *Caproiciproducens*, desde menos del 0,1% hasta alrededor del 10%; *Lacrimispora* y *Hydrogenoanaerobacterium*, de menos del 0,1% al 9,4% después de alimentar el reactor con glicerol crudo.

Lacrimispora es un nuevo género para especies clasificadas en *Clostridium*. Se ha descrito que *L. sphenoides* no fermenta el glicerol. En general, las especies incluidas en la familia *Lachnospiraceae*, no utilizan glicerol para el crecimiento. Del mismo modo, *Hydrogenoanaerobacterium* no fermenta el glicerol (SONG; DONG, 2009). Sin embargo, *Caproiciproducens* si lo fermenta (KIM *et al.*, 2015).

Klebsiella-Raoultella, el segundo género más abundante en el inóculo aún mantuvo una presencia significativa en el reactor alimentado con glicerol puro (9,7-7,4%), alcanzando un mínimo en la biomasa adherida y residual en la biomasa en suspensión tras la alimentación con crudo glicerol.

Actinobacteria, género *Actinomyces*, aparentemente no depende del uso de glicerol puro o crudo: la cobertura fue similar y la especie más probable fue, en ambos casos, *A. polynesiensis* (99% de similitud).

Por otro lado, las abundancias de *Thermodesulfator*, *Bacteroides* y *Dysgonomonas* parecen haber sido fuertemente influenciadas por la alimentación, aumentando significativamente en la comunidad microbiana después de alimentar el reactor con glicerol crudo.

La presencia destacada de *Thermodesulfator*, así como el aumento de *Desulfovibrio* y *Clostridium desulfidigenes* (45% de las secuencias dentro del género *Clostridium* en S5), después de alimentar el reactor con glicerol crudo, podrían estar relacionadas con el contenido de sulfato del glicerol crudo utilizado.

La biomasa que se acumuló en el fondo del reactor (S6) estuvo dominada por dos únicos géneros: *Anaerobacter* (78,7%) y *Acetomaculum* (12,9%). El predominio de ambos géneros en el fondo del reactor sugiere que pueden hacer uso de los componentes liberados tras la descomposición celular de bacterias degradadoras de glicerol y de la liberación de hidrógeno durante la fermentación de estos componentes en el reactor.

4 EXPERIMENTOS EN REACTORES DISCONTINUOS

Se realizaron una serie de ensayos por lotes (*batch*), antes y después de la operación de los reactores operando de forma continua.

4.1 Influencia de las concentraciones de hidrógeno y glicerol y el volumen de gas (espacio de cabeza) en los rendimientos de 1,3-PDO y subproductos

Se estudió el efecto del hidrógeno sobre la reducción de glicerol a 1,3-PDO aplicando diferentes relaciones glicerol/H₂. Los rendimientos de 1,3-PDO (en mol.mol-gli⁻¹) fueron 0,51±0,05, 0,53±0,04 y 0,60±0,02, para las relaciones de 0 (sin adición de gas), 0,5 y 1,0, respectivamente.

La relación 1,0 fue la mejor condición para el rendimiento máximo de 1,3-PDO, estando de acuerdo con el balance redox equivalente, en el que se necesita 1 mol de H₂ para reducir 1 mol de glicerol. Sin embargo, las diferencias no fueron significativas y el efecto de H₂ sobre la producción de 1,3-PDO no estuvo claro.

En estudios complementarios variando el espacio de cabeza (entre 80 y 90%) no hubo consumo de H₂ en ninguna condición. Sin embargo, su retención en el espacio de cabeza no redujo los rendimientos de 1,3-PDO. Solo con el menor espacio de cabeza ensayado (80%) hubo producción de etanol, lo que podría indicar influencia de la presión de los gases, ya que la oxidación del etanol a ácido acético disminuye a medida que

aumenta la presión parcial de H_2 (HARPER; POHLAND, 1986). Sin embargo, se necesitarían más pruebas para confirmar la relación.

4.2 Influencia de la concentración de glicerol en el rendimiento de 1,3-PDO y subproductos

Independientemente de la concentración, el glicerol se convirtió principalmente en 1,3-PDO, con aumento en los rendimientos de 0,30, 0,34 y 0,49 mol.mol.gli⁻¹ a medida que aumentaba la concentración inicial de glicerol de 5,0, 21,0 y 44 g.L⁻¹, respectivamente, demostrando una preferencia por la vía reductiva.

La producción de etanol solo ocurrió en la menor concentración inicial de glicerol, lo cual está en línea con lo descrito en bibliografía (GARLAPATI *et al.*, 2016; MOSCOVIZ; TRABLY; BERNET, 2016; ZENG; BIEBL, 2002).

4.3 Influencia del pH y concentración y tipo de glicerol

En los ensayos inoculados con biomasa del reactor R_T y glicerol puro como sustrato, los rendimientos de 1,3-PDO fueron más altos ($\sim 0,4$ mol.mol.gli⁻¹) a pH 7, independiente de la concentración inicial de glicerol. Con respecto al etanol, el rendimiento fue mayor ($\sim 0,3$ mol.mol.gli⁻¹) a la menor concentración de glicerol aplicada (10 g.L⁻¹) y pH 8.

Cuando el glicerol crudo y la biomasa del R_S fueron sustrato e inóculo, la producción de etanol fue menor (0,1 – 0,2 mol.mol.gli⁻¹) en comparación al inóculo de R_T, y solo ocurrió en concentraciones a pH 8. Los rendimientos de 1,3-PDO fueron más altos a pH 8, siendo $\sim 0,6$ y $0,4$ mol.mol.gli⁻¹ a concentraciones iniciales de 10 y 30 g.L⁻¹, respectivamente.

4.4 Influencia de los donadores de electrones (H_2 , lactato, metanol y etanol) en el rendimiento de 1,3-PDO

En este ensayo se estudió la hipótesis de que donadores de electrones favorezcan la transformación del glicerol en 1,3-PDO, considerando que se consume 1 mol de H_2 para producir 1 mol de 1,3-PDO, y que la oxidación de 1 mol de ácido láctico, metanol o etanol libera suficiente poder reductor ($2 H_2$) para reducir 2 moles de glicerol.

Los resultados mostraron que las bacterias adaptadas a los reactores continuos sin la adición de un donador de electrones produjeron 1,3-PDO con rendimientos muy altos (0,52 a 0,67 mol.mol.gli⁻¹), sin consumir los potenciales donadores. Estos resultados son

muy positivos desde el punto de vista del escalado a plana industrial, pues indican que no es necesario donantes para mejorar los rendimientos, demostrando que durante el año de operación del reactor tuvo lugar la selección de bacterias productoras de 1,3-PDO.

5 CONCLUSIONES

- Las mangueras de silicona son excelentes medios de soporte para la inmovilización de microorganismos que fermentan glicerol y producen 1,3-PDO, capaces de adherirse al soporte y desarrollarse en reactores anaerobios en las más adversas condiciones de operación;
- En experimentos discontinuos, se demostró la influencia de las concentraciones de glicerol y del pH inicial en los rendimientos de los productos, con resultados muy similares a los observados en los reactores continuos; la influencia de la retención del H_2 en la producción de 1,3-PDO no ha sido completamente esclarecida y debería continuar siendo estudiada;
- En el reactor continuo R_T (configuración de filtro con flujo ascendente), las condiciones de carga de glicerol aplicada (gli-LR) y, posiblemente, las variaciones de pH provocadas por las diferentes dosificaciones de $NaHCO_3$, provocaron cambios en la comunidad bacteriana del reactor;
- En cuanto a los productos del R_T, lo más significativo es que la gli-LR influyó fuertemente en los rendimientos de 1,3-PDO y etanol;
- La comunidad microbiana inicialmente presente en el inóculo R_T sufrió un cambio drástico, como resultado de uso de glicerol como única fuente de carbono y energía, y de las condiciones de operación. Si el inóculo estuvo dominado por *Pseudomonas* (67%), *Lactobacillus* (18,2%) y *Raoultella* (7,1%), estas abundancias se redujeron a menos del 1%. El orden *Clostridiales* pasó de 0,2% en el inóculo a 62,6%. Los géneros *Lacrimispora* y *Clostridium*, conocidos por convertir el glicerol en 1,3-PDO, formaron el 40% de las secuencias recuperadas al final de los experimentos;
- Los resultados alcanzados en el reactor (R_S), con la tubería de silicona arrollada en espiral (configuración de flujo pistón parcial), son prometedores de cara a la producción de 1,3-PDO (máximo rendimiento de $0,62 \text{ mol.mol-gli}^{-1}$ con la carga óptima de $46 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ de glicerol crudo), especialmente considerando que (i)

funcionaba de manera continua; (ii) un cultivo activo mixto y denso se desarrolló muy bien en la manguera de silicona y; (iii) se utilizó glicerol crudo como fuente de carbono y energía;

- En ambos reactores continuos (R_T y R_S), los resultados fueron interesantes para la producción a gran escala: un consorcio microbiano complejo mostró robustez y adaptación a condiciones operativas variables; la tendencia observada para el etanol podría ser útil para su producción, si se aplicaran condiciones de alcalinidad ($\text{pH} > 8$) y baja carga; Con respecto a la obtención de 1,3-PDO, la aplicación de cargas altas de glicerol y valor del pH alrededor de 8, favorecieron su producción;
- En la comunidad microbiana del reactor R_S, el inóculo presentó baja diversidad, con dominancia de *Lactobacillus* (70,6%) y *Klebsiella/Raoultella* (23,3%). Después de la alimentación con glicerol puro (fase P1), hubo una disminución significativa de *Klebsiella/Raoultella* en la biomasa adherida al soporte. Al final de P1, hubo mayor diversidad microbiana, con presencia de *Clostridium* y familia *Ruminococcaceae* como mayoritarios, demostrando que las condiciones eran favorables para la selección de consumidores de glicerol;
- Al final de la fase P2 (con glicerol crudo), la diversidad fue aún mayor. *Clostridium* permaneció como el mayoritario en la biomasa adherida al soporte; los géneros *Lacrimispora* e *Hydrogenoanaerobacterium*, muy raros en el inóculo y cuando el reactor se alimentaba con glicerol puro, fueron de los más abundantes;
- *Anaerobacter* (78,7%) y *Acetitomaculum* (12,9%), géneros no reportados como degradadores de glicerol, fueron detectados en la biomasa que se acumuló en el fondo del reactor R_S;
- Una parte importante de la biomasa final (en ambos reactores continuos) fueron bacterias que no consumen glicerol y crecieron a expensas de los productos de descomposición celular;
- Se deben realizar estudios adicionales para aclarar la relación entre las diferentes condiciones operacionales de pH y gli-LR, productos obtenidos en la fermentación y las especies dominantes.