

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA HIDRÁULICA E AMBIENTAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA CIVIL

MICHAEL BARBOSA VIANA

**DIGESTÃO ANAERÓBIA DO GLICEROL ORIUNDO DA PRODUÇÃO DO
BIODIESEL: ALTERNATIVAS PARA GERAÇÃO DE ENERGIA E PRODUTOS DE
ALTO VALOR AGREGADO**

FORTALEZA

2016

MICHAEL BARBOSA VIANA

DIGESTÃO ANAERÓBIA DO GLICEROL ORIUNDO DA PRODUÇÃO DO BIODIESEL:
ALTERNATIVAS PARA GERAÇÃO DE ENERGIA E PRODUTOS DE ALTO VALOR
AGREGADO

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil do Departamento de Engenharia Hidráulica e Ambiental da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Engenharia Civil. Área de concentração: Saneamento Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. André Bezerra dos Santos.

Co-orientador: Dr. Renato Carrhá Leitão.

FORTALEZA

2016

MICHAEL BARBOSA VIANA

DIGESTÃO ANAERÓBIA DO GLICEROL ORIUNDO DA PRODUÇÃO DO BIODIESEL:
ALTERNATIVAS PARA GERAÇÃO DE ENERGIA E PRODUTOS DE ALTO VALOR
AGREGADO

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil do Departamento de Engenharia Hidráulica e Ambiental da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Engenharia Civil. Área de concentração: Saneamento Ambiental.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. André Bezerra dos Santos (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Renato Carrhá Leitão (Co-orientador)
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa)

Prof. Dr. Paulo Igor Milen Firmino
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Sávvia Gavazza dos Santos Pessôa
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

À minha família. Aos membros em vida e *in memoriam*.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelas bênçãos diárias.

À minha família, pela união e apoio. Em especial à minha mãe, irmãos e sobrinhos.

Ao professor André Bezerra dos Santos, pela orientação, acolhimento e compreensão durante todo o doutorado.

Ao pesquisador da Embrapa Agroindústria Tropical Renato Carrhá Leitão, pela confiança, respeito, incentivo e conhecimento repassado.

Aos professores Paulo Igor Milen Firmino e Luciana Rocha Barros Gonçalves, ambos da Universidade Federal do Ceará, e Sávia Gavazza dos Santos Pessôa, da Universidade Federal de Pernambuco, por aceitarem participar da banca examinadora, pela colaboração e pelas proveitosas sugestões.

Ao CNPq (Projeto número 473352/2011-7) e FUNCAP pelo apoio financeiro a esta pesquisa.

À Universidade Federal do Ceará, em especial ao Departamento de Engenharia Hidráulica e Ambiental (DEHA) e seu corpo docente. Agradeço também ao DEHA por ceder as dependências do Laboratório de Saneamento Ambiental (Labosan) durante os experimentos.

À Embrapa Agroindústria Tropical, pela disponibilidade de pessoal, de estrutura física e de material durante a fase experimental do doutorado. Agradeço, sobretudo, aos colegas de pesquisa do Laboratório de Tecnologia da Biomassa (Embrapa): Alexandre, Will, Camila, Rose, Eduardo, Aldo, Isabele e Socorro. Além desses, quero agradecer ao Dr. Tito Gehring, pelas valiosas contribuições dadas à tese. Um agradecimento especial à Beatriz, bolsista de iniciação científica que me apoiou em grande parte dos experimentos do doutorado. Não poderia deixar de exaltar também a competência técnica de Lilian Chayn (laboratorista) e Ana Cassales (analista). Aos laboratórios de Análise Instrumental e Biologia Molecular, ambos localizados nas dependências da Embrapa Agroindústria Tropical, pela realização de parte dos experimentos.

À Petrobrás, que, por meio da Usina de Biodiesel de Quixadá (UBQ), forneceu o glicerol utilizado nessa pesquisa. Agradeço também aos técnicos Aline e Tássio, da UBQ, pelas análises de caracterização do glicerol residual.

À Gleycielle. Noiva, exemplo de mulher. Obrigado pela compreensão e por cada segundo juntos.

Aos meus amigos e companheiros de profissão Chagas e Rérisson, pelas discussões multidisciplinares e pelas horas de descontração.

Aos meus amigos-irmãos Igor, João Paulo, Yuri, Carol e Quézia, pelos anos de amizade sincera e verdadeira.

Agradeço também aos colegas da turma de 2012 do DEHA-UFC, extremamente unidos durante a fase de disciplinas.

Aos pesquisadores da Embrapa: Mén de Sá, Morsyleide, João Paulo e Cléa pelo incentivo e apoio prestado.

Ao IFCE, em especial ao campus de Quixadá, instituição da qual faço parte do corpo docente, pelo acolhimento e flexibilidade ao permitir que a parte final do doutorado fosse concluída sem transtornos. Aproveito para agradecer ao apoio de todo o corpo docente do campus e aos técnicos administrativos desta instituição. Agradeço também aos meus bolsistas e demais alunos do campus pela força.

Aos amigos professores da época em que fiz parte do Campus Sobral do IFCE, por todos os momentos compartilhados entre 2010 e 2014: Aline, Marcos Érick, Sarah, Germário, Danilo, João Paulo, Socorro Hortegal, Eliano, Reuber, Edirsana, Marcelo Teles, Daniele Henrique, Glendo e Josenir.

Enfim, obrigado a todos que, de alguma forma, contribuíram para que este momento se tornasse realidade.

“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez”.

(George Bernard Shaw)”

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar o glicerol proveniente de biodiesel como substrato para síntese de hidrogênio (H_2), metano (CH_4) e ácidos carboxílicos através de digestão anaeróbia. Inicialmente, foram realizados testes de bancada alimentados em batelada com a finalidade de avaliar o efeito da relação substrato/micro-organismo (S_0/X_0) na produção de H_2 . Os valores de S_0/X_0 testados variaram entre 1 e 16 g de demanda química de oxigênio (DQO)/g de sólidos totais voláteis (STV). Na segunda etapa da pesquisa, a produção de H_2 foi avaliada variando-se a fonte de inóculo (lodo floculento proveniente de estação de tratamento de esgoto sanitário – ES, lodo granular proveniente de estação de tratamento de efluente de cervejaria – EC, líquido ruminal de caprino – LR e uma mistura uniforme destes inóculos – MX) e o pré-tratamento aplicado (adição de clorofórmio, choque ácido e choque de calor). Para os experimentos em fluxo contínuo, foi usado um sistema de reatores anaeróbios do tipo UASB (*upflow anaerobic sludge blanket*) em série, alimentado com glicerol residual para avaliar a produção de H_2 e CH_4 . Na última etapa da pesquisa, foram conduzidos testes em batelada para avaliar o glicerol como substrato para produzir ácidos caproico (C6) e caprílico (C8), variando-se a origem do inóculo, a concentração de etanol, com e sem bioaugmentação com *Clostridium acetobutylicum*. Os resultados do teste de S_0/X_0 mostraram que o máximo rendimento de H_2 (32 mL H_2 /gDQO_{adicionada} ou 35 L H_2 /kg glicerol) foi alcançado quando aplicou-se S_0/X_0 de 10 gDQO/gSTV. Acima desse valor, o rendimento de H_2 diminuiu, mas a taxa de produção específica se mantém constante (em média 167 mL H_2 /[gSTV.d]). Os testes de pré-tratamento do inóculo comprovaram que os inóculos ES, LR e MX, adicionados de clorofórmio, foram os mais eficientes em selecionar as bactérias produtoras de hidrogênio, com rendimentos variando entre 0,12 e 0,21 mol H_2 /mol glicerol. Os resultados em fluxo contínuo mostraram que o UASB produtor de H_2 (RH) preenchido com meio suporte pôde ser operado estavelmente a 50 kgDQO/m³.d e produzir 46 L biogás/d, sendo 51% composto por H_2 , o que se reflete em um rendimento de 0,135 mol H_2 /mol glicerol. Já o reator UASB produtor de CH_4 , alimentado com efluente diluído do RH, foi operado com COV máxima de 19 kgDQO/m³.d e foi capaz de produzir 92 L biogás/d, sendo 74% composto por CH_4 , acarretando uma produção específica de metano igual a 0,25 m³ CH_4 /kgDQO adicionada. Em termos energéticos, o H_2 e o CH_4 produzidos pelos reatores UASB são capazes de gerar 233 MJ/m³ reator. Por fim, os testes de produção de C6 e C8 permitiram concluir que as maiores concentrações (3,8 g C6/L e

1,7 g C8/L) foram encontradas quando lodo granular proveniente de estação de tratamento de efluente de cervejaria foi bioaumentado, com adição de etanol a 100 mM.

Palavras-chave: 1,3-propanodiol; ácido caproico; glicerina; hidrogênio, metano.

ABSTRACT

This study aimed to assess the crude glycerol from biodiesel industry as substrate for hydrogen (H₂), methane (CH₄) and carboxylic acids synthesis by anaerobic digestion. Initially, batch tests were carried out to assess the effect of substrate/microorganism ratio (S₀/X₀) on H₂ production. The S₀/X₀ values varied from 1 to 16 g COD (chemical oxygen demand)/g total volatile solids (TVS). Then, the H₂ production was evaluated by using different seed inocula (flocculent sludge from domestic wastewater treatment plant – DW; granular sludge from a brewery effluent treatment plant – BE; goat ruminal liquid – RL; and a mixture of these three inocula – MX) and techniques for methanogen inhibition (TMI) (addition of chloroform, acid shock and heat shock). For the experiments in continuous flow, a systems of anaerobic reactors (UASB - *upflow anaerobic sludge blanket*) feed with residual glycerol to assess production of H₂ and CH₄ in series. Finally, batch tests were carried out to asses the production of carboxylic acids (*n* caproic-C6 and *n*-caprylic acid C8) using glycerol as substrate and varying seed inocula, ethanol concentration with and without bioaugmentation with *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. Results from the S₀/X₀ tests showed that the higher H₂ yield (32 mL H₂/gCOD_{added} or 35 L H₂/kg glycerol) was achieved with a S₀/X₀ ratio of 10 gCOD/gTVS. Above this, H₂ yield decreased, however the specific production rate remained constant (167 mL H₂/[gTVS.d]). Results from the TMI tests showed that the seed inocula DW, RL and MX when added of chloroform (0.05%) were more efficient to select H₂-producing bacteria and the higher H₂ yield varied from 0.12 to 0.21 mol H₂/mol glycerol. Flow continuous experiments showed that the H₂-producing UASB reactor (HR) filled with support material was stable at 50 kgCOD/m³.d and produced 46 L biogas/d. The biogas was composed of 51% of H₂, demonstrating a yield of 0.135 mol H₂/mol glycerol. The CH₄-producing UASB reactor, feed with diluted effluent from RH and operated with a maximum OLR of 19 kgCOD/m³.d produced 92 L biogas/d (74% composed by CH₄), and a specific methane production of 0.25 m³CH₄/kgCOD_{added}. The H₂ and CH₄ produced by the UASB reactors are able to generate 233 MJ/m³ reactor. Finally, the results for C6 e C8 production tests showed that the higher concentrations (3.8 g C6/L e 1.7 g C8/L) were achieved with granular sludge (from a brewery effluent treatment plant) bioaugmented and with ethanol addition (100 mM).

Palavras-chave: 1,3-propanediol; glycerine; hydrogen; methane; *n*-caproic acid.

SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO E ESCOPO DA TESE.....	17
2 PRODUÇÃO FERMENTATIVA DE HIDROGÊNIO A PARTIR DE GLICEROL RESIDUAL: UMA REVISÃO	18
2.1 Introdução.....	18
2.2 Bioquímica da digestão anaeróbia de glicerol	19
2.3 Fatores que afetam a produção de H₂ a partir de glicerol	22
2.3.1 <i>Tipo de reator</i>	22
2.3.2 <i>Inóculo e pré-tratamentos</i>	24
2.3.3 <i>Razão inicial substrato:micro-organismo (S₀/X₀)</i>	25
2.3.4 <i>Temperatura</i>	27
2.3.5 <i>pH</i>	27
2.3.6 <i>Tampão</i>	29
2.3.7 <i>Diversidade microbiana em reatores anaeróbios produtores de hidrogênio</i>	29
2.4 Discussão final	32
3 PRODUÇÃO BIOLÓGICA DE HIDROGÊNIO A PARTIR DE GLICEROL RESIDUAL: EFEITO DA TÉCNICA DE INIBIÇÃO DA METANOGÊNESE E ORIGEM DO INÓCULO.....	34
3.1 Introdução.....	34
3.2 Material e métodos	37
3.2.1 <i>Glicerol residual.....</i>	37
3.2.2 <i>Inóculos e técnicas de inibição da metanogênese (TIM)</i>	37
3.2.3 <i>Testes em batelada</i>	38
3.2.4 <i>Métodos analíticos</i>	39
3.2.5 <i>Análise estatística.....</i>	40
3.3 Resultados e discussão	40
3.3.1 <i>Produção acumulada de metano e hidrogênio.....</i>	40
3.3.2 <i>Efeito da técnica de inibição da metanogênese (TIM).....</i>	45
3.3.3 <i>Influência do inóculo.....</i>	49
3.3.4 <i>Metabólitos solúveis</i>	52
3.4 Conclusões.....	55

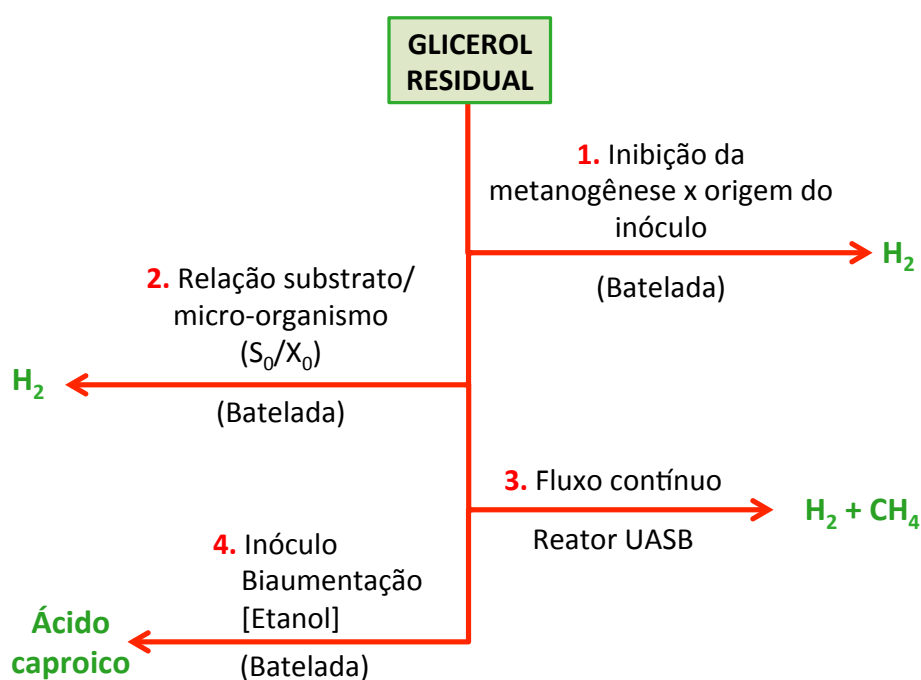
4 EFEITO DA RELAÇÃO SUBSTRATO:MICRO-ORGANISMO (S_0/X_0) NA PRODUÇÃO BIOLÓGICA DE HIDROGÊNIO A PARTIR DE GLICEROL RESIDUAL	56
4.1 Introdução.....	56
4.2 Material e métodos	59
4.2.1 <i>Substrato</i>	59
4.2.2 <i>Inóculo</i>	59
4.2.3 <i>Procedimento experimental</i>	60
4.2.4 <i>Métodos analíticos</i>	61
4.2.5 <i>Análise dos dados</i>	62
4.3 Resultados e discussão	62
4.3.1 <i>Produção acumulada de metano e hidrogênio, e rendimento de H_2</i>	62
4.3.2 <i>Taxa de produção específica de hidrogênio (TPEH)</i>	68
4.3.3 <i>Consumo de glicerol, produção de metabólitos solúveis e balanço de massa</i>	69
4.4 Conclusões.....	73
5 PRODUÇÃO DE METANO E HIDROGÊNIO A PARTIR DE GLICEROL RESIDUAL USANDO UM PROCESSO ANAERÓBIO DE DUAS FASES.....	74
5.1 Introdução.....	74
5.2 Material e métodos	79
5.2.1 <i>Glicerol</i>	79
5.2.2 <i>Reatores UASB</i>	79
5.2.3 <i>Inóculo</i>	81
5.2.4 <i>Partida e operação</i>	83
5.2.5 <i>Monitoramento dos reatores</i>	85
5.2.6 <i>Potencial energético</i>	86
5.3 Resultados e discussão	87
5.3.1 <i>Operação dos reatores UASB produtores de H_2</i>	87
5.3.2 <i>Balanço de massa e consumo de glicerol na produção de H_2</i>	107
5.3.3 <i>Operação do reator UASB produtor de CH_4 (RM)</i>	109
5.3.4 <i>Potencial energético a partir do H_2 e CH_4 produzidos a partir de glicerol</i>	114
5.4 Conclusões.....	119

6 PRODUÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA MÉDIA VIA DIGESTÃO ANAERÓBIA DE GLICEROL RESIDUAL USANDO CULTURA MISTA BIOAUMENTADA	121
6.1 Introdução.....	121
6.2 Material e Métodos.....	125
6.2.1 <i>Glicerol.....</i>	125
6.2.2 <i>Inóculo e micro-organismo para bioaugmentação</i>	125
6.2.3 <i>Procedimento experimental.....</i>	126
6.2.4 <i>Extração e amplificação de DNA e DGGE</i>	127
6.2.5 <i>DGGE e análise de impressões digitais</i>	128
6.3 Resultados e discussão	129
6.3.1 <i>Fermentação de glicerol por cultura mista.....</i>	129
6.3.2 <i>Bioaugmentação com C. acetobutylicum</i>	132
6.3.3 <i>Análises de DGGE.....</i>	135
6.4 Conclusões.....	137
7 DISCUSSÃO FINAL.....	139
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	141

1 APRESENTAÇÃO E ESCOPO DA TESE

Após ser comprovado que o glicerol proveniente da indústria de biodiesel poderia ser facilmente convertido a metano (VIANA, 2011; VIANA et al., 2012b), a presente pesquisa se propôs a avaliar esse glicerol residual como substrato para produção biológica de hidrogênio via digestão anaeróbia. Antes de inocular um reator de fluxo contínuo, foi necessário se conduzir experimentos em batelada para investigar a relação substrato/microorganismo que proporcionaria o maior rendimento de H_2 . Em seguida, também foram realizados ensaios em batelada para determinar qual inóculo e técnica de inibição da metanogênese produziriam os maiores volumes de hidrogênio. Após o fim dos testes em batelada, deu-se início aos testes em fluxo contínuo. Um reator do tipo UASB foi alimentado com glicerol como única fonte de matéria orgânica para produzir H_2 . Com intuito de aumentar o aproveitamento energético do glicerol, o efluente do UASB produtor de hidrogênio (rico em ácidos e álcoois) foi utilizado como alimento para um outro reator UASB produzir CH_4 . Diante dos baixos rendimentos de H_2 encontrados e da presença quase contínua de ácido caproico (C6) entre os principais metabólitos solúveis, decidiu-se por realizar ensaios com a finalidade de avaliar a produção de C6 a partir de glicerol, já que este ácido possui um alto valor agregado. Para isso, variou-se o inóculo e a concentração de etanol, com e sem bioaugmentação. O esquema ilustrado na Figura 1.1 sintetiza as referidas etapas da pesquisa.

Figura 1.1 – Esquema mostrando as etapas da presente pesquisa.



2 PRODUÇÃO FERMENTATIVA DE HIDROGÊNIO A PARTIR DE GLICEROL RESIDUAL: UMA REVISÃO

2.1 Introdução

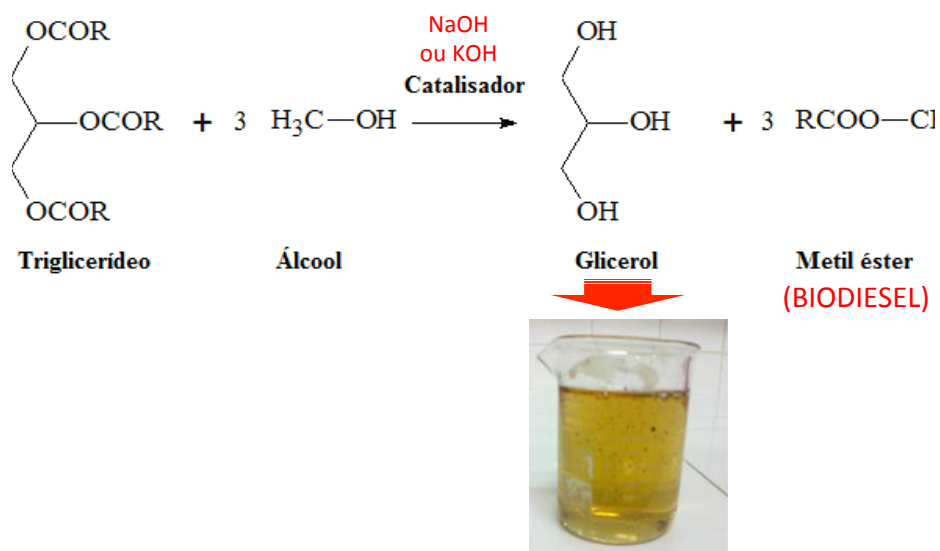
O gás hidrogênio (H_2), uma fonte de energia obtida a partir de resíduos orgânicos (KOTAY; DAS, 2008), pode ser utilizado como um combustível para turbinas, motores de combustão interna, síntese e processos industriais e em células de combustível para geração de energia (ITO et al., 2005). Sua produção pode ser realizada utilizando processos biológicos (DINAMARCA; BAKKE, 2011) e físico-químicos (KOTHARI; BUDDHI; SAWHNEY, 2008). A desvantagem desses últimos é o balanço energético negativo, já que é necessário usar grandes quantidades de energia para gerar altas pressões e temperaturas necessárias para gerar H_2 (KOTHARI; BUDDHI; SAWHNEY, 2008).

Pelo método biológico, o H_2 pode ser gerado a partir de algas através de biofotólise da água ou a partir de digestão anaeróbia utilizando bactérias, processo denominado fermentação escura (HALLENBECK; BENEMANN, 2002). Na digestão anaeróbia completa, a matéria orgânica é degradada em quatro etapas básicas: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese. O H_2 é produzido na segunda e terceira etapas. Entretanto, o H_2 também pode ser consumido na terceira etapa, onde bactérias homoacetogênicas o usam para produzir acetato, e/ou na quarta etapa, na qual *archaeas* metanogênicas usam H_2 e CO_2 para formar metano (MCCARTY, 1964a). Logo, se o objetivo é produzir H_2 , a acetogênese e a metanogênese devem ser inibidas.

O glicerol é um subproduto da fabricação de biodiesel, derivado do processo de transesterificação de óleos vegetais ou gordura animal (LO et al., 2013). A Figura 2.1 mostra a reação química de produção de biodiesel e consequente geração de glicerol, bem como a imagem do glicerol residual. De acordo com Yazdani e Gonzalez (2008), uma grande quantidade de glicerol é gerada durante a reação de transesterificação (1 kg de glicerol por 10 kg de biodiesel produzido). Com isso, estima-se que a produção mundial de glicerol residual foi aproximadamente 3.200.000 toneladas em 2015, com uma projeção para 3.700.000 toneladas em 2024 (OECD/FAO, 2015). Esse glicerol residual está atualmente sendo vendido para as indústrias alimentícias, farmacêuticas e de cosméticos mas o aumento da demanda e o consequente excesso desse subproduto aos poucos fará dele um passivo ambiental (VIANA et al., 2012a). Portanto, para ter valor agregado, esse resíduo poderá ser

utilizado como substrato para ser convertido em H_2 . O objetivo desse capítulo é apresentar uma revisão da produção de H_2 a partir de glicerol residual por fermentação anaeróbia.

Figura 2.1 – Reação química de produção de biodiesel e consequente geração de glicerol, bem como a imagem do glicerol residual.



2.2 Bioquímica da digestão anaeróbia de glicerol

A digestão anaeróbia de glicerol pode ocorrer via rota metabólica reductiva ou oxidativa. A rota metabólica do glicerol, ilustrada na Figura 2.2, mostra que o H_2 é produzido somente pela rota oxidativa onde o glicerol é convertido a dihidroxiacetona pela glicerol desidrogenase (GDH) e então é fosforilada pela dihidroxiacetona kinase. Na etapa seguinte, a dihidroxiacetona é convertida a piruvato pela enzima piruvato-ferredoxina oxireductase (apenas por anaeróbios estritos) e a acetil-CoA ou formiato pela enzima hidrogenase (KUBIAK et al., 2012). O formiato pode ser convertido a H_2 e CO_2 por certas espécies de bactérias entéricas, tais como *Escherichia coli* e *Enterobacter aerogenes*. A produção de H_2 é atribuída a ação da formiato- H_2 liase, cuja atividade ocorre por meio de grupos ionizáveis em seu sítio ativo que promovem a capacidade de se ligar ao substrato, catalisando a reação (FABIANO; PEREGO, 2002). Depois da formação de acetil-CoA, enzimas agem na produção dos metabólitos finais, que dependem da espécie do micro-organismo e das condições ambientais. Em um balanço geral, a produção de H_2 a partir do piruvato é relativamente baixa porque parte da energia gerada a partir da fermentação é usada para crescimento celular. Cada molécula de piruvato rende somente uma ou duas moléculas de H_2 . Entretanto, parte do piruvato é usada para gerar ATP e é, então, excretada como um produto final, sendo os

principais o acetato, o butirato e o etanol (HALLENBECK; BENEMANN, 2002; MATHEWS; WANG, 2009). Se a fermentação anaeróbia continua, o metano é formado a partir de acetato por metanogênicas acetoclásticas e a partir de H_2/CO_2 pelas metanogênicas hidrogenotróficas. O H_2/CO_2 também podem ser consumidos por bactérias homoacetogênicas para formar acetato. Se o objetivo é produzir H_2 , as rotas metabólicas de consumo deste gás devem ser eliminadas, como mostrado na Figura 2.3.

Figura 2.2 – Rotas metabólicas de fermentação de glicerol até compostos mais simples (adaptado de Silva *et al.*, 2009 e Biebl *et al.*, 1999).

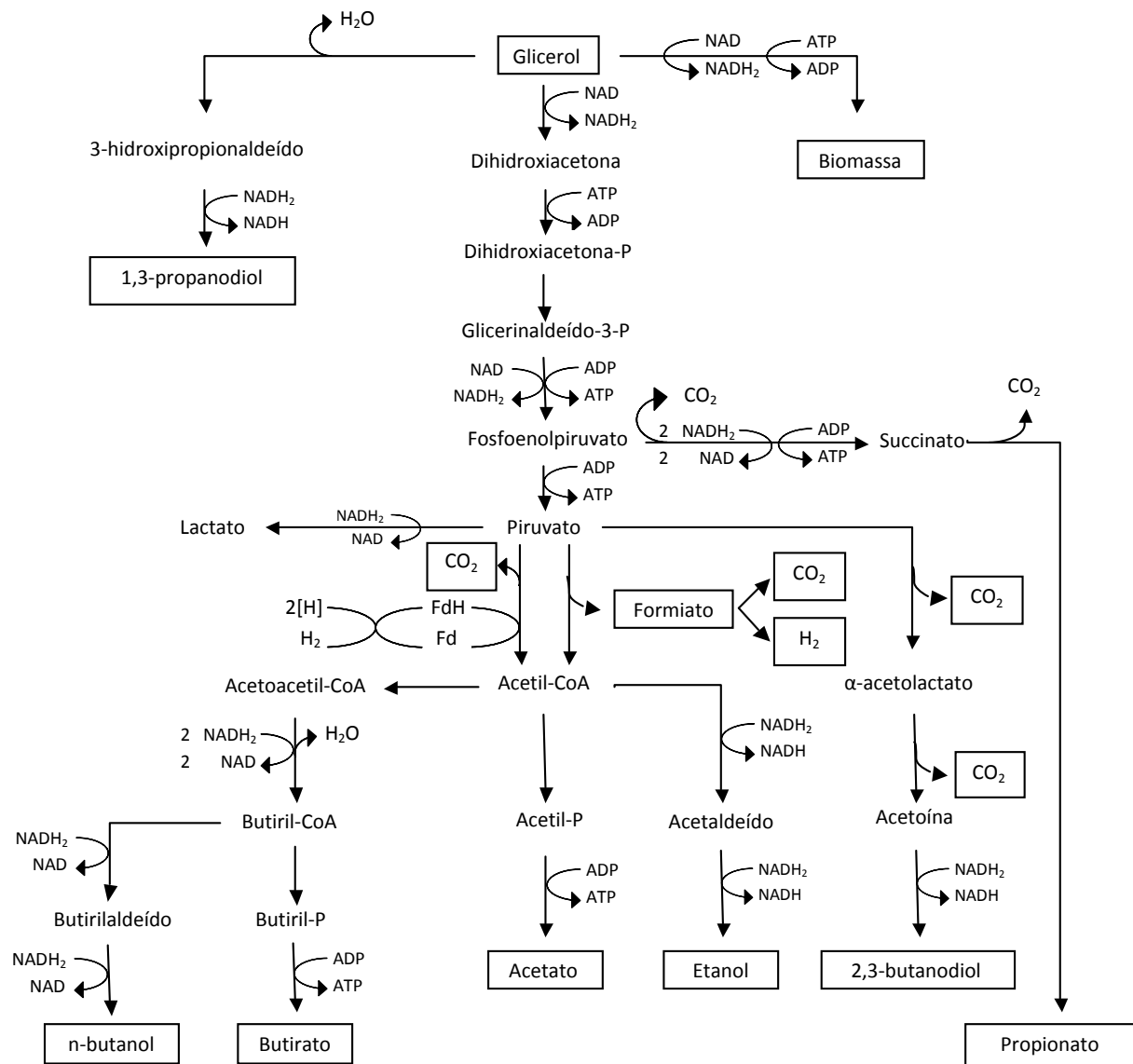
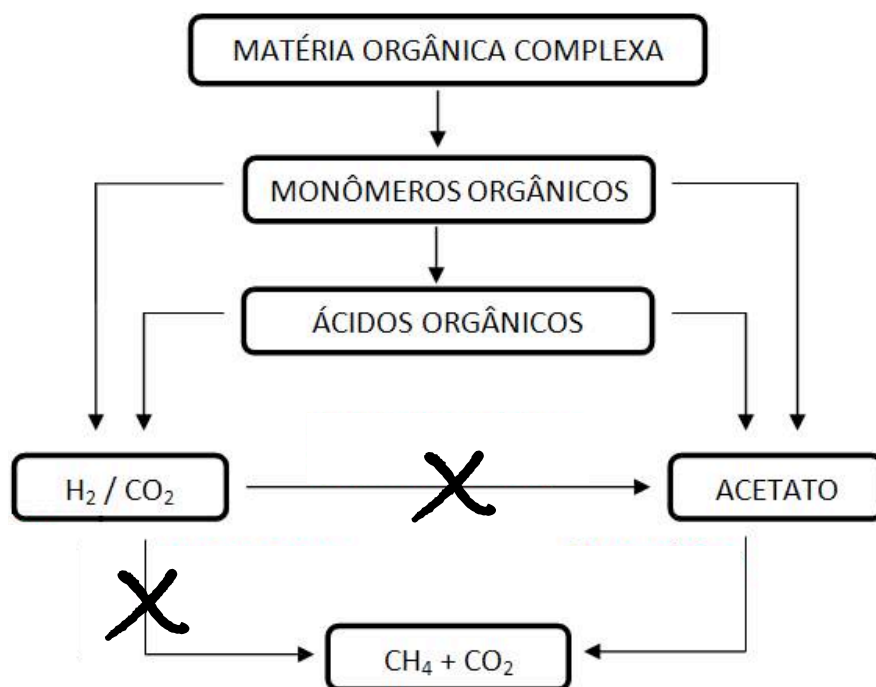


Figura 2.3 – Rotas metabólicas de fermentação de glicerol até compostos mais simples



Na rota redutiva, o glicerol é primeiramente desidratado a 3-hidroxi-propanal por ação da GDH e então a 1,3-propanodiol (1,3-PPD) pela 1,3-propanodiol oxireductase. Um aumento na concentração de glicerol tende a aumentar a concentração de 1,3-PPD e, por conseguinte, diminuir a produção de H_2 . Isso porque o estado reduzido de carbono no glicerol é menor do que na biomassa, gerando uma maior quantidade de NADH para formação de biomassa quando o glicerol está em maiores concentrações. Esse NADH, por sua vez, é usado na conversão de glicerol a 1,3-PPD (YAZDANI; GONZALEZ, 2007).

Bioquimicamente, é possível produzir 1 mol de H_2 para cada mol de glicerol (ZENG, 1996), apesar de existirem relatos de pesquisas que alcançaram rendimentos superiores (FERNANDES et al., 2010; NGO; KIM; SIM, 2011). Embora o glicerol possa ser facilmente metabolizado via piruvato para formar H_2 e CO_2 (YAZDANI; GONZALEZ, 2008), as impurezas presentes no glicerol residual, tais como NaCl (59 g/L), podem dificultar a digestão anaeróbia (VIANA et al., 2012a). Além disso, o acúmulo de alguns metabólitos podem também reduzir o rendimento de H_2 (MANGAYIL; KARP; SANTALA, 2012).

Na fermentação anaeróbia para produção de H_2 , a hidrogenase catalisa o transportador de elétrons a H^+ , gerando H_2 (CHEN et al., 2006a, 2006b). Essas enzimas são classificadas em três tipos: [FeFe] hidrogenases, [FeNi] hidrogenases, [Fe] hidrogenases (MATHEWS; WANG, 2009). A nitrogenase é responsável pela redução de N_2 a NH_3 . Na ausência de N_2 , a nitrogenase presente na *Klebsiella pneumoniae*, uma bactéria facultativa fixadora de N_2 , pode

reduzir H^+ a H_2 na ausência de N_2 . Como essa enzima reduz preferencialmente N_2 , a presença de NH_4^+ ou N_2 inibe a produção de H_2 . Outras hidrogenases são também capazes de catalisar o H_2 , mas, por causa de suas baixas atividades e maiores exigências por ATP, elas não são consideradas eficientes para produzir H_2 (HALLENBECK; BENEMANN, 2002). A produção de uma molécula de H_2 requer 1 mol de $NADH_2$ e no mínimo quatro mols de ATP. Em contrapartida, a bactéria *Clostridium butyricum* requer somente $NADH_2$, que facilita a produção de H_2 (CHEN et al., 2006a, 2006b).

2.3 Fatores que afetam a produção de H_2 a partir de glicerol

2.3.1 Tipo de reator

A configuração do reator é crucial para o desenvolvimento do consórcio microbiano, já que ele influencia diretamente no microbioma, no comportamento hidrodinâmico e na superfície de contato entre o micro-organismo e o substrato (VENKATA MOHAN, 2009). A Tabela 2.1 mostra que os reatores em frascos operados em batelada são os mais frequentemente utilizados para avaliar a produção de H_2 a partir de glicerol, justamente porque esse tipo de reator é de simples operação e pode produzir resultados rápidos, alcançando um rendimento de até 1,62 mol H_2 /mol glicerol (FERNANDES et al., 2010). Entretanto, em experimentos conduzidos em frascos, o controle do pH (fator crucial durante a produção de H_2) pode ser dificultado. É recomendado realizar testes de pH inicial (KHANAL et al., 2004), tipo e concentração de tampão (DAVILA-VAZQUEZ et al., 2011), concentração inicial de matéria orgânica e de lodo (CHEN et al., 2006a, 2006b) para determinar as condições ótimas. Uma outra questão relacionada com esse tipo de reator é o acúmulo de H_2 no *headspace*, que pode inibir a produção de H_2 pelo aumento da pressão parcial de H_2 (HALLENBECK, 2009) e/ou promover seu consumo por bactérias homoacetogênicas e *archaeas* metanogênicas hidrogenotróficas (DINAMARCA; BAKKE, 2011). Purga com gás inerte é a principal alternativa para sanar esse tipo de problema (NATH; DAS, 2004).

Tabela 2.1 – Condições operacionais e rendimento máximo de H₂ obtido por diversos autores que utilizaram glicerol como substrato para produção de H₂.

Ref.	Reator	Inóculo	Temp ^a	pH _{inicial}	[DQO] ^b	S ₀ /X ₀ ^c ou COV ^d	Y _{H2} ^e
1	Frascos	Lodo de reator de leito fixo produtor de H ₂ a partir de sacarose	25	5,5	0,3	-	1,62
2	Frascos	<i>Thermotoga neapolitana</i>	75	6,8	5,0	-	1,42
3	Frascos	<i>Enterobacter aerogenes</i>	37	6,8	0,72 ^f	-	1,12
4	Frascos	<i>Clostridium pasteurianum</i>	35	7,5	10,0	-	1,11
5	Frascos	Lodos ativados	40	6,5	1,0	-	1,10
6	Frascos	Lodos ativados	38	8,0	15,0	-	0,95
7	Frascos	Lodos ativados	38	8,0	15,0	1,3	0,90
5	CSTR*	<i>Clostridium pasteurianum</i>	35	7,5	10,0	-	0,77
8	Reator anaeróbico de leito fixo e fluxo ascendente*	Lodo anaeróbico tratando esgoto doméstico pré-tratado termicamente	35	6,0	25,0	29,7	0,42
9	Frascos	Cultura mista extraída de solo de plantio de trigo	30	7,0	3,0	-	0,31
10	Frascos	Lodo anaeróbico de cervejaria pré-tratado termicamente	35	5,5	22,2	5,2	0,30
11	Frascos	Cultura mista de sedimentos de fonte termal	55	5,5	20,3	5,4	0,30
12	Frascos	<i>Klebsiella pneumonia</i>	40	8,0	20,0	-	0,25
13	Frascos	Lodo anaeróbico tratando esgoto doméstico pré-tratado termicamente	35	6,5	8,3	11,3	0,07

¹ Fernandes et al. (2010); ² Ngo, Kim e Sim (2011); ³ Ito et al. (2005); ⁴ Lo et al. (2013); ⁵ Mangayil, Karp e Santala (2012); ⁶ Varrone et al. (2012); ⁷ Varrone et al. (2013); ⁸ Dounavis; Ntaikou e Lyberatos (2015); ⁹ Selembo et al. (2009); ¹⁰ Sittijunda e Reungsang (2012a); ¹¹ Sittijunda e Reungsang (2012b); ¹² Chookaew, O-Thong e Prasertsan (2012); ¹³ Vlassis et al. (2012); ^a temperatura, em °C; ^b DQO inicial, em gDQO/L; ^c relação inicial substrato/micro-organismo, em gDQO/gSTV, apenas para testes em batelada; ^d carga orgânica volumétrica, em kgDQO/m³.d, apenas para testes em fluxo contínuo; ^e rendimento, em mol H₂/mol glicerol adicionado; ^f concentração de matéria orgânica, em termos de carbono orgânico total (COT). * reatores operados em fluxo contínuo.

2.3.2 Inóculo e pré-tratamentos

Micro-organismos do domínio Bacteria são predominantes durante a fermentação anaeróbia para produção de H₂. Essas bactérias podem ser encontradas em diferentes fontes, tais como sistemas de tratamento de efluentes domésticos e industriais (MANGAYIL; KARP; SANTALA, 2012; SITTIJUNDA; REUNGSANG, 2012a; VARRONE et al., 2013; VLASSIS et al., 2012); sedimentos de fontes termais (SITTIJUNDA; REUNGSANG, 2012b); e líquido ruminal (RATTI et al., 2013). Entretanto, é necessário se aplicar pré-tratamento nessas culturas mistas antes da inoculação com a finalidade de eliminar ou inibir os micro-organismos consumidores de H₂, especialmente as *archaeas* metanogênicas hidrogenotróficas (ROSSI et al., 2011; SELEMO et al., 2009).

Vários tipos de pré-tratamento do lodo são propostos para eliminar ou diminuir a atividade metanogênica, tais como choque térmico (WANG; WAN, 2008), adição de ácidos ou bases, congelamento seguido de descongelamento (ROSSI et al., 2011), aeração e adição de clorofórmio (NING et al., 2012) ou ácido 2-bromoetano sulfônico (BESA) (KOSKINEN; KAKSONEN; PUHAKKA, 2007). A eficiência dos pré-tratamentos variam de acordo com a diversidade das *archaeas* metanogênicas no inóculo.

Além de inibir a atividade metanogênica, o pré-tratamento induz a formação de esporos, um fenômeno típico de algumas bactérias produtoras de H₂, a exemplo das pertencentes ao gênero *Clostridium* (LEE; SONG; HWANG, 2009; ROSSI et al., 2011). Quando um meio contendo uma cultura mista de micro-organismos anaeróbios é exposto a condições adversas, somente as bactérias formadoras de esporos, que são as produtoras de hidrogênio, sobrevivem (ROSSI et al., 2011). Os esporos germinam quando as condições tornam-se favoráveis (ROSSI et al., 2011). Lodo de estação de tratamento de esgoto doméstico parece ser um inóculo adequado após pré-tratamento devido à alta concentração de *Clostridium* formadores de esporos (HU; CHEN, 2007).

Testes conduzidos por Rossi et al. (2011), utilizando lodo de um reator de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB) alimentado com efluente da indústria de soja, mostraram que o choque térmico aumenta o rendimento de hidrogênio a partir de glicerol. No entanto, a eficiência do pré-tratamento ácido é controversa devido à alta variabilidade dos resultados de diferentes investigações terem demonstrado que esse pré-tratamento pode variar desde uma completa ausência de produção de hidrogênio, devido à morte das bactérias produtoras de hidrogênio (ROSSI et al., 2011), a um grande aumento no rendimento de hidrogênio (CHEONG; HANSEN, 2006).

O uso de um consórcio de micro-organismos elimina a necessidade de isolamento e purificação de uma cepa específica, minimiza os custos e facilita a aplicação desses micro-organismos em reatores em escala real (VENKATA MOHAN, 2009). Apesar da vantagem de utilizar uma cultura mista, vários pesquisadores têm investigado o uso de culturas puras para produzir hidrogênio a partir de glicerol residual (CHOOKAEW; O-THONG; PRASERTSAN, 2012; ITO et al., 2005; LO et al., 2013; NGO; KIM; SIM, 2011). Ngo, Kim e Sim (2011) mostraram que é possível obter 1,42 mol H₂/mol glicerol utilizando *Thermotoga neapolitana* a 75 °C. No entanto, o rendimento de hidrogênio varia entre 0,25 e cerca de 1,12 mol H₂/mol glicerol, usando *K. pneumoniae* (CHOOKAEW; O-THONG; PRASERTSAN, 2012) e *E. aerogenes* (ITO et al., 2005), respectivamente. Elevados rendimentos (0,93 mol H₂/mol glicerol) também foram obtidos utilizando *C. pasteurianum* (LO et al., 2013).

Os resultados observados por Ngo, Kim e Sim (2011) diferem significativamente daqueles vistos por Eriksen et al (2011), que utilizaram glicerol residual como substrato em três cepas de *Thermotoga* e não observaram produção de hidrogênio. Ngo, Kim e Sim (2011) utilizaram controle do pH, tampão de ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanossulfônico (HEPES), expurga com N₂ e pré-tratamento do glicerol para remoção de etanol e metanol por evaporação rotativa. As diferenças são, provavelmente, devido às diferentes metodologias utilizadas e à [FeFe] hidrogenase específica na *Thermotoga* que oxida ferredoxina reduzida e NADH simultaneamente (SCHUT; ADAMS, 2009). Na fermentação de glicerol, a proporção estequiométrica NADH:ferredoxina reduzida para produzir H₂ é de 1:1. Ngo, Kim e Sim (2011) possivelmente obtiveram esse resultado através da redução de ácido acético em etanol como uma rota potencial para a reoxidação de NADH excessivo (ERIKSEN et al., 2011). A produção de ácido acético sob essas condições foi alta (22 mmol/L) nos resultados de Ngo, Kim e Sim (2011). Assim, é possível que tenha havido uma redução de ácido acético em etanol. Esses dados, no entanto, não foram mencionados por esses autores.

2.3.3 Razão inicial substrato: micro-organismo (S_0/X_0)

Em geral, para cultivos em batelada, a concentração inicial de substrato (S_0) representa uma fonte de carbono e energia para as necessidades da biossíntese e outros fins energéticos, enquanto que a concentração inicial de biomassa (X_0) é uma fonte de consumo do substrato (LIU, 1996). De acordo com Liu (1996), a relação inicial S_0/X_0 (g demanda química de oxigênio [DQO]/g sólidos totais voláteis [STV]) pode ser escolhida alterando S_0 em uma X_0 constante ou variando X_0 em uma S_0 constante. Para culturas puras, o cálculo da relação de

S_0/X_0 é bastante complicado, já que a concentração de inoculação é usualmente expressa em densidade óptica (NGO; KIM; SIM, 2011), e utiliza a metodologia de curvas de calibração específicos para calcular a concentração de micro-organismos.

O valor crítico dessa relação deve ser conhecida de modo a evitar a diminuição da produção de hidrogênio, porque, de acordo com o modelo cinético de Monod, em elevadas concentrações do matéria orgânica inicial, a taxa de crescimento específico torna-se independente da concentração do substrato (crescimento de ordem zero), diminuindo a produção de H_2 (ANDREWS, 1968; BEKINS, B; WARREN; GODSY, 1998).

Alguns pesquisadores avaliaram a influência da relação S_0/X_0 no rendimento de H_2 . Chen et al. (2006) variaram a relação S_0/X_0 inicial de 0 a 30 gDQO/gSTV e encontraram o maior rendimento de H_2 (4,0 mol H_2 / mol sacarose) em relação S_0/X_0 inicial de 7,3 gDQO/gSTV. Hafez et al. (2010) alcançaram um rendimento máximo de 2,8 mol H_2 / mol glicose aplicando uma relação S_0/X_0 entre 4,4 a 6,4 gDQO/gSTV. Acima desse intervalo, o rendimento diminuiu para 1,2 mol H_2 / mol glicose. Liu (1996) explica que o valor dessa relação reflete o nível de energia inicial de cultivo e pode causar uma séria dissociação entre o anabolismo e o catabolismo, levando um desperdício de energia em valores de relação S_0/X_0 mais elevados do que o valor crítico. Outros autores relatam que os efeitos do excesso de matéria orgânica provoca reesporulação das bactérias produtoras de hidrogênio e diminui o rendimento de H_2 (HAFEZ et al., 2010).

Ao analisar os rendimentos de H_2 obtidos a partir de glicerol residual, pode concluir-se que um elevado S_0/X_0 inicial tende a reduzir o rendimento de H_2 . Vlassis et al. (2012), Sittijunda e Reungsang (2012a), Sittijunda e Reungsang (2012b) e Fernandes et al. (2010) utilizaram valores de relação S_0/X_0 iguais a 11,3, 5,2, 5,4, e 1,0 gDQO/gSTV, respectivamente, e alcançaram rendimentos de 0,07, 0,30, 0,30 e 1,62 mol H_2 /mol glicerol, respectivamente. O menor rendimento, encontrado por Vlassis et al. (2012), pode ser explicado pela alta taxa de conversão de glicerol em 1,3-propanodiol, o que tipicamente pode ser observado em ambientes com relação S_0/X_0 elevada (SEIFERT et al., 2009).

A fim de evitar a inibição por excesso de substrato, é recomendável realizar testes para conhecer os valores críticos dessa relação antes de inocular um reator, porque para cada inoculo existe uma concentração inicial ótima de substrato.

2.3.4 Temperatura

O hidrogênio pode ser produzido sob condições mesofílicas ou termofílicas (SITTIJUNDA; REUNGSANG, 2012a, 2012b). Condições extremas, como a 75 e 90 °C também foram investigadas (CHOU et al., 2008; NGO; KIM; SIM, 2011). Entretanto, nenhuma pesquisa sobre a produção de H₂ em condições psicrófilicas foi encontrada a partir de glicerol residual, possivelmente devido a síntese de H₂ ser termodinamicamente desfavorável abaixo de 20 °C, uma vez que a sua faixa ótima de atividade situa-se entre 50 e 70 °C (KOESNANDAR et al., 1991).

O aumento da temperatura aumenta, até um certo limite, a taxa de hidrólise da matéria orgânica complexa (LIN; WU; HUNG, 2008) e, correspondentemente, a atividade celular de bactérias produtoras de H₂ também aumenta (LEE et al., 2008). Temperaturas elevadas favorecem as reações bioquímicas para a produção de H₂, mas não as reações de consumo de H₂ (CHONG et al., 2009). Algumas bactérias, como *Bacillus coagulans* e *Clostridium acetobutylicum*, têm atividades mais elevadas em condições mesofílicas, alcançando 2,28 e 1,26 mol H₂/mol glicose, respectivamente KOTAY; DAS, 2008; ZHANG; BRUNS; LOGAN, 2006). Bactérias termofílicas também têm alta atividade hidrogenogênica, sendo os gêneros mais comuns *Thermoanaerobacterium*, *Thermotoga*, *Thermoanaerobacter* e *Caldoanaerobacter* (CHONG et al., 2009).

Em estudos em que o glicerol residual foi utilizado como o substrato, uma ampla faixa de temperaturas foi testada (entre 25 e 75 °C), como mostrado na Tabela 2.1. No entanto, não houve evidência de uma correlação direta entre a temperatura e o rendimento de H₂, mostrando alta variabilidade entre os resultados. Isso pode ser comprovado ao se analisar os dois maiores rendimentos alcançados, que aconteceram sob 25 e 75 °C (1,62 e 1,42 mol H₂/mol glicerol ou 1,48 e 1,11 mol H₂/mol glicerol sob condições normais de temperatura e pressão, respectivamente).

2.3.5 pH

Qualquer processo de produção biológica de H₂ é dependente das hidrogenases que são diretamente afetadas pela temperatura e pH; por exemplo, a atividade das enzimas [FeFe] hidrogenase e [NiFe] hidrogenase, essencial para o crescimento de bactérias produtoras de H₂, diminui drasticamente com a diminuição do pH do meio para 4,5 (KHANAL et al., 2004). A atividade catalítica das enzimas e proteínas da membrana pode ser regulada por alterações no pH extracelular (KODUKULA; PRAKASAM; ANTONISEN, 1988). O H⁺ extracelular afeta

a rota metabólica levando à produção de H_2 de três maneiras: (1) através da alteração da atividade dos sítios catalíticos (FABIANO; PEREGO, 2002); (2) pela alteração da hidrólise do substrato (LIU; CHENG, 2010; ZHANG et al., 2007); (3) alterando o fluxo de nutrientes através da força motriz de prótons (GOODWIN; ZEIKUS, 1987).

As hidrogenases diferem nas suas localizações, podendo estar localizadas desde o limite da membrana às enzimas periplasmáticas (DAS et al., 2006). Com base na sua estrutura e na localização na célula, elas podem ser classificadas em grupos e, entre elas, a hidrogenase [FeFe] são as enzimas periplasmáticas de bactérias anaeróbias estritas (DAS et al., 2006). Essa enzima é afetada diretamente pelo fluxo passivo de prótons através da membrana. Por conseguinte, a atividade das hidrogenases pode ser regulada pela concentração de prótons através dos potenciais de redução dos aminoácidos dos sítios ativos, que são dependentes do pH (CAMMACK et al., 1987). Nesses casos, a enzima permanece estruturalmente intacta, mas funcionalmente alterada. Além disso, bombas de prótons ligadas à membrana, presentes na maioria das bactérias, expulsam prótons do citoplasma, gerando um gradiente eletroquímico de prótons, como a força motriz de prótons, permitindo translocação do soluto (MITCHELL, 1973). Assim, a hidrólise do substrato (fontes de carbono) e o movimento de nutrientes, que ocorre por um gradiente de pH através da membrana, pode ser alterada por uma alteração no pH (KODUKULA; PRAKASAM; ANTONISEN, 1988). A concentração de íons H^+ no ambiente extracelular controla a direção das rotas metabólicas e o estado de ionização dos grupos funcionais enzimáticos envolvidos na catálise, afetando, assim, a taxa de reação da produção de H_2 (FABIANO; PEREGO, 2002).

Diversos estudos mostram que o pH ótimo para a produção de H_2 é entre 4,5 e 5,7 (considerando o gênero *Clostridium* como o principal produtor de H_2), porque a síntese ou a ativação da hidrogenase é afetada negativamente fora dessa faixa (Gottwald e Gottschalk 1985). Além disso, sob condições ácidas, as *archaeas* metanogênicas têm a sua atividade metabólica inibida (ROSSI et al., 2011). Embora o pH do glicerol residual esteja tipicamente dentro desta faixa (VIANA et al., 2012b), é necessário controlar continuamente o pH, porque, dependendo da concentração do substrato, a produção de ácidos pelas bactérias acidogênicas faz com que o pH caia para uma faixa inadequada para a produção de H_2 . No entanto, a produção de H_2 pode ocorrer de forma eficiente fora desta faixa; por exemplo, entre pH 6,5 e 7,5 (MANGAYIL; KARP; SANTALA, 2012; NGO; KIM; SIM, 2011).

2.3.6 Tampão

Sais de carbonato (CO_3^{2-}) e de fosfato (PO_4^{3-}) são mais comumente usados como tampões para manter o pH dentro de um intervalo adequado para a produção de H_2 (DAVILA-VAZQUEZ et al., 2011; ITO et al., 2005). No entanto, quando o intervalo de pH está entre 5,5 e 6,5, o bicarbonato se dissocia, diminuindo a sua capacidade de tamponamento (DAVILA-VAZQUEZ et al., 2011) e reduzindo a fração de H_2 no biogás (LIN; LAY, 2004). A adição de carbonato, na forma de NH_4HCO_3 , leva a um aumento da concentração de NH_4^+ , que pode ser tóxico para as bactérias produtoras de H_2 se essa concentração for superior a 4-6 g N- NH_3 /L (KOSTER; LETTINGA, 1988). Quando sais de fosfato foram usados como tampão nas concentrações diferentes do valor ótimo (600 mg PO_4^{3-} /L), houve uma diminuição na produção de H_2 a partir de sacarose a 20 g COD/L (LIN; LAY, 2004). Entretanto, se adicionado em concentração adequada, o NH_4^+ proveniente do bicarbonato de amônio pode servir como fonte de nitrogênio aos micro-organismos.

Além dos compostos anteriormente mencionados, outros tampões podem ser utilizados de forma eficaz na produção de H_2 a partir de glicerol residual, tais como o ácido 2-(N-morfolino)etanossulfônico monohidratado (MES) (SELEMBO et al., 2009) e ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2-etanossulfônico (HEPES) (NGO; KIM; SIM, 2011). No entanto, este último foi testado apenas com *Thermotoga neapolitana* como inóculo.

2.3.7 Diversidade microbiana em reatores anaeróbios produtores de hidrogênio

Em reatores anaeróbios, mudanças nas variáveis operacionais (tipo e concentração de substrato, carga orgânica volumétrica [COV], tempo de detenção hidráulica [HRT], pH e temperatura) podem afetar a diversidade microbiana e a dominância entre as espécies. Mariakakis et al. (2011) observaram que um aumento na COV de 11 para 34 kg DQO/m³.d promoveu mudanças na comunidade microbiana do reator. Isso foi evidente a partir dos resultados de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE). Essas mudanças foram, provavelmente, devido ao acúmulo de metabólitos produzidos pelas bactérias acidogênicas. A maior produção de H_2 foi alcançada em 22 kg DQO/m³.d, com *Clostridium* sendo a espécie predominante.

Temudo et al. (2008) realizaram análises de DGGE para investigar a produção de H_2 utilizando três substratos (glicose, glicerol e xilose) e verificaram que a presença de glicerol residual resultou num aumento da diversidade microbiana, com predominância de *Clostridium intestinale* e *Klebsiella oxytoca*. Sittijunda e Reungsang (2012b) também

realizaram uma análise de DGGE para investigar reatores anaeróbios alimentados com glicerol e observaram que, a concentrações mais baixas do substrato (até 15 g de glicerol/L), espécies pertencentes aos gêneros *Thermoanaerobacterium* e *Alicyclobacillus* foram dominantes, com um rendimento de H₂ de 0,3 mol H₂/mol glicerol residual. Quando os reatores foram operados com concentrações mais elevadas de glicerol (19-28 g/L), houve predominância de outros gêneros, tais como *Bacillus*, *Geobacillus*, *Eubacteriaceae* e *Alicyclobacillus*. *Lactobacillus hilgardii* foi observado durante todo o período de operação, indicando a sua resistência às variações de carga orgânica.

A diminuição gradual do TDH diminuiu a diversidade microbiana através da perda de biomassa (O-THONG; MAMIMIN; PRASERTSAN, 2011). Demirel e Yenigün (2006) descobriram que velocidade ascendente elevada em um reator anaeróbio, causada pela redução do TDH (de 20 para 12 h), impediu a sedimentação de micro-organismos filamentosos, tais como *archaea Methanosaeta*, que são dominantes em reatores anaeróbios (HULSHOFF POL et al., 2004). Se o TDH aplicado ao reator é menor do que o tempo médio necessário para o crescimento da biomassa, as bactérias produtoras de H₂ serão influenciadas negativamente pela diminuição do TDH, diminuindo também a produção de H₂ (O-THONG; MAMIMIN; PRASERTSAN, 2011).

O pH afeta diretamente a diversidade microbiana. Xing et al. (2005) avaliaram o efeito do pH sobre a dinâmica microbiana dentro de um CSTR hidrogenogênico. No 14º dia, a diversidade microbiana atingiu o nível mais alto, 11 bandas na DGGE, e diminuiu gradualmente após o 21º dia, chegando a 8 bandas no final da operação. Essa diminuição ocorreu provavelmente devido ao aumento da COV de 12 para 17 kg DQO/m³.d, aumentando a população acidogênica, principalmente bactérias dos gêneros *Clostridium*, *Acidovorax* e *Kluyvera*. Populações que são mais adaptadas ao pH imposto prevalecem sobre as outras espécies com predominância dos organismos mais adaptados, de modo que essas mudanças podem ser explicadas pela competição entre as populações. Após o aumento da COV, o pH mudou e, conseqüentemente, promoveu a sucessão ecológica, seguido por um estado de clímax com a dominância dos organismos mais adaptados a esse novo ambiente. Isso aconteceu provavelmente porque a mudança do pH altera a hidrólise e a disponibilidade de nutrientes (ANGELIDAKI; ELLEGAARD; AHRING, 1993; ZHANG et al., 2005), mudando também os nichos ecológicos. Durante o período de maior produção de H₂, o pH esteve entre 4,0 e 4,5, e *Ethanologenbacterium* sp. foi predominante no reator. *Clostridium* e *Ethanologenbacterium* sp. são bactérias produtoras de H₂. Além disso, um pH ácido suprime a atividade de *archaeas* metanogênicas, como já fora mencionado, reduzindo assim a

população metanogênica hidrogenotrófica no meio e aumentando o rendimento de H₂ (ROSSI et al., 2011).

A temperatura afeta a diversidade microbiana e produção de H₂ devido a alterações na comunidade, uma vez que a predominância das bactérias produtoras de H₂ podem variar em diferentes faixas de temperatura. Lin, Wu e Hung (2008) utilizaram lodo anaeróbio de estação de tratamento de esgoto (dominado por *Clostridium* sp) para avaliar as mudanças na comunidade bacteriana causadas por aumentos na temperatura de 30 a 55 °C. Os mesmos autores observaram que a produção de H₂ foi dependente da temperatura. *K. pneumoniae* e *C. intestinale* dominaram a 35 °C. A 40 °C, os micro-organismos predominantes foram *C. sulfatireducens*, *Bacillus* sp. e bactérias produtoras de butirato. Quando o reator foi operado em condições termofílicas (50-55 °C), houve outra mudança na comunidade, com indícios de surgimento de espécies termofílicas pertencentes ao gênero *Clostridium*. A 30 °C, o rendimento de H₂ foi de apenas 0,4 mol H₂/mol xilose e atingiu um valor máximo de 1,4 mol H₂/mol xilose a 50 °C, quando o reator atingiu condições de estado estacionário. As diferenças nos rendimentos de H₂ entre as temperaturas podem estar relacionadas às mudanças na comunidade microbiana já que *Clostridium*, um gênero eficiente em converter matéria orgânica em H₂, foi predominante. Comunidades bacterianas em condições extremas ambientais, como temperaturas altas, geralmente apresentam baixa diversidade (STROM, 1985). Essa influência da temperatura sobre a diversidade está diretamente relacionada com a especificidade das enzimas presentes em diferentes tipos de bactérias, cada uma funcionando melhor dentro de uma determinada faixa de temperatura, uma vez que as enzimas têm atuação ótima em um intervalo de temperatura específico. Finalmente, o aumento da temperatura pode aumentar os rendimentos de H₂, uma vez que a taxa de hidrólise é aumentada (DINAMARCA; BAKKE, 2011), sobretudo para substratos complexos (VEEKEN; HAMELERS, 1999).

A diversidade microbiana também está relacionada com o tipo de pré-tratamento aplicado ao inóculo (NING et al., 2012; PENDYALA et al., 2012). Choque térmico e manutenção de pHs extremos são pré-tratamentos realizados para eliminar micro-organismos que não formam esporo (ROSSI et al., 2011), enquanto pré-tratamentos químicos usando clorofórmio visam suprimir a atividade metanogênica inibindo a coenzima M redutase (OREMLAND; CAPONE, 1988), presente nas *archaeas* metanogênicas. Ning et al. (2012) avaliaram o efeito do clorofórmio na produção de H₂ a partir de glicose usando lodo proveniente de reator tratando efluente de indústria produtora de citrato como inóculo. Os autores testaram diferentes concentrações de clorofórmio (0,025-0,200%, v/v) e observaram

que concentrações acima de 0,125% inibiram tanto *archaeas* metanogênicas como bactérias produtoras de H₂. O rendimento máximo de H₂ (2,02 mol H₂/mol glicose) foi alcançado ao adicionar clorofórmio a 0,05%, com a predominância de *Olsenella* não-cultivada, um clone de bactéria não-cultivada nbt176c01, *Janthinobacterium* sp.7, cepa de *Megasphaera paucivorans* cepa VTTE 03234, *C. cellulosi* cepa D3 e *Clostridium* sp. HPB-4.

Pendyala et al. (2012) observaram que o pré-tratamento térmico é o mais eficaz porque estimula a produção de esporos e promove maiores níveis de diversidade entre as bactérias produtoras de hidrogênio. Seus estudos estabeleceram que as populações dominantes pertenciam aos gêneros *Clostridium* e *Enterococcus*, mostrando a eficácia do pré-tratamentos em aumentar o índice de diversidade de bactérias produtoras de hidrogênio. No entanto, eliminar *archaeas* metanogênicas pode não ser suficiente para evitar o consumo de H₂, uma vez que as algumas bactérias homoacetogênicas são formadoras de esporos (OH; VAN GINKEL; LOGAN, 2003), podendo reesporular e consumir o H₂.

2.4 Discussão final

Os resultados de diversas pesquisas relacionadas com a produção de H₂ a partir de glicerol têm mostrado que é possível alcançar o rendimento máximo teórico de 1 mol H₂/mol glicerol, ainda que Fernandes et al. (2010) e Ngo, Kim e Sim (2011) tenham alcançado rendimentos bastantes superiores ao valor máximo teórico. Valores de rendimento de H₂ acima do valor máximo teórico podem ser atribuídos à erros analíticos ou até mesmo à degradação de alguns metabólitos (e conseqüente liberação de H₂) sob temperaturas elevadas, já que as reações tendem a ser termodinamicamente mais favorável com o aumento da temperatura. Tomando como exemplo os resultados alcançados por Ngo, Kim e Sim (2011), utilizando a cultura termofílica de *Thermotoga neapolitana*, é possível afirmar que, mesmo alcançando esse elevado rendimento (1,42 mol H₂/mol glicerol), esse processo tem um balanço energético negativo, já que é necessário mais energia para aquecer o reator até 75 °C do que a energia obtida pelo aumento da produção de H₂. Considerando que cada mol de H₂ pode gerar 68 kcal (JAIN, 2009) e que Ngo, Kim e Sim (2011) encontraram uma produção específica de até 77,1 mol H₂/m³ de reator, o sistema pode gerar 4414 kcal H₂/m³ reator. No entanto, para aquecer 1 m³ de reator com uma solução aquosa de 25 a 75 °C, é necessário o uso de 50.000 kcal.

Não existem estudos que avaliaram a bioaugmentação de lodo para produzir H₂ a partir de glicerol, mas esta parece ser uma alternativa promissora, uma vez que a combinação de

rotas metabólicas do consórcio microbiano pode melhorar a eficiência da decomposição e da produção de hidrogênio de compostos complexos (HUNG; CHANG; CHANG, 2011). Essa revisão mostra que quase todos os experimentos foram conduzidos em batelada, com exceção de dois que operaram reatores em fluxo contínuo, porém utilizando cultura pura como inóculo (ITO et al., 2005; LO et al., 2013). Reatores de fluxo contínuo podem ser operado em COV alta e constante de modo que a produção de ácidos orgânicos seria suficiente para inibir as bactérias que consomem H_2 .

Pré-tratamento do inóculo de natureza mista melhora a produção de H_2 e são amplamente utilizados. Não há consenso sobre o pré-tratamento que melhor seleciona uma microbiota com potencial para produção de H_2 . No entanto, na prática, o pré-tratamento de uma quantidade de inóculo necessária para inocular um reator em escala industrial é dispendiosa e demorada. Uma alternativa seria diminuir ou eliminar a atividade metanogênica através da operação de reatores sob COV elevada (HAFEZ et al., 2010) e controlar o pH do meio para valores entre 5,0 e 5,5 (DINAMARCA; BAKKE, 2011).

Baseado na produção atual de glicerol residual e na projeção feita para 2024 (OECD/FAO, 2015), é possível calcular o impacto da utilização desse subproduto como substrato para produção biológica de H_2 . Uma vez que cada mol de glicerol pode ser convertido a, no máximo, 1 mol de H_2 , as produções molares de H_2 anuais são $3,5 \times 10^{10}$ e $4,0 \times 10^{10}$ mols para os anos de 2015 e 2024, respectivamente. Usando os dados de previsão de consumo de mundial de H_2 para 2020 (BOND et al., 2011), que é estimado ser $4,5 \times 10^{13}$ mol (excluindo refinação de petróleo), o glicerol residual tem um potencial para fornecer apenas 0,1% da demanda mundial de H_2 . No entanto, a estratégia futura para a construção da matriz energética parece estar em busca de fontes renováveis, sempre que disponíveis, como, por exemplo o glicerol produzido em países onde oleaginosas são utilizadas para a produção de biodiesel. Além disso, a produção de H_2 pode ser associada à produção de metano em um reator de duas fases (DOUNAVIS et al., 2016; LUO et al., 2011), reduzindo o impacto ambiental e melhorando o potencial energético da cadeia de produção de biodiesel.

Capítulo publicado parcialmente como: VIANA, Q. M.; VIANA M. B., VASCONCELOS E. A. F., SANTAELLA S. T., LEITÃO R. C. Fermentative H_2 production from residual glycerol: a review. **Biotechnology Letters**, v. 36, n. 7, p. 1381-1390, 2014.

3 PRODUÇÃO BIOLÓGICA DE HIDROGÊNIO A PARTIR DE GLICEROL RESIDUAL: EFEITO DA TÉCNICA DE INIBIÇÃO DA METANOGÊNESE E ORIGEM DO INÓCULO

3.1 Introdução

O hidrogênio tem se tornado uma fonte de energia alternativa bastante atrativa, já que nenhum gás do efeito estufa é gerado durante sua combustão (KOTAY; DAS, 2008). Além disso, esse gás possui potencial energético de 122 kJ/g, o equivalente a 2,75 vezes mais do que o obtido com qualquer combustível baseado em hidrocarbonetos (ARGUN et al., 2008b). Esse combustível pode ser produzido por métodos físico-químicos (KOTAY; DAS, 2008) ou biológicos (VIANA et al., 2014b). Os métodos biológicos incluem a biofotólise de água por algas e a digestão anaeróbia por bactérias, também conhecida como fermentação escura (*dark fermentation*).

Em 2015, estima-se terem sido geradas 3.200.000 toneladas de glicerol como subproduto da reação de transesterificação de óleos vegetais e gordura animal para produção de biodiesel. A previsão é de esse volume aumentar para 3.700.000 toneladas em 2024 (OECD/FAO, 2015). Apesar de ter valor agregado na indústria química, o glicerol proveniente da indústria de biodiesel (glicerol residual) possui cerca de 20% de impurezas, tornando-o um produto de baixo valor agregado, sendo necessário buscar alternativas de uso, de modo a não se tornar um passivo ambiental e inviabilizar, por conseguinte, a produção de biodiesel (VIANA et al., 2012a).

O glicerol residual tem sido bastante estudado como substrato para síntese biológica de outros produtos (DA SILVA; MACK; CONTIERO, 2009), entre eles, o hidrogênio (VIANA et al., 2014b), seja por meio de culturas puras (ITO et al., 2005; NAKASHIMADA et al., 2002) ou mistas (ROSSI et al., 2011; TEMUDO; KLEEREBEZEM; VAN LOOSDRECHT, 2007).

Espécies de *Clostridium* e *Bacillus* são conhecidas pelo seu potencial em converter matéria orgânica complexa e monômeros orgânicos em hidrogênio (HAWKES et al., 2002). Entretanto, o uso de culturas puras para esse fim exige condições assépticas que podem tornar o processo mais oneroso. Uma das estratégias para evitar custos, na partida de um reator produtor de hidrogênio, é o uso de culturas mistas. Essas bactérias produtoras de H₂ (BPH)

podem ser encontradas em ambientes naturais, como, por exemplo, solos (GINKEL; SUNG; LAY, 2001), sedimentos (SITTIJUNDA; REUNGSANG, 2012b), sistemas de tratamento de esgoto doméstico e industrial (MANGAYIL; KARP; SANTALA, 2012; SITTIJUNDA; REUNGSANG, 2012a; VARRONE et al., 2013; VLASSIS et al., 2012), esterco bovino (SONG et al., 2012) e líquido ruminal. Entretanto, nesse consórcio microbiano, há espécies responsáveis por consumir H_2 , especialmente as *archaeas* metanogênicas hidrogenotróficas.

Dessa forma, é necessário se adotar estratégias de modo a eliminar os micro-organismos indesejáveis presentes na cultura mista e diminuir a partida (*start-up*) de reatores (ROSSI et al., 2011; SELEMO et al., 2009). Essa seleção ocorre porque, quando uma cultura mista é exposta a um ambiente ou uma situação de estresse, somente as bactérias formadoras de esporos (principalmente as *Clostridium* e *Bacillus*) são capazes de sobreviver.

Diversas técnicas de inibição da metanogênese (TIM) têm sido propostas para eliminar a atividade metanogênica, tais como: choque térmico (WANG; WAN, 2008), no qual elevadas temperaturas causam desnaturação enzimática e aumentam a fluidez da membrana, levando à hidrólise celular (RAMPELOTTO, 2010); adição de ácidos (ROSSI et al., 2011), já que o H^+ extracelular afeta as rotas metabólicas desses organismos por meio da alteração da atividade catalítica das enzimas e de proteínas da membrana (VIANA et al., 2014b); adição de bases (ROSSI et al., 2011), seja por inativação irreversível de enzimas microbianas ou alterando a integridade da membrana citoplasmática através do efeito tóxico gerado durante a transferência de nutrientes ou através da destruição de fosfolípidos de ácidos graxos insaturados (ESTRELA et al., 1995); aeração (NING et al., 2012), já que micro-organismos sensíveis a oxigênio dissolvido morrerão por falta de enzimas que ajudam no metabolismo do O_2 , como, catalase, peroxidase e superóxido desmutase (JENNEY et al., 1999); congelamento seguido de descongelamento (ROSSI et al., 2011), a fim de a solidificação da água no meio externo aumentar a concentração de soluto fora da célula, fazendo as células não formadoras de esporos perderem água por osmose, deixando-as desidratadas e matando-as (MULDREW; MCGANN, 1994); secagem no infravermelho (SONG et al., 2012) para desidratar as células e provocar a morte das não formadoras de esporos; e adição de químicos, tais como, clorofórmio, ácido 2-bromoetano sulfônico (BESA) ou 2-bromoetanossulfonatos (BES), responsáveis por causar a inibição enzimática das *archaeas* metanogênicas (VENKATA MOHAN; LALIT BABU; SARMA, 2008).

Não existe consenso sobre qual TIM é a mais adequada para selecionar as produtoras de hidrogênio (SAADY, 2013), sendo necessário realizar esse estudo caso a caso, pois cada inóculo possui uma diversidade microbiana. Alternativamente, é possível, também, produzir H_2 utilizando inóculo sem nenhuma TIM, controlando apenas as condições ambientais requeridas por micro-organismos produtores de H_2 e desfavoráveis ao crescimento de *archaeas* metanogênicas, tais como, pH ácido (próximo a 5,5) (FANG; LIU, 2002) e elevada relação substrato/micro-organismo (acima de 4,0 gDQO/gSTV). Sob elevada concentração de matéria orgânica, uma grande concentração de metabólitos (principalmente, ácidos orgânicos voláteis) fica solúvel no meio, inibindo a metanogênese, seja pela queda do pH do meio (ZHU; BÉLAND, 2006), seja causando toxicidade por excesso de metabólitos (FOUNTOULAKIS; PETOUSI; MANIOS, 2010). Além disso, em elevadas relações substrato/micro-organismo, aumenta-se a pressão parcial de H_2 , diminuindo a taxa de conversão de ácido propiônico a ácido acético e, por sua vez, a metano (LETTINGA; HULSHOF POL; ZEEMAN, 1999). Igualmente, a metanogênese pode ser metabolicamente incapaz de consumir integralmente a elevada concentração de substrato. Como consequência, o glicerol é consumido apenas parcialmente, reduzindo a produção e o rendimento de H_2 . Em termos práticos, isso acontece quando a relação substrato/micro-organismo ultrapassou o limite máximo.

Apesar de muitos estudos já terem avaliado o efeito de diferentes TIM na produção de H_2 , a maioria deles utilizaram glicose como substrato (HU; CHEN, 2007; WANG; WAN, 2008). Outrossim, outros substratos já foram testados, como sacarose (LIU; ZHU; YANG, 2006; SONG et al., 2012), efluente à base de lactose (VENKATA MOHAN; LALIT BABU; SARMA, 2008) e glicerol (ROSSI et al., 2011). Entretanto, nenhum deles investigou a relação da origem do inóculo com a TIM na produção de H_2 utilizando glicerol residual como substrato.

Partindo do princípio de a origem do inóculo determinar a predominância de uma ou mais espécies e a morte de micro-organismos metanogênicos presentes em uma cultura mista poder aumentar o rendimento de hidrogênio (ROSSI et al., 2011), o objetivo deste trabalho foi identificar o inóculo e TIM mais apropriados para dar partida em um reator produtor de hidrogênio de fluxo contínuo, utilizando glicerol residual como substrato. Neste trabalho, foram avaliados quatro inóculos diferentes e três TIM distintas.

3.2 Material e métodos

3.2.1 Glicerol residual

O glicerol residual utilizado nos experimentos foi gerado como subproduto da reação de transesterificação de uma mistura de óleo de soja (56%) e sebo bovino (44%) para produção de biodiesel. A usina localiza-se em Quixadá, Ceará, e pertence a Petróleo Brasileiro S.A (Petrobrás). As características físico-químicas do glicerol residual são: concentração de matéria orgânica equivalente a 1374 gDQO/L; matéria orgânica não glicerídea (MONG) de 1%, pH de 5,5, pureza de 81,5%, cinzas de 4,8%, umidade de 12,7%, metanol de 0,03%, teor de NaCl de 5,3% e densidade de 1255,9 kg/m³.

3.2.2 Inóculos e técnicas de inibição da metanogênese (TIM)

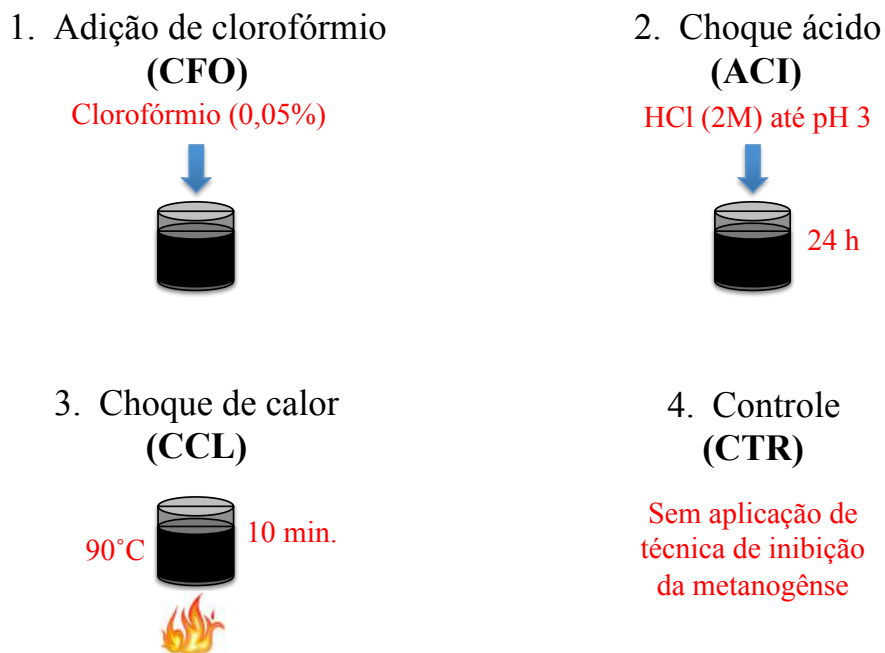
Três diferentes inóculos foram testados. Suas procedências, características e concentração (em termos de sólidos voláteis totais) estão descritas na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Procedência, característica e concentração de sólidos totais voláteis (STV) de cada inóculo utilizado nos experimentos.

Procedência	Característica	Sigla	[STV] ^a
Lodo de reator UASB tratando esgoto sanitário da cidade de Fortaleza, CE	floculento	ES	55
Líquido ruminal extraído do organismo de caprino	disperso	LR	34
Lodo oriundo de reator UASB secundário (metanogênico) tratando efluente de uma cervejaria localizada em Pacatuba, CE	granular	EC	26
Mistura entre os inóculos em iguais proporções volumétricas	-	MX	38

Antes de iniciar os testes em batelada, os inóculos foram submetidos à três diferentes TIM: adição de clorofórmio (0,05% [v/v] de clorofórmio adicionado ao frasco imediatamente antes do teste) (NING et al., 2012) (CFO); choque de pH ácido (2M de ácido clorídrico adicionado ao lodo até pH 3,0 por 24 horas) (ROSSI et al., 2011) (ACI); e choque de calor (lodo mantido em banho-maria por 10 min a 90° C) (KIM; HAN; SHIN, 2006) (CCL). Foram realizados, também testes controle (CTR), sem nenhuma TIM, mantendo as mesmas condições ambientais. A Figura 3.1 ilustra os procedimentos realizados em cada TIM. Todos os testes foram feitos em triplicata, com exceção dos controles, realizados em duplicata.

Figura 3.1 – Procedimentos realizados para cada técnica de inibição da metanogênese (TIM) e no frasco controle.



3.2.3 Testes em batelada

O procedimento experimental foi desenvolvido no Laboratório em Tecnologia da Biomassa da Embrapa Agroindústria Tropical. O tratamento experimental foi adaptado de Davila-Vazquez et al. (2008), utilizando frascos em borossilicato de 218 mL, com volume útil de 200 mL. Cada frasco continha 14,7 g de glicerol residual/L (16 gDQO/L), inóculo em quantidade suficiente para uma concentração final de 4,5 g STV/L e 2,5 mL de uma solução de nutrientes, contendo (g/L) $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (291,2), KH_2PO_4 (100), NaCl (1), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

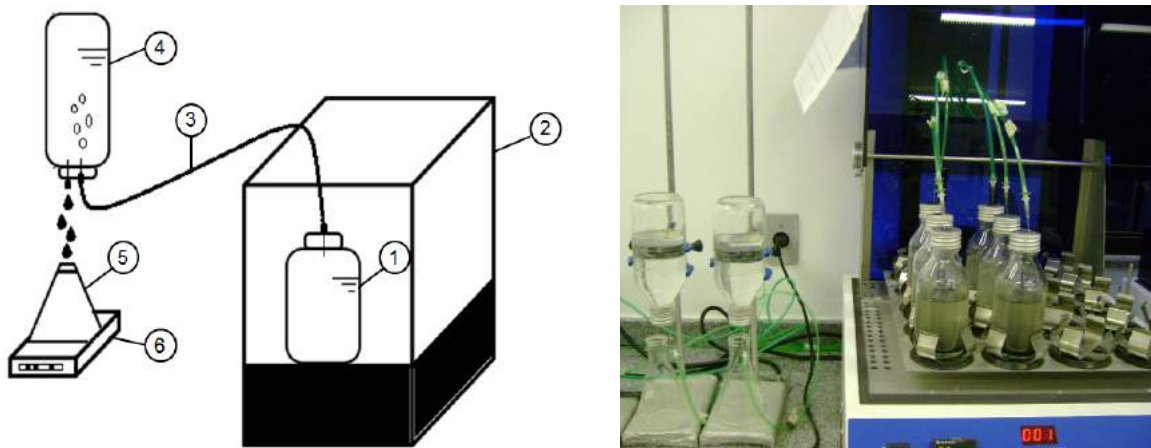
(10), $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (5,15), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1), $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1,5), $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0,465), ZnCl_2 (0,06), $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,12), $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,21). O pH inicial foi ajustado para 8,12 com NaOH 2 M e, em seguida, foi injetado gás N_2 (fornecido pela Linde Gases Brasil) por um minuto em cada frasco, a fim de manter a atmosfera anaeróbia. Os frascos vedados com septos de borracha foram colocados em uma mesa incubadora fabricada pela Tecnal, modelo TE142, a 37°C , com rotação de 120 rpm, até que toda a produção de H_2 cessasse (aproximadamente 7 dias). Todos os testes ocorreram em triplicata. Foi utilizado frascos controle (sem presença de matéria orgânica) para descontar o volume de H_2 produzido por endogenia.

O volume de hidrogênio era medido por deslocamento de líquido seguido de cromatografia gasosa (SOTO; MÉNDEZ; LEMA, 1993). Basicamente, o volume de biogás acumulado em 24h era deslocado, por meio de uma mangueira delgada, a uma garrafa de Mariotte contendo uma solução salina de NaCl (25 g/L) a pH 2,0 (corrigido com H_2SO_4 P.A.), de modo a evitar dissolução dos gases. Logo em seguida, uma amostra deste biogás era coletada por uma seringa e injetada em um cromatógrafo gasoso para conhecer a constituição do biogás. A Figura 3.2 ilustra o esquema e fotografia do aparato experimental utilizado nos testes. Ao final do teste, o pH de cada frascos foi verificado imediatamente.

3.2.4 Métodos analíticos

As concentrações de CH_4 , H_2 e CO_2 no biogás produzido eram medidas por cromatógrafo gasoso (C2V-200 micro GC, Thermo Fisher Scientific, The Netherlands), equipado com um detector de condutividade térmica e uma coluna capilar de aço inoxidável (10 m x 0,5 mm). A temperatura do injetor, do forno e do detector foi de 120, 60 e 120°C , respectivamente. A concentração de sólidos totais voláteis e a demanda química de oxigênio foram determinadas seguindo os procedimentos descritos em APHA (2005). Os ácidos carboxílicos e os álcoois foram determinados por análises de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC). A separação foi realizada em uma coluna C_{18} Shimpack CLC-ODS Column (150 mm x 4,6 mm) e, a detecção, por um detector de arranjos de diodos (DAD). A fase móvel era composta ácido fosfórico/acetonitrila, a vazão da corrida era de 0,4 mL/min e a temperatura de 25°C .

Figura 3.2 – Esquema e fotografia do aparato experimental utilizado nos testes.



Legenda:

- | | |
|--------------------|---|
| 1) Frasco-reator | 4) Garrafa de Mariotte (25 gNaCl/L; pH=2) |
| 2) Mesa incubadora | 5) Recipiente para coleta da sol. salina |
| 3) Mangueira | 6) Balança analítica |

3.2.5 Análise estatística

Os resultados foram analisados usando a técnica de análise de variância (ANOVA), com intervalo de confiança de 95% (teste de Tukey) e $p \leq 0,05$, usando o *software* Sisvar (versão 5.1) para comparação das médias. Esta técnica tem sido amplamente usada para comparar as médias dos resultados de ensaios em batelada em triplicata, inclusive para testes que buscaram avaliar o efeito das técnicas de inibição da metanogênese para aumentar a produção de H_2 (CHAGANTI; KIM; LALMAN, 2012; LALMAN; BAGLEY, 2001; PENDYALA et al., 2012).

3.3 Resultados e discussão

3.3.1 Produção acumulada de metano e hidrogênio

A produção acumulada de metano e de hidrogênio são mostradas, respectivamente, nas Figuras 3.3 e 3.4, para cada inóculo e TIM, em função do tempo de experimento. A priori, os resultados mostraram ter sido a atividade metanogênica mais afetada negativamente quando o LR e o MX foram os inóculos utilizados, pois a produção acumulada não passou de

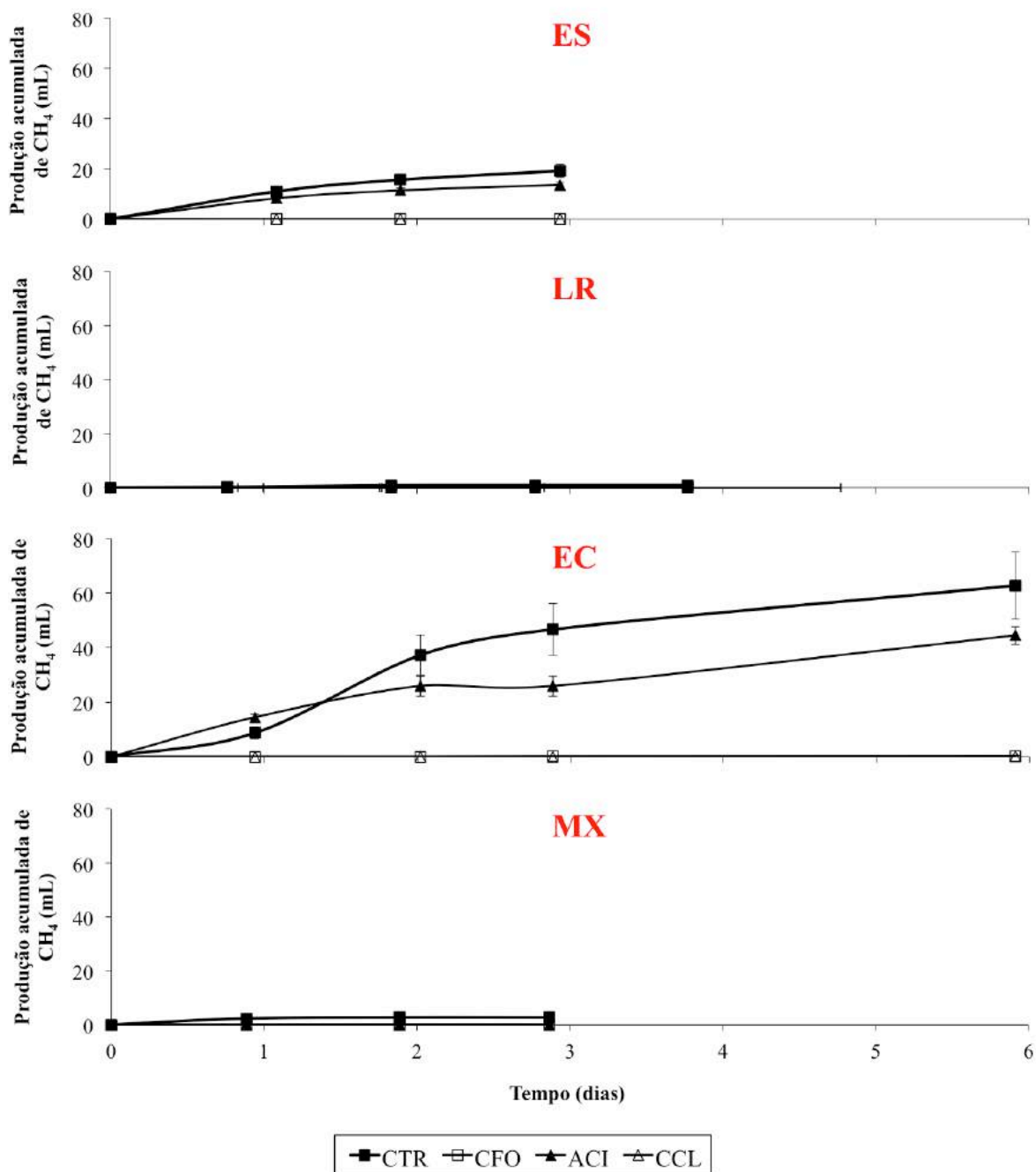
2,7 mL (Figura 3.3). No entanto, ao observar a produção acumulada nos frascos controle (CTR), é possível atribuir a baixa produção de CH₄ no LR e MX à baixa atividade metanogênica desses inóculos. Outra possibilidade é a de que as condições de concentração de substrato e de nutrientes, favoráveis à produção de H₂, tenham influenciado mais fortemente a atividade metanogênica desses inóculos.

Quando o EC e o ES foram os inóculos utilizados, nenhum metano foi produzido para CFO e CCL, enquanto o efeito do ACI sobre a metanogênese foi parcial. Para EC, houve redução de 29% da produção de metano em relação ao frasco controle (CTR) (Figura 3.3). Já para ES, essa redução foi de 32% (Figura 3.3). Esses resultados contestam os resultados obtidos por Ren et al. (2008), que, ao utilizarem um inóculo de características semelhantes ao ES empregado neste experimento, verificaram que o choque ácido provocou inibição total da atividade metanogênica.

Apesar do comportamento semelhante entre os inóculos ES e EC, esse último alcançou produção de metano bem mais elevada, com cerca de 63 mL, quando nenhuma TIM foi aplicada (CTR), e 45 mL, ao aplicar ACI. A maior atividade metanogênica do EC se deve ao fato de ser um lodo retirado de um reator secundário (metanogênico), conhecido por ter uma elevada quantidade de micro-organismos produtores de metano (DEMIREL; YENIGÜN, 2002; MERLINO et al., 2013). Em contrapartida, Zhu e Béland (2006) utilizaram lodo proveniente de um biodigestor primário (rico em bactérias acidogênicas) para comparar a eficiência de diferentes TIM, e observaram um volume de metano acumulado considerado irrisório (no máximo 1,5 mL) no frasco controle.

Essa maior resistência do EC ao ACI pode ser explicada pelo fato de a concentração de H⁺ extracelular não ter sido suficientemente alta para alterar os sítios catalíticos do elevado número relativo de *archaeas* metanogênicas. Isso acontece porque o EC é um lodo do tipo granular, conhecido pela elevada densidade populacional microbiana (inclusive de *archaeas* metanogênicas), quando comparado à lodo floculento (HULSHOFF POL et al., 2004). Além disso, a estrutura do grânulo serve de proteção para as *archaeas* metanogênicas, localizadas predominantemente no interior do agregado microbiano (GUIOT; PAUSS; COSTERTON, 1992). Por isso, seria necessária uma maior concentração do ácido para promover inibição total das metanogênicas presentes do EC. Em contrapartida, os demais inóculos foram mais afetados pela concentração de íons H⁺ do meio, justamente pelas suas características mais dispersas e floculentas.

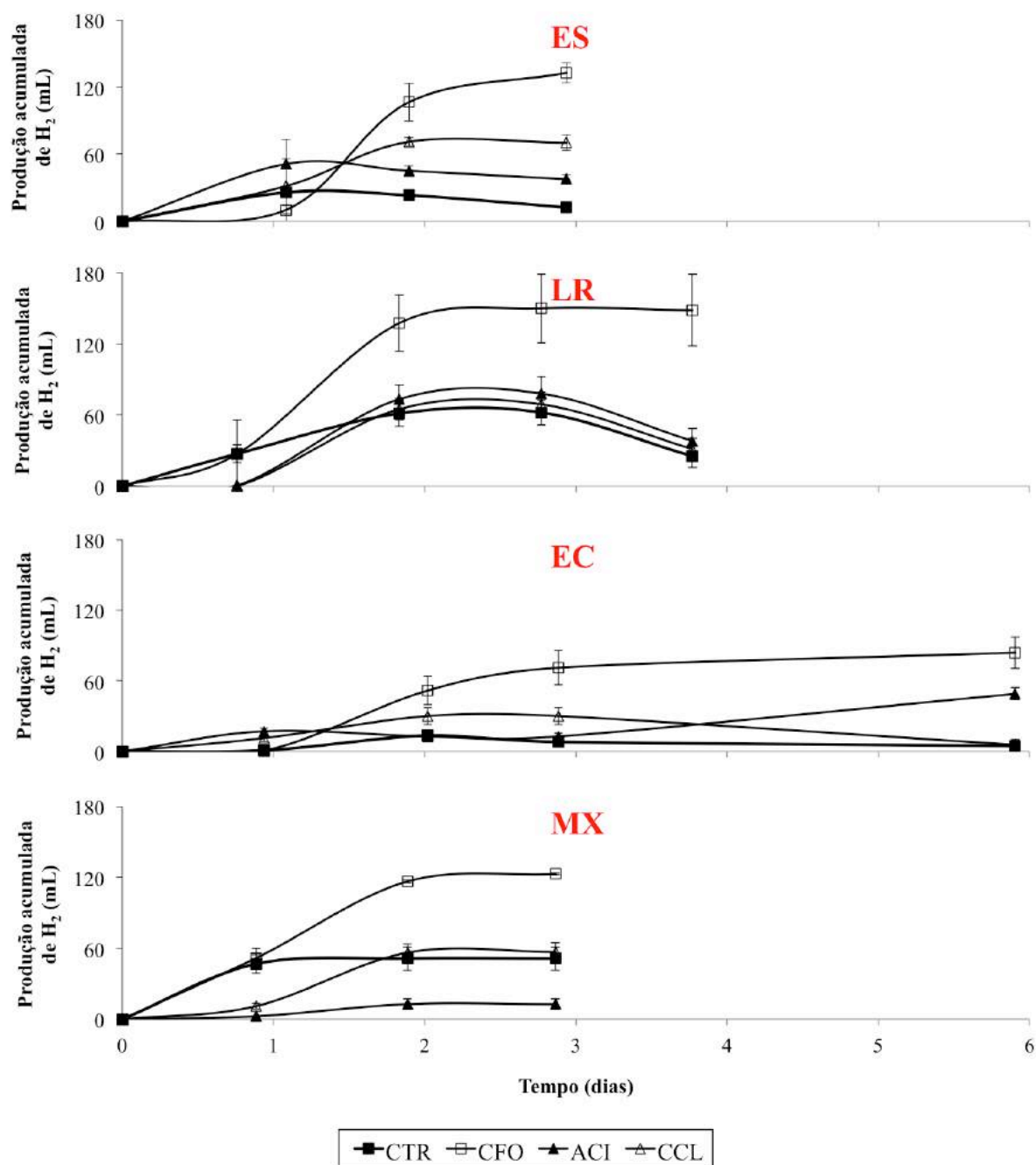
Figura 3.3 – Produção acumulada de metano para cada inóculo e técnica de inibição da metanogênese (TIM) em função do tempo de experimento.



Nota:

ES: Lodo de reator UASB tratando esgoto sanitário da cidade de Fortaleza, Ceará; LR: Líquido ruminal extraído do organismo de caprino; EC: Lodo oriundo de reator UASB secundário (metanogênico) tratando efluente de uma cervejaria; e MX: Mistura entre os inóculos em iguais proporções volumétricas; CFO: adição de clorofórmio; ACI: choque de pH ácido; CCL: choque de calor; CTR: controle.

Figura 3.4 – Produção acumulada de hidrogênio para cada inóculo e técnica de inibição da metanogênese (TIM) em função do tempo de experimento.



Nota:

ES: Lodo de reator UASB tratando esgoto sanitário da cidade de Fortaleza, CE; LR: Líquido ruminal extraído do organismo de caprino; EC: Lodo oriundo de reator UASB secundário (metanogênico) tratando efluente de uma cervejaria; e MX: Mistura entre os inóculos em iguais proporções volumétricas. CFO: adição de clorofórmio; ACI: choque de pH ácido; CCL: choque de calor; CTR: controle.

Em geral, a quantidade de metano gerada foi considerada bastante baixa, mesmo nos frascos controle (CTR), indicando que apenas as condições ambientais e operacionais foram suficientes para suprimir a metanogênese. Esse mesmo comportamento foi observado por Zhu e Béland (2006), ao compararem diversas TIM de cultura mista na produção de hidrogênio a partir de sacarose. A rota metabólica de produção de H₂ é tipicamente acidogênica, fazendo que o pH caia para fora da faixa de sobrevivência das *archaeas* metanogênicas (ZHU; BÉLAND, 2006). Para descartar, ainda mais, a possibilidade de produção de metano, Wang e Wan (2008) recomendam utilizar lodo proveniente de reator acidogênico (reator primário) por conter pouco ou nenhum organismo metanogênico.

A produção máxima de H₂ foi alcançada para o inóculo LR, com 148,3 mL, seguido por ES, MX e EC, com 132,6, 123,0 e 83,8 mL, respectivamente. Em todos os casos, a produção máxima ocorreu quando CFO foi aplicada. Para as demais TIM, a produção de hidrogênio variou de acordo com cada inóculo, mostrando que cada um possui resistência diferente de acordo com cada TIM.

Como era de se esperar, a produção acumulada de H₂ aumentou quando alguma TIM foi aplicada, com exceção do lodo MX, cujo volume de H₂ foi reduzido de 51,4 (CTR) para 12,7 mL, após ACI, revelando, portanto, não ser essa uma estratégia adequada caso se deseje misturar os três inóculos. Ainda sobre o MX, foi observado que CTR e CCL exerceram efeito semelhante sobre esse inóculo, pois tiveram produção acumulada estatisticamente iguais ($p \leq 0,05$), com comportamento diferente apenas na fase lag, maior quando CCL foi aplicado.

Os maiores valores de produção de H₂ para o ES aconteceram justamente para as TIM que tiveram inibição total da metanogênese, CFO e CCL. No entanto, após o segundo dia de teste, houve uma leve redução do H₂ acumulado, evidenciando que bactérias homoacetogênicas foram capazes de resistir a tais TIM. Bactérias *Clostridium* formadoras de esporos, tais como, *Clostridium aceticum* e *Clostridium thermoautrophicum*, são conhecidas por produzirem acetato a partir de H₂ e CO₂ (MINTON; CLARKE, 1989).

Igualmente, houve queda do volume acumulado de H₂ para o ES submetido ao ACI, e no frasco CTR, esse consumo de H₂ pode ter sido causado tanto por bactérias homoacetogênicas, como por *archaeas* metanogênicas hidrogenotróficas que sobreviveram ao choque de pH, pois havia metano no biogás.

A produção acumulada de H₂ para o inóculo LR aumentou gradualmente mas, depois do segundo dia, observou-se um consumo de H₂ em taxas semelhantes para os frascos CTR,

ACI e CCL. Esse consumo de H_2 foi, provavelmente, resultante da homoacetogênese, pois nenhum metano foi detectado no biogás. Não foi possível observar acúmulo de ácido acético para reforçar esta hipótese, mas é bem provável que esse ácido tenha sido consumido para formação de ácido caproico através da reação de alongamento de cadeia. Esta reação acontece quando micro-organismos específicos utilizam ácidos carboxílicos de cadeia curta (ácidos acético e butírico, por exemplo) para formar ácidos de cadeia média, tais como os ácidos caproico (C6) e caprílico (C8). A concentração de C6 para LR+ACI e LR+CCL foram 1,2 e 0,9 g/L, como será mostrado posteriormente.

Quando o EC foi o inóculo utilizado, observou-se que o volume de H_2 para o CCL aumentou gradualmente com o tempo, porém diminuiu logo após o segundo dia. Provavelmente, isso ocorreu via homoacetogênese, pois essa TIM inibiu a atividade metanogênica, ao contrário do CTR, em que houve aumento da produção de metano, ao mesmo tempo em que o H_2 foi consumido. Ao analisar o comportamento do ACI, é possível perceber ter havido produção significativa para ambos os gases, denotando não ter tido efeito a TIM sobre as BPH, tampouco sobre as consumidoras de H_2 .

3.3.2 Efeito da técnica de inibição da metanogênese (TIM)

Os rendimentos de hidrogênio alcançados por cada inóculo e TIM estão apresentados na Tabela 3.2. De acordo com os resultados alcançados, é possível afirmar que a adição de clorofórmio (CFO) teve efeito positivo mais significativo na produção de hidrogênio ($p \leq 0,05$), produzindo, em média, 0,171 mol H_2 /mol glicerol. Isso pode ser atribuído ao fato de o clorofórmio (a 0,05%, v/v) ser um agente seletivo, pois tem a capacidade de inibir apenas as *archaeas* metanogênicas (consumidoras de H_2). Essa inibição seletiva foi comprovada por meio das análises do biogás, em que nenhum metano foi detectado quando empregado essa TIM, independentemente do inóculo utilizado.

O mecanismo de inibição pelo clorofórmio ocorre pela supressão da metil-coenzima M redutase presente apenas nas *archaeas* metanogênicas (HU; CHEN, 2007). Além disso, o clorofórmio pode se ligar aos corrinoídeos livres (forma análoga e ativa da vitamina B12) na célula microbiana, reduzindo as concentrações destes e bloqueando o funcionamento dessas enzimas (HU; CHEN, 2007). Assim, uma TIM atuante na atividade enzimática parece ser mais eficiente do que CCL ou ACI, também comprovado por Hu e Chen (2007) e Zhu e Beland (2006).

Tabela 3.2 – Teste de Tukey realizado a partir dos rendimentos de hidrogênio (em mol H₂/mol glicerol) obtidos em cada cenário estudado.

TIM	Inóculo				Média
	ES	LR	EC	MX	
CTR	^C 0,036 ^{b,c}	^E 0,087 ^a	^H 0,019 ^c	^J 0,072 ^{a,b}	0,053 ^M
CFO	^A 0,186 ^d	^D 0,208 ^d	^F 0,117 ^e	^I 0,172 ^d	0,171 ^L
ACI	^{B,C} 0,072 ^f	^E 0,109 ^f	^G 0,068 ^f	^K 0,018 ^g	0,067 ^M
CCL	^B 0,100 ^h	^E 0,098 ^{h,i}	^{G,H} 0,042 ^j	^J 0,080 ⁱ	0,080 ^M
Média	0,098 ^l	0,126 ^k	0,062 ^m	0,085 ^{l,m}	

Notas:

Os valores seguidos por letras diferentes diferem estatisticamente. A análise comparativa entre as técnicas de inibição da metanogênese (TIM) deve ser feita na vertical, tendo as letras maiúsculas como referencia. A análise comparativa entre os inóculos deve ser feita na horizontal, tendo as letras minúsculas como referencia.

TIM = técnica de inibição da metanogênese; ES = lodo floculento proveniente de um reator UASB que trata esgoto sanitário; LR = líquido ruminal, obtido a partir do estômago de caprino; EC = lodo granular oriundo de um reator secundário (metanogênico) de uma estação de tratamento de efluente de cervejaria; MX = mistura em iguais proporções volumétricas dos inóculos citados anteriormente; CTR: controle; CFO: adição de clorofórmio; ACI: choque de pH ácido; CCL: choque de calor.

Além das *archaeas* metanogênicas, o clorofórmio conseguiu inativar as bactérias homoacetogênicas, pois não houve consumo de H₂ mesmo quando a metanogênese cessou. Apesar de algumas bactérias homoacetogênicas serem formadoras de esporos, Scholten, Conrad e Stams (2000) comprovaram, outrossim, que o clorofórmio é capaz de inibir esse grupo de micro-organismos.

Dentre todos os inóculos, o EC alcançou menor rendimento, aplicando CFO (0,117 mol H₂/mol glicerol). Isso pode ter ocorrido devido à quantidade menor de bactérias acidogênicas nesse agregado microbiano, pois esse inóculo é proveniente de um reator secundário (metanogênico). Isso pode ser comprovado, comparando o rendimento médio obtido por todos os inóculos quando nenhuma TIM foi aplicada (CTR), alcançando o EC menor valor (0,019 mol H₂/mol glicerol).

As demais TIM tiveram efeito semelhante entre si no rendimento de hidrogênio, apresentando valores médios estatisticamente iguais ($p \leq 0,05$), de acordo com o teste de Tukey, realizado a partir dos rendimentos obtidos (Tabela 3.2).

Outros estudos já haviam demonstrado a eficiência de clorofórmio em inibir a atividade metanogênica (CHIDTHAISONG; CONRAD, 2000; HICKEY; VANDERWIELEN; SWITZENBAUM, 1987; HU; CHEN, 2007; NING et al., 2012). Por outro lado, Wang e Wan (2008) concluíram que a adição de clorofórmio não é a melhor opção para potencializar a produção de H_2 , pois seu uso aumentou a fase *lag* de 11,4 para 14,9 h e reduziu a produção de H_2 em 19,3%, em comparação com o frasco controle. A concentração de clorofórmio a que esses autores submeteram o lodo (2%) pode ter sido a causa dos baixos rendimentos encontrados, pois é conhecido que concentrações acima de 0,05 – 0,10% podem inibir também a atividade das bactérias produtoras de hidrogênio (HU; CHEN, 2007; NING et al., 2012; WANG; WAN, 2008). Essa inibição pode se dar de forma direta ou indireta. De forma direta, o alto potencial redox (10,56 V) do clorofórmio se liga às enzimas forfinóide e corrinóide reduzidas que atuam na rota metanogênica, resultando em uma maior afinidade por estas enzimas reduzidas (LIN et al., 2014). Indiretamente, essa inibição ocorre: 1) pela formação de intermediários tóxicos e reativos durante a lenta degradação de alifáticos halogenados (VAN VLAARDINGEN; VAN BEELEN, 1994); 2) ou bloqueando o funcionamento da vitamina B12, como já explanado.

O ACI foi eficiente apenas aos inóculos ES e EC, uma vez que aumentou o rendimento de H_2 em 2,0 e 3,6 vezes, respectivamente, em comparação ao CTR. Para o inóculo LR, ao ACI não teve efeito significativo ($p \leq 0,05$). Já para o MX, o ACI reduziu o rendimento em 75%, mostrando que essa TIM pode inibir não só a metanogênese, como também as bactérias produtoras de hidrogênio (Figuras 3.3 e 3.4).

Diversos pesquisadores comprovaram o efeito deletério do ACI a culturas mistas (REN et al., 2008; ROSSI et al., 2011; ZHU; BÉLAND, 2006). Hu e Chen (2007) também não recomendam o ACI, pois apresentou rendimentos menores que o do frasco controle. Os baixos valores encontrados para os inóculos LR e MX podem ser explicados pelo fato de que outras bactérias produtoras de H_2 , por exemplo, as do gênero *Enterobacter* e *Klebsiella*, não sobrevivem a um choque de pH ácido, pois têm faixa ótima de pH entre 5,0 e 6,5, reduzindo, por conseguinte, o rendimento do processo (ROSSI et al., 2011). Zhu e Béland (2006) atribuíram a baixa eficiência do choque ácido à queda de pH do meio durante a fermentação

para menos de 4,0. No entanto, no presente experimento, o menor pH foi 5,2, valor considerado dentro da faixa adequada à produção de H_2 . Em contrapartida ao resultado desta pesquisa, Cheong e Hansen (2006) concluíram que o choque ácido foi o mais eficiente dentre cinco TIM estudadas (ácido, BES, calor úmido, calor seco e congelamento).

Apesar de o choque de calor ser a estratégia mais empregada para selecionar BPH (WANG; WAN, 2008), este se mostrou uma técnica bastante agressiva, pois eliminou tanto *archaeas* metanogênicas como afetou a atividade das BPH. Além de eliminar as BPH não formadoras de esporos, essa TIM também reduz a diversidade microbiana no meio, que pode afetar as relações de simbiose e syntrofia ocorridas na produção de H_2 , utilizando culturas mistas como inóculo (REN et al., 2008). Dessa forma, o rendimento do processo será afetado negativamente.

Em contrapartida, Hu e Chen (2007) conseguiram aumentar o rendimento de 0,4 para 118,3 mL H_2 /g glicose quando se aplicou choque de calor ao lodo granular por 30 minutos. A eficiência observada no referido trabalho em selecionar BPH pode ser explicada pela fonte do inóculo, pois eles utilizaram lodo proveniente de reator anaeróbio tratando efluente à base de amido, um substrato que necessita de uma alta atividade acidogênica/hidrogenogênica para hidrólise e conversão a ácidos. Já o lodo granular utilizado na presente pesquisa é um lodo proveniente de reator UASB metanogênico, composto essencialmente por *archaeas*. Rossi et al. (2011), igualmente, apontaram o choque de calor como a TIM mais eficiente em selecionar BPH, se comparado a outras técnicas. Esses pesquisadores aumentaram o rendimento de H_2 em cerca de 4,3 e 3,4 vezes, quando submetteram o inóculo a calor seco e úmido (fervura), respectivamente.

Vale salientar que o CCL conseguiu eliminar totalmente as bactérias homoacetogênicas, pois não houve acúmulo de ácido acético. Logo, conclui-se que o consumo de H_2 ocorrido nos últimos dias do experimento pode ser atribuído à ação de bactérias que utilizaram diretamente o H_2 como doador de elétrons e prótons no alongamento de cadeia (β -oxidação reversa) para formar ácido caproico (C6), como descrito por Ding, Tan e Wang (2010) e Steinbusch et al. (2011). Esse consumo foi mais evidente para o lodo granular, quando a concentração de H_2 no biogás chegou a zero e a de C6 foi de 1,2 g/L. Entretanto, esta hipótese pode ser contestada, seja pelo fato de *C. kluyveri* (principal micro-organismo responsável pelas reações de alongamento de cadeia) não ter sido capaz de utilizar H_2 como doador de elétrons (KENEALY; WASELEFSKY, 1985) ou porque esta rota

metabólica não foi identificada em um estudo minucioso que abordou a termodinâmica de rotas metabólicas de alongamento de cadeia, dentre outras rotas (GONZÁLEZ-CABALEIRO et al., 2013).

Uma alternativa para diminuir o nível de agressividade do CCL e evitar decaimento de BPH formadoras de esporos seria aplicar menores temperaturas, prolongando o tempo de contato. Lay et al. (2005) conduziram testes em batelada, utilizando planejamento experimental para verificar o efeito da temperatura e do tempo na seleção de BPH, e encontraram que os maiores rendimentos de H₂ são alcançados quando o inóculo foi exposto a 80°C por 12 horas. Outros pesquisadores trabalharam sob condições semelhantes, e nenhum metano foi detectado no biogás (AZBAR et al., 2009; FAN; CHEN, 2004).

3.3.3 Influência do inóculo

Os resultados mostraram que a origem do inóculo pode influenciar fortemente no rendimento de hidrogênio ($p \leq 0,05$). Mediante análise dos rendimentos médios de cada inóculo (Tabela 3.2), nota-se que o LR foi o que alcançou o maior valor médio (0,126 mol H₂/mol glicerol) dentre os demais, seguido dos inóculos ES, MX e EC.

Quando nenhuma TIM foi aplicada (CTR), o LR alcançou o maior rendimento (0,087 mol H₂/mol glicerol) em comparação com os demais inóculos, seguido de perto pelo MX (0,072 mol H₂/mol glicerol). No entanto, esses rendimentos são considerados baixos quando comparados com os valores obtidos em outros cenários testados. O baixo rendimento com LR+CTR pode ser explicado pelo consumo do H₂ produzido no processo fermentativo após o segundo dia de batelada (Figura 3.4). Esse consumo pode ter sido feito de forma indireta para formação de ácido caproico, pela qual bactérias homoacetogênicas convertem H₂ a ácido acético e este é posteriormente utilizado no alongamento de cadeia diretamente. Esta hipótese é reforçada quando observa-se que nenhum ácido acético foi detectado ao final do experimento, ao passo que a concentração de C6 alcançou 0,7 g/L (Tabela 3.3).

Bactérias que habitam o líquido ruminal são conhecidas por converter substratos orgânicos à ácido caproico (KENEALY; CAO; WEIMER, 1995). Ding, Tan e Wang (2010) mostraram que é possível haver consumo de H₂ para produzir ácido caproico, sobretudo quando há escassez de etanol, como foi o caso do LR+CTR. Outra explicação baseia-se no fato de parte do glicerol ter sido utilizado para formar 1,3-PPD, já que houve produção de 1,2 g 1,3-PPD/L (Tabela 3.3). A produção de 1,3-PPD ocorre por uma rota metabólica

concorrente à produção de H_2 (BIEBL, 2001). Além disso, é necessário o consumo de 1 mol de H_2 para formar 1 mol de 1,3-PPD (SELEMBO et al., 2009), que reduz ainda mais o rendimento do processo. As mesmas explicações servem para explicar o baixo rendimento do MX+CTR, pois teve comportamento bastante semelhante ao LR do ponto de vista metabólico.

O EC alcançou o menor rendimento de H_2 quando não houve nenhuma TIM (CTR), apenas 0,019 mol/mol glicerol, justamente porque grande parte da matéria orgânica foi consumida para formar CH_4 (Figura 3.3). Isso mostra que apenas as mudanças nas condições ambientais não foram suficientes para suprimir a atividade metanogênica desse inóculo. Comportamento semelhante foi observado por Hu e Chen (2007), que alcançaram um baixo rendimento de H_2 (0,003 mol/mol glicose) em comparação ao de metano (0,54 mol CH_4 /mol glicose), quando nenhuma TIM foi aplicada ao lodo granular. Isso pode ser explicado pela proteção que o grânulo oferece às *archaeas* metanogênicas, como mencionado anteriormente. Além disso, o lodo granular utilizado no presente experimento foi retirado de um reator UASB secundário (metanogênico), ou seja, possui uma microbiota com baixa densidade populacional de bactérias acidogênicas (produtoras de hidrogênio).

Vale destacar o acúmulo de ácido propiônico do EC+CTR, que pode ter sido causado pela inibição de bactérias acetogênicas, devido ao pH ácido do meio (5,2), ideal para degradar propionatos na faixa entre 7,2 e 7,5 (LETTINGA; HULSHOF POL; ZEEMAN, 1999). O acúmulo de ácido propiônico para as demais TIM a que o EC foi submetido também pode ser atribuído a esse fator, com exceção da CFO, que teve pH um pouco mais elevado (6,2) e não acumulou ácido propiônico.

Quando não aplicou-se quaisquer TIM (CTR) (0,036 mol/mol glicerol), o ES também obteve baixo rendimento de H_2 , em razão de: i) o consumo de glicerol foi de apenas 85%; ii) a inibição da metanogênese foi apenas parcial; iii) H_2 consumido para alongamento de cadeia, de forma direta (H_2 como doador de elétrons) ou indireta (homoacetogênese seguida de alongamento de cadeia). Esse resultados contrastam com as observações de Hu e Chen (2007), que conseguiram anular totalmente a produção de CH_4 sem qualquer TIM e produzir 0,89 mol H_2 /mol glicose, .

Quando foram submetidos à CFO, ES, LR e MX alcançaram os maiores rendimentos de H_2 dentre todos os cenários estudados (0,186, 0,208 e 0,172 mol H_2 /mol glicerol, respectivamente). Estes valores são considerados estatisticamente iguais ($p \leq 0,05$), mostrando que esses inóculos são os mais indicados para produção de H_2 a partir de glicerol residual,

desde que seja adicionado clorofórmio ao meio. O EC apresentou rendimento inferior aos demais que foram submetidos à CFO. Entretanto, o rendimento poderia ter sido maior se não houvesse a interrupção do teste, já que o volume de H₂ mostrava uma leve tendência ao aumento. A mesma observação pode ser feita para o ES, mas, como a taxa de produção diminuiu, provavelmente esse aumento não seria tão significativo. Hu e Chen (2007) também comprovaram a eficiência da adição de cloroformio sobre lodo granular, ao conseguirem elevar o rendimento de 0,003 para 0,96 mol H₂/mol glicose, após a aplicação de clorofórmio (0,05% v/v). No entanto, ao utilizarem lodo flocofento, esses autores concluíram que a adição de clorofórmio não aumentava significativamente o rendimento de H₂.

A predominância de espécies de *Clostridium* formadores de esporos, na comunidade microbiana de lodo proveniente de esgoto sanitário (HU; CHEN, 2007) e no líquido ruminal (RATTI et al., 2013), pode ter uma relação com os elevados rendimentos obtidos quando comparados aos outros inóculos, embora a diversidade microbiana desse último possa variar bastante de acordo com o tipo e a dieta do animal (TAJIMA et al., 1999).

Quando os inóculos se submeteram ao ACI, o rendimento alcançado foi estatisticamente igual para ES, LR e EC ($p \leq 0,05$), embora o ACI tenha mostrado uma eficiência apenas parcial para inativar as *archaeas* metanogênicas do EC e do ES, pois, apesar de ter sido observada a produção de H₂, também houve produção considerável de metano, como mostrado nas Figuras 3.4 e 3.3, respectivamente. Tudo indica ter sido esse metano produzido por *archaeas* metanogênicas acetoclásticas, já que não houve consumo de hidrogênio. Outra evidência disso é que as *archaeas* metanogênicas hidrogenotróficas são predominantes nas camadas intermediária e externa do grânulo, ficando, mais expostas ao ataque do ácido. Já as do gênero *Methanosaeta*, exclusivamente acetoclásticas, habitam o interior do grânulo (GUIOT; PAUSS; COSTERTON, 1992). Somado a isso, sabe-se que as *archaeas* metanogênicas acetoclásticas são predominantes na digestão anaeróbia, sendo responsáveis por cerca de 67% de toda a produção de metano (CONRAD, 1999). Provavelmente, seriam necessárias maiores concentrações e/ou um tempo maior de exposição ao ácido para eliminar totalmente essa população. Logo, esses fatores contribuíram para o rendimento não ter sido maior. O ACI também inibiu as bactérias acetogênicas, pois houve acúmulo de ácido propiônico. Hu e Chen (2007) submeteram lodo granular ao choque ácido, mas praticamente não houve efeito deletério sobre as *archaeas* metanogênicas, porque não houve diferença significativa entre essa TIM e o controle.

Entretanto, a estrutura do EC não foi suficiente para proteger as *archaeas* metanogênicas das altas temperaturas, uma vez que nenhum metano foi produzido por esse inóculo quando exposto ao CCL (Figura 3.3). No entanto, essa TIM também afetou as BPH, o que fez o rendimento de H₂ ser bastante baixo (0,042 mol H₂/mol glicerol), evidenciando sua alta agressividade. Em contraste, Hu e Chen (2007) aumentaram o rendimento de 0,003 para 0,96 mol H₂/mol glicose, quando o lodo granular foi submetido a altas temperaturas. A menor resistência do EC, utilizado no presente experimento, ao CCL pode ser atribuída à baixa densidade de BPH no grânulo (extraído de um reator secundário-metanogênico). Já o lodo granular utilizado por Hu e Chen (2007) era proveniente de um reator UASB que tratava efluente à base de amido, rico em bactérias acidogênicas produtoras de H₂.

Apesar de o CCL também ter causado decaimento de BPH presentes no LR e MX, relações de sinergia, mutualismo e simbiose podem ter sido mais significativas do que a predominância desse grupo de bactérias (SONG et al., 2012).

Esperava-se que, ao realizar uma mistura entre os lodos (MX), seria possível aumentar o rendimento de H₂ pelo fato de uma cultura mais diversificada expandir as relações sintróficas entre as espécies. Contudo, observou-se um rendimento com valores intermediários (média de 0,085 mol H₂/mol glicerol), em comparação aos demais inóculos. Ademais, foi evidente uma forte influência do LR no processo fermentativo, pois a tendência da formação dos metabólitos foi muito semelhante à dos frascos contendo apenas LR. Provavelmente as relações de sintrofia não foram bem estabelecidas entre as espécies presentes na mistura. Talvez um tempo de adaptação maior causasse um aumento das relações sintróficas.

3.3.4 Metabólitos solúveis

Nos cenários estudados, todo o glicerol foi convertido a metabólitos solúveis e gasosos, com exceção do ES+CTR, ES+CFO e ES+ACI, cuja conversão foi de 85%, 83% e 83%, respectivamente. A Tabela 3.3 mostra a concentração dos metabólitos solúveis formados ao final da fermentação do glicerol para cada lodo e TIM, incluindo o frasco controle.

Tabela 3.3 – Concentração dos metabólitos solúveis formados ao final da fermentação do glicerol para cada inóculo e TIM, incluindo o frasco controle. Os valores seguidos de \pm representam o desvio padrão.

Inóculo	TIM	Concentração (g/L)						
		C2	C3	C4	C6	C8	EtOH	1,3-PPD
ES	CTR	N.D	0,6 \pm 0,002	0,2 \pm 0,001	1,7 \pm 0,100	N.D	N.D	N.D
	CFO	0,2 \pm 0,001	0,5 \pm 0,001	0,2 \pm 0,001	N.D	N.D	N.D	N.D
	ACI	N.D	0,6 \pm 0,180	0,2 \pm 0,001	0,6 \pm 0,140	N.D	N.D	N.D
	CCL	0,4 \pm 0,001	0,9 \pm 0,040	0,2 \pm 0,001	0,2 \pm 0,001	0,6 \pm 0,100	N.D	N.D

LR	CTR	N.D	0,5 \pm 0,001	N.D	0,7 \pm 0,180	N.D	0,1 \pm 0,001	1,2 \pm 0,100
	CFO	N.D	0,4 \pm 0,002	0,1 \pm 0,001	1,1 \pm 0,200	N.D	1,2 \pm 0,100	0,4 \pm 0,010
	ACI	0,2 \pm 0,001	0,5 \pm 0,001	N.D	1,2 \pm 0,070	N.D	0,5 \pm 0,100	0,7 \pm 0,200
	CCL	0,4 \pm 0,004	0,5 \pm 0,002	0,1 \pm 0,001	0,9 \pm 0,040	N.D	0,3 \pm 0,080	1,0 \pm 0,120

EC	CTR	0,4 \pm 0,050	1,4 \pm 0,200	0,1 \pm 0,001	0,5 \pm 0,020	N.D	N.D	0,7 \pm 0,050
	CFO	N.D	0,1 \pm 0,001	0,5 \pm 0,004	1,2 \pm 0,050	N.D	N.D	0,6 \pm 0,050
	ACI	0,3 \pm 0,070	1,3 \pm 0,200	0,1 \pm 0,001	0,7 \pm 0,020	N.D	N.D	0,7 \pm 0,050
	CCL	0,3 \pm 0,060	0,7 \pm 0,070	0,1 \pm 0,001	1,2 \pm 0,050	N.D	N.D	0,7 \pm 0,040

MX	CTR	N.D	0,6 \pm 0,060	0,4 \pm 0,020	1,0 \pm 0,100	N.D	N.D	1,4 \pm 0,200
	CFO	0,4 \pm 0,060	0,3 \pm 0,010	0,3 \pm 0,010	0,8 \pm 0,100	N.D	0,6 \pm 0,000	0,4 \pm 0,020
	ACI	N.D	0,8 \pm 0,020	0,6 \pm 0,020	1,3 \pm 0,200	N.D	0,5 \pm 0,000	1,4 \pm 0,200
	CCL	0,1 \pm 0,020	N.D	0,1 \pm 0,001	1,0 \pm 0,200	N.D	0,2 \pm 0,000	1,5 \pm 0,100

Notas: TIM = técnica de inibição da metanogênese; ES = lodo floculento proveniente de um reator UASB que trata esgoto sanitário; LR = líquido ruminal, obtido a partir do estômago de caprino; EC = lodo granular oriundo de um reator secundário (metanogênico) de uma estação de tratamento de efluente de cervejaria; MX = mistura em iguais proporções volumétricas dos inóculos citados anteriormente; CTR: controle; CFO: adição de clorofórmio; ACI: choque de pH ácido; CCL: choque de calor; Cn, onde “n” é o número de carbonos equivalente ao ácido orgânico produzido; EtOH = etanol; 1,3-PPD = 1,3-propanodiol; N.D = não detectado.

A diferença entre as rotas metabólicas e os respectivos subprodutos formados pode ser atribuída à diversidade da população microbiana em cada inóculo, antes e após a aplicação da TIM (MU; YU; WANG, 2007). Em termos de concentração, os principais produtos formados foram ácido propiônico, 1,3-PPD, etanol e ácido caproico. As rotas metabólicas que predominaram nos testes não favoreceram, portanto, a produção de H₂. De acordo com Biebl (2001), Biebl et al. (1999) e Zeng et al. (1993), a produção de H₂ ocorre pela rota do piruvato-formiato e tem como principais subprodutos os ácidos acético, butírico e etanol. Outros

autores comprovaram experimentalmente serem estes os principais subprodutos da produção de H₂ a partir de glicerol (MANGAYIL; KARP; SANTALA, 2012; TAPIA-VENEGAS et al., 2015).

A maior produção de 1,3-PPD ($p \leq 0,05$) foi obtida com MX, seguida do LR. O 1,3-PPD é obtido biologicamente somente a partir da fermentação de glicerol, e tem uma rota metabólica concorrente à rota de produção de H₂. Nessa rota (rota redutiva), o glicerol é convertido a 3-hidroxi propionaldeído e, posteriormente, a 1,3-PPD, ao passo que o H₂ é produzido pela rota oxidativa. A síntese de 1,3-PPD a partir de glicerol requer o consumo de 1 mol de hidrogênio (SELEMBO et al., 2009), equivalente ao rendimento máximo teórico. Por esse motivo, elevados rendimentos de 1,3-PPD têm sido associados à baixa produção de H₂ ou mesmo a nenhuma produção (SAINT-AMANS et al., 1994). Isso pode ser comprovado pelos resultados encontrados na presente pesquisa, pois os testes que alcançaram maiores rendimentos de H₂ (ES, LR e MX submetidos a CFO) tiveram baixa ou nenhuma produção de 1,3-PPD (Tabela 3.3). A concentração de glicerol utilizada nesse experimento (14,7 g/L) pode ter contribuído para ocorrer uma elevada produção de 1,3-PPD, já que altas concentrações desse substrato (> 10g/L) favorecem essa rota metabólica (SEIFERT et al., 2009). Vlassis et al. (2012) avaliaram a produção de H₂ a partir de glicerol e encontraram que o 1,3-PPD foi responsável por 38-55% da DQO do efluente, dependendo do pH.

A síntese de ácido propiônico acontece quando o fosfoenolpiruvato é convertido a succinato, sendo posteriormente transformado em propionato. Para haver produção de H₂, seria necessário que o fosfoenolpiruvato fosse antes convertido a piruvato (DA SILVA; MACK; CONTIERO, 2009). No entanto, além da própria cultura, outras condições podem ter favorecido a acumulação de ácido propiônico, tais como: i) concentração do glicerol (15 g/L), semelhante à recomendada por Barbirato, Chedaille e Bories (1997), para chegar a elevados rendimentos com espécies de *Propionibacterium* e *Clostridium*, que é 20 g/L; pH, que ficou na faixa ótima da acidogênese (entre 5,0 e 6,0) e fora da faixa ótima de consumo desse ácido, que é entre 7,2 e 7,5 (CHERNICHARO, 2007); pressão parcial de H₂, que torna a taxa de conversão a ácido acético mais lenta (LETTINGA; HULSHOF POL; ZEEMAN, 1999). Chen, Lin e Lin (2002) avaliaram o efeito do pH do meio na produção de hidrogênio a partir de glicose, utilizando cultura mista como inóculo e observaram que, quando havia acúmulo de ácido propiônico, o rendimento de H₂ caía de 222 para 124 mL/g glicose, provavelmente pelas causas mencionadas anteriormente.

Já a formação de ácido caproico acontece quando os ácidos acético e butírico, na presença de etanol (doador de elétrons), são consumidos por bactérias (principalmente, *Clostridium kluyveri*), de forma a ocorrer o alongamento de cadeia via oxidação- β reversa (GROOTSCHOLTEN et al., 2013b). No presente experimento, a concentração de ácido acético e butírico foram baixas ou nulas quando houve uma elevada produção de ácido caproico, o que permite afirmar ter havido alongamento de cadeia. A maior produção de ácido caproico aconteceu ao utilizar ES+CTR, quando a concentração alcançou 1,7 g/L.

Em todos os cenários estudados, a quantidade de ácido acético foi nula ou baixa em comparação a outros metabólitos solúveis, indicando seu consumo para o alongamento de cadeia ou a supressão das bactérias homoacetogênicas. Isso aconteceu nos experimentos de Wang e Wan (2008), ao verificarem que os maiores rendimentos de H_2 ocorreram quando a concentração desse ácido foi baixa em comparação com o teste controle. O acúmulo de ácido acético pode estar ligado à baixa produção de H_2 , pois as bactérias homoacetogênicas são um grupo de bactérias que sintetizam acetato a partir de H_2 e CO_2 , e resistem a condições adversas, porque muitas delas são pertencentes ao gênero *Clostridium*, formadoras de esporos (OH; VAN GINKEL; LOGAN, 2003), isto é, podem resistir às mais variadas condições adversas.

3.4 Conclusões

Neste trabalho, o glicerol residual foi utilizado como única fonte de matéria orgânica para avaliar o efeito de diferentes inóculos e técnicas de inibição da metanogênese na produção de hidrogênio. Os resultados mostraram que se deve aplicar uma técnica de inibição da metanogênese ao lodo, pois essa estratégia fez aumentar o rendimento de H_2 . O líquido ruminal (LR) mostrou-se ser o inóculo com maior potencial de produção de hidrogênio dentre os inóculos testados. A adição de clorofórmio a 0,05% (v/v) (CFO) mostrou-se ser a TIM mais adequada para selecionar as BPH. Por fim, as melhores combinações de inóculo e TIM para produção de H_2 são: LR+CFO, ES+CFO ou MX+CFO, com valores de rendimento estatisticamente iguais ($p \leq 0,05$), com médias variando entre 0,172 e 0,208 mol H_2 /mol glicerol.

4 EFEITO DA RELAÇÃO SUBSTRATO:MICRO-ORGANISMO (S_0/X_0) NA PRODUÇÃO BIOLÓGICA DE HIDROGÊNIO A PARTIR DE GLICEROL RESIDUAL

4.1 Introdução

O glicerol, na sua forma pura, tem valor agregado nas indústrias farmacêutica, de cosméticos, tintas, automóveis, alimentos, tabaco, papel e celulose, têxtil e couro (WANG et al., 2001). No entanto, o glicerol gerado como subproduto da reação de transesterificação de triglicerídeos para produção de biodiesel (glicerol residual) possui cerca de 20% de impurezas, o que pode tornar seu processamento industrial inviável economicamente (VIANA et al., 2012b). A fim de possibilitar novos usos ao glicerol residual e manter a sustentabilidade econômico-ambiental da produção de biodiesel, diversas pesquisas têm avaliado sua aplicação como fonte de substrato para a produção de H_2 a partir da digestão anaeróbia (SARMA et al., 2012a; VIANA et al., 2014b).

O glicerol residual é um substrato potencial para produção biológica de H_2 , pois: i) não compete com a produção de alimentos; ii) possui baixo valor de mercado (YAZDANI; GONZALEZ, 2007); iii) tem elevado teor de matéria orgânica, equivalente a 1260 g/L em termos de demanda química de oxigênio (COD), em média (VIANA et al., 2012a); iv) possui baixo teor de material em suspensão, o que poderia tornar a hidrólise uma etapa limitante (NASR et al., 2011; PAN et al., 2008).

Basicamente, a síntese biológica de H_2 pode ocorrer de duas formas: biofotólise, na qual a água se dissocia para formar H_2 por ação da luz; e por fermentação, em que bactérias convertem matéria orgânica complexa em compostos mais simples, liberando H_2 como subproduto gasoso (MATHEWS; WANG, 2009).

Entre as bactérias mais eficazes na produção fermentativa de H_2 , destacam-se as do gênero *Clostridium*, *Bacillus* e *Enterobacter* (HAWKES et al., 2002). Contudo, a necessidade de trabalhar sob condições assépticas, a esterilização do meio e da matéria-prima encarecem o processo. Uma das alternativas para reduzir esses custos é utilizar culturas mistas, posto que, além das vantagens econômicas, possuem maior versatilidade na decomposição de substratos complexos e resíduos orgânicos (AGLER et al., 2011), e flexibilidade para operar em modo (semi)contínuo por muitos anos (SPIRITO et al., 2014).

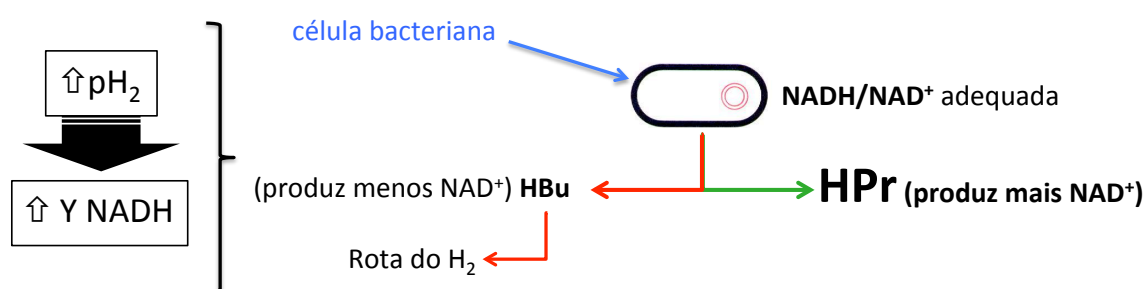
A produção biológica de H_2 a partir de glicerol ocorre pela rota oxidativa, na qual o substrato é convertido a dihidroxiacetona pela enzima glicerol desidrogenase (GDH), posteriormente fosforilada pela dihidroxiacetone kinase. Na etapa seguinte, a dihidroxiacetona é convertida a piruvato (somente por anaeróbios estritos) e a acetil-CoA e CO_2 pela enzima piruvato-ferredoxina oxidoreductase (KUBIAK et al., 2012). Durante a formação de acetil-CoA, enzimas [FeFe] hydrogenases, [FeNi] hydrogenases, and [Fe] hydrogenases agem na produção de H_2 e metabólitos solúveis, principalmente ácido acético, ácido butírico e etanol (MATHEWS; WANG, 2009). Entretanto, a presença de micro-organismos consumidores de H_2 (principalmente *archaeas* metanogênicas e bactérias homoacetogênicas) pode diminuir o rendimento do processo. Uma das estratégias para suprimir a atividade desses micro-organismos indesejáveis é impor concentração elevada de substrato em relação à de micro-organismos, ou seja a relação S_0/X_0 elevada. Nessas condições, os metabólitos formados por bactérias fermentativas acidogênicas (produtoras de H_2) podem não ser consumidos pelas *archaeas* metanogênicas e bactérias homoacetogênicas na mesma taxa em que são produzidos, inibindo-as e facilitando a liberação de H_2 para o meio gasoso. Isso acontece porque a taxa de crescimento das bactérias produtoras de H_2 (acidogênicas) é cerca de cinco vezes maior que a dos micro-organismos consumidores (GAVALA; ANGELIDAKI; AHRING, 2003; METCALF & EDDY, 2003).

Em testes em batelada, a relação S_0/X_0 é expressa em massa de demanda química de oxigênio (DQO) por massa de sólidos totais voláteis (STV) e pode ser escolhida variando S_0 e mantendo X_0 constante, ou variando X_0 e fixando S_0 (LIU, 1996). Em geral, a produção de H_2 é potencializada quando a digestão anaeróbia ocorre com valores de relação S_0/X_0 acima de 1,8 gDQO/gSTV. Entretanto, valores de relação S_0/X_0 acima do limite máximo tolerado para uma determinada cultura de micro-organismos pode inibir a síntese de H_2 , seja pelo acúmulo de ácidos ou pela elevada pressão parcial de H_2 (pH_2).

O mecanismo de inibição por acúmulo de ácidos se dá porque em pH abaixo de 4,5 ocorre o aumento da concentração de ácidos dissociados e da força iônica da solução, resultando na mudança de produção de hidrogênio para a produção solventes (CHONG et al., 2009). O efeito inibitório em pH baixo ocorre quando os ácidos não dissociados apolares penetram na parede celular, liberando prótons no interior das células, que possui maior pH (GINKEL; SUNG; LAY, 2001). O excesso de hidrogênio no meio (pH_2 elevado) aumenta o rendimento de NADH na fase acidogênica, substituindo a rota metabólica de produção de ácido butírico pela rota de formação de ácido propiônico para manter uma razão

NADH/NAD⁺ apropriada dentro da célula, pois a produção de ácido propiônico produz mais NAD⁺ do que a síntese de ácido butírico (SIVAGURUNATHAN; SEN; LIN, 2014), como ilustrado na Figura 4.1. Além disso, a p_{H_2} elevada também pode tornar a reação de degradação de ácido propiônico (e consequente liberação de H₂) termodinamicamente desfavorável (KIM et al., 2006), sobretudo em valores acima de 10⁻⁴ atm (HARPER; POHLAND, 1986).

Figura 4.1 – Esquema mostrando a influência da elevada pressão parcial de hidrogênio (p_{H_2}) no aumento do rendimento de ácido propiônico (HPr).



O glicerol também pode ser convertido a 1,3-propanodiol (1,3-PPD) pela rota redutiva, por meio da qual sofre desidratação, gerando 3-hidroxi-propanalaldeído, pela enzima glicerol desidrogenase, e 1,3-PPD, por meio da 1,3-propanodiol oxidoreductase (BIEBL et al., 1999). Entretanto, elevados rendimentos de 1,3-PPD podem estar associados à baixa ou nenhuma produção de H₂, pois estes produtos são formados a partir de rotas metabólicas concorrentes. A síntese de 1,3-PPD a partir de glicerol requer o consumo de 1 mol de H₂ (SELEMBO et al., 2009), valor equivalente ao rendimento máximo teórico de H₂ a partir de glicerol. Esse diol, contudo, está quase sempre presente durante a fermentação de glicerol, utilizando cultura pura (CHOOKAEW; O-THONG; PRASERTSAN, 2012; ITO et al., 2005; LO et al., 2013) ou mista (SELEMBO et al., 2009; SITTIJUNDA; REUNGSANG, 2012a, 2012b). Seifert et al. (2009), por exemplo, variaram o valor da relação S_0/X_0 de 0,5 a 15,8 gDQO/gSTV e encontraram rendimentos de 1,3-PPD entre 23% e 62% (em termos de DQO). Entretanto, não foi possível observar nenhuma correlação entre o rendimento de 1,3-PPD e o valor da relação S_0/X_0 .

Segundo o modelo cinético de Monod, se a concentração de substrato for muito superior à da massa de lodo adicionada, a reação passa a ser considerada de ordem zero, ou

seja, a taxa de produção de hidrogênio se torna constante, independente da concentração de substrato (ANDREWS, 1968; BEKINS, B; WARREN; GODSY, 1998).

Em virtude dos efeitos do excesso de matéria orgânica anteriormente mencionados, bactérias do gênero *Clostridium* (principais produtoras de H₂) podem esporular e reduzir a conversão de glicerol em H₂ (HAFEZ et al., 2010). A esporulação é um mecanismo que bactérias específicas (sobretudo *Clostridium* e *Bacillus*) possuem para se manterem vivas sob condições adversas. Essas bactérias formam uma parede espessa resistente e suspendem suas atividades metabólicas até que as condições mínimas de sobrevivência sejam reestabelecidas (LOWE; JAIN; ZEIKUS, 1993).

Não há um consenso sobre qual relação S₀/X₀ leva ao maior rendimento de hidrogênio, podendo variar entre 0,5 e 15,8 gDQO/gSTV (HAFEZ et al., 2010; LIN; CHANG; HUNG, 2008; SEIFERT et al., 2009). Isso ocorre porque, para cada inóculo existe uma concentração ótima de substrato, sendo recomendado realizar testes de laboratório, de modo a conhecer o valor crítico dessa relação (VIANA et al., 2012a).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da relação S₀/X₀ na produção de hidrogênio, metano e outros metabólitos a partir de glicerol residual, baseando-se em rendimento, taxas de produção específica e consumo de glicerol.

4.2 Material e métodos

4.2.1 Substrato

O substrato utilizado foi o glicerol gerado durante a produção de biodiesel a partir de uma mistura entre óleo de soja e sebo bovino, em proporções de 56% e 44% (v/v), respectivamente. A usina de biodiesel localiza-se em Quixadá, Ceará, e pertence a Petróleo Brasileiro S.A (Petrobrás). O glicerol residual possuía pureza 81,5%, concentração de matéria orgânica equivalente a 1374 gDQO/L, teor de matéria orgânica não glicerídea (MONG) igual a 1%, pH 5,5, 4,8% de cinzas, 12,71% de umidade, teor de metanol de 0,03%, 5,3% de NaCl e densidade de 1255,9 kg/m³.

4.2.2 Inóculo

O inóculo utilizado nos testes foi retirado de um reator UASB em escala real, tratando esgoto doméstico da cidade de Fortaleza, Ceará, Brasil. Possuía características flocculentas e concentração de sólidos totais voláteis (STV) igual a 83,9 g/L.

4.2.3 Procedimento experimental

O procedimento experimental foi desenvolvido no Laboratório em Tecnologia da Biomassa da Embrapa Agroindústria Tropical e seguiu a metodologia descrita em Dávila-Vazquez (2009). No presente experimento, decidiu-se fixar a concentração de matéria orgânica em 16 gDQO/L em todos os frascos, variando apenas a concentração de lodo e buscando manter a relação S_0/X_0 desejada (entre 1 e 16 gDQO/gSTV). Essa decisão se deu de forma a evitar que a pH_2 fosse mais uma variável de influencia sobre o resultado do experimento, já que quanto maior a concentração, maiores as chances elevar o valor da pH_2 . A Tabela 4.1 mostra as concentrações de substrato e de lodo utilizadas para cada valor da relação S_0/X_0 .

Tabela 4.1 – Concentrações de substrato e de lodo utilizadas para cada valor da relação S_0/X_0 .

Relação S_0/X_0 (gDQO/gSTV)	Concentração	
	Glicerol residual (gDQO/L)	Lodo (gSTV/L)
0 (Controle)	0	4,4
1	16	16,0
4	16	4,0
7	16	2,3
10	16	1,6
13	16	1,2
16	16	1,0

Utilizou-se frasco em borossilicato com 0,2 L de volume útil. Os testes ocorreram em mesa incubadora fabricada pela Tecnal, modelo TE142, a 37°C e 120 rpm. O pH inicial do meio foi ajustado a 8,12, utilizando NaOH. Esse valor de pH também foi utilizado nos experimentos de Dávila-Vazquez (2009), valor suficientemente alto para que o pH final não fique extremamente baixo devido à acidogênese. Isso porque nenhum tampão foi adicionado aos frascos. Todos os testes ocorreram em triplicata. Foi utilizado frascos controle (sem presença de matéria orgânica) para descontar o volume de H_2 produzido por endogenia.

Foram adicionados macro e micronutrientes (concentrações entre parênteses, em g/L), com base nos procedimentos descritos em Dávila-Vazquez (2009): $NH_4H_2PO_4$ (291,2),

KH_2PO_4 (100,00), NaCl (1,00), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (10,00), $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (5,20), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1,00), $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1,50), $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0,47), ZnCl_2 (0,06), $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,12), $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,21). Em todos os frascos, foi acrescentado clorofórmio a 0,05% (v/v) para inativar as *archaeas* produtoras de metano (NING et al., 2012). Antes de serem selados, os frascos sofreram expurga com gás N_2 (fornecido pela Linde Gases Brasil) por um minuto, para manter a atmosfera anaeróbia.

O experimento teve duração de 196 h. O volume de hidrogênio era medido por deslocamento de líquido seguido de cromatografia gasosa (SOTO; MÉNDEZ; LEMA, 1993). Basicamente, o volume de biogás acumulado era deslocado por uma mangueira a uma garrafa de Mariotte, contendo uma solução salina de NaCl (25 g/L) a pH 2,0 (corrigido com H_2SO_4), de maneira a evitar dissolução dos gases. Logo em seguida, uma amostra desse biogás era analisada por cromatografia gasosa, para conhecer a constituição deste. Dessa forma, o volume de H_2 era calculado, multiplicando-se o volume de biogás pelo percentual de H_2 . Ao final do teste, o pH de cada frascos foi verificado imediatamente.

Para o cálculo do rendimento, em $\text{mL H}_2/\text{gDQO}$, dividiu-se o volume de H_2 , ao final da batelada, pela massa de DQO adicionada aos frascos no início do teste. A taxa de produção específica de hidrogênio (TPEH), expressa em $\text{mL H}_2/[\text{gSTV} \cdot \text{d}]$, foi calculada, dividindo-se a produção diária de hidrogênio ($\text{mL H}_2/\text{d}$) pela massa de lodo no frasco (concentração de lodo no frasco, em gSTV/L x volume útil do frasco, em L), como descrito por Kargi, Eren e Ozmihci (2012).

4.2.4 Métodos analíticos

As concentrações de CH_4 , H_2 e CO_2 no biogás produzido foram medidas através de um cromatógrafo gasoso (C2V-200 micro GC, Thermo Fisher Scientific, The Netherlands), equipado com um detector de condutividade térmica e uma coluna capilar de aço inoxidável (10 m x 0,5 mm). A temperatura do injetor, do forno e do detector foram 120, 60 e 120°C, na devida ordem. Os metabólitos solúveis foram determinados por análises de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC), utilizando um cromatógrafo da marca Shimadzu, equipado com uma coluna C_{18} Shim-pack CLC-ODS Column (150 mm x 4,6 mm) e a detecção foi realizada por um detector de arranjos de diodos (DAD). A fase móvel era composta de ácido fosfórico/acetonitrila, a vazão da corrida era de 0,4 mL/min e, a temperatura, de 25°C. O pH, a concentração de sólidos totais voláteis e a demanda química de

oxigênio foram determinados seguindo os procedimentos descritos em *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2005).

4.2.5 Análise dos dados

Os dados de produção acumulada de hidrogênio foram ajustados pela equação de Gompertz modificada (Equação 4.1), descrita por Zwietering et al. (1990). Esse modelo é o mais empregado para representar a produção acumulada de gases em testes em batelada. Essa estimativa foi feita utilizando o Microsoft Excel 2011.

$$V_{H_2}(t) = P \exp \left\{ - \exp \left[\frac{R_m e}{P} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (4.1)$$

Em que: $V_{H_2}(t)$ é o volume de hidrogênio acumulado em um tempo “t”, em mL; P é a produção máxima de hidrogênio, em mL; R_m é taxa de produção máxima de hidrogênio (mL/h); λ é o tempo da fase de adaptação (fase lag), em h; t é o tempo de incubação, em h; e é $\exp(1) = 2,71828$.

4.3 Resultados e discussão

4.3.1 Produção acumulada de metano e hidrogênio, e rendimento de H_2

A produção acumulada de hidrogênio e metano ao final do experimento para cada relação S_0/X_0 testada são mostrados na Tabela 4.2. Observa-se que a produção acumulada de H_2 ao final do teste foi proporcional ao valor da relação S_0/X_0 , alcançando 103 mL com S_0/X_0 de 10 gDQO/gSTV. No entanto, a produção acumulada de H_2 foi menor nos frascos com relação S_0/X_0 de 13 e 16 gDQO/gSTV, com produção máxima de 77 e 72 mL, respectivamente. Isso indica que o limite de S_0/X_0 para esse inóculo é igual a 10 gDQO/gSTV. Este também foi o limite encontrado por Seifert et al. (2009) ao avaliarem a produção de H_2 a partir de glicerol sob diversos valores de relação S_0/X_0 , fixando a concentração de matéria orgânica em 10 gDQO/L. Por outro lado, Vlassis et al. (2012) recomendam que a produção de H_2 não deve ser conduzida em valor de relação S_0/X_0 maior que 4,2 gDQO/gSTV, pois, acima desse valor, o rendimento de H_2 se torna inferior .

Tabela 4.2 – Produção acumulada de hidrogênio e metano após 196 horas de fermentação para cada relação S_0/X_0 testada.

Relação S_0/X_0 (gDQO/gSTV)	H_2 (mL)		CH_4 (mL)	
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
1	36,3	11,5	17,2	1,5
4	57,3	5,9	6,3	0,6
7	66,8	1,9	2,6	1,0
10	103,2	8,2	0,0	0,0
13	75,1	3,4	0,6	0,5
16	72,0	2,1	0,4	0,5

Essa redução da produção de H_2 para relações de S_0/X_0 acima de 10 gDQO/gSTV indica uma diminuição do rendimento do processo e pode ser atribuída à produção excessiva de 1,3-PPD e/ou à elevada pressão parcial de hidrogênio. No primeiro caso, a síntese de 1,3-PD ocorreu porque os ácidos formados nas primeiras horas do teste (principalmente ácido propiônico, ver Tabela 4.3) fez o valor de pH reduzir de 8,12 (pH inicial) para valores dentro da faixa ótima para produção de 1,3-PPD, que é entre 6,0 e 7,5 (BIEBL et al., 1992). Observa-se ainda, na Tabela 4.3, que o pH final ficou entre 6,1 e 6,7. Após 72 horas de teste, praticamente todo o glicerol havia sido consumido, ao passo que a concentração de 1,3-PPD alcançou sua concentração máxima, independentemente da relação S_0/X_0 aplicada. Com isso, o processo fermentativo cessou por falta de substrato (glicerol) e impossibilitou que ocorresse acidificação do meio para a faixa que potencializaria a produção de H_2 , que é em torno de 5,5 (FANG; LIU, 2002). A elevada a pressão parcial de hidrogênio limitou termodinamicamente a degradação do ácido propiônico. Isso porque a conversão de ácido propiônico à ácido acético só é favorável em pH_2 menor que 10^{-4} atm (HARPER; POHLAND, 1986), enquanto que no presente experimento a pH_2 média esteve sempre acima desse limite, independentemente da relação S_0/X_0 aplicada, com valores variando entre $1,7 \times 10^{-3}$ e 0,5 atm. Além disso, a elevada pH_2 pode ter aumentado o rendimento de NADH, favorecendo a rota de produção ácido propiônico para que os micro-organismos mantivessem uma razão NADH/NAD⁺ adequada no interior da célula microbiana (SIVAGURUNATHAN; SEN; LIN, 2014). O acúmulo de ácido propiônico pôde ser comprovado pelas elevadas concentrações desse metabólito ao final do teste (Tabela 4.3)

Tabela 4.3 – Concentração final de metabólitos solúveis e de glicerol e pH após 196 h para cada relação S_0/X_0 estudada. Os valores seguidos de \pm representam o desvio padrão da média.

S_0/X_0 ^a	Concentração final (g/L)									pH final
	HAc	HPr	HBu	HVa	HSu	HLa	1,3-PPD	EtOH	Glicerol	
1	1,40±0,34	2,23±0,53	0,00±0,00	0,28±0,19	0,02±0,04	0,43±0,04	3,2±0,81	0,32±0,04	0,19±0,14	6,71±0,13
4	0,94±0,19	3,35±3,69	0,26±0,05	0,23±0,08	0,05±0,04	0,09±0,03	3,55±0,63	0,36±0,02	0,00±0,00	6,48±0,07
7	0,96±0,19	5,61±3,41	0,21±0,14	0,23±0,13	0,00±0,00	0,16±0,16	3,82±0,68	0,40±0,05	0,00±0,00	6,51±0,11
10	0,74±0,56	5,23±3,63	0,25±0,32	0,11±0,10	0,02±0,04	0,05±0,05	4,07±0,40	0,51±0,17	0,01±0,01	6,11±0,13
13	0,95±0,13	8,43±0,62	0,64±0,08	0,12±0,14	0,02±0,04	0,01±0,02	4,69±0,35	0,48±0,10	0,35±0,51	6,13±0,09
16	0,58±0,20	5,24±1,99	0,36±0,33	0,06±0,06	0,03±0,04	0,00±0,00	2,92±1,10	0,53±0,28	0,00±0,00	6,08±0,13

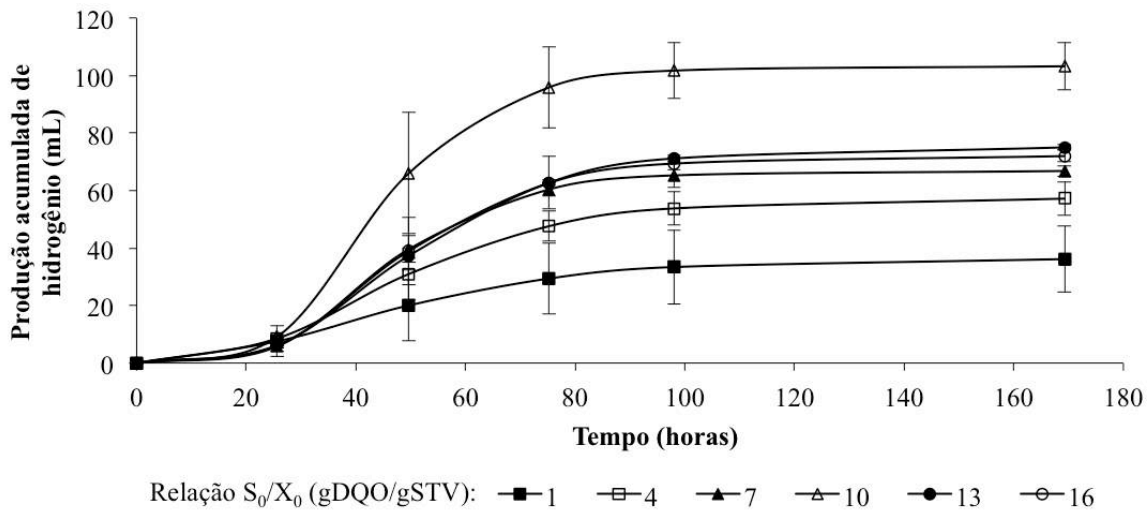
Nota: ^a relação substrato/micro-organismo, em gDQO/gSTV. HAc, HPr, HBu, HVa, HSu, HLa representam os ácidos acético, propiônico, butírico, valérico, succínico e lático, respectivamente; 1,3-PPD e EtOH representam o 1,3-propanodiol e etanol, respectivamente.

Para superar a inibição da produção de H₂ causada pelo acúmulo de ácido propiônico, algumas estratégias têm sido propostas, como a operação de reatores termofílicos (> 45°C) para suprimir a atividade das bactérias produtoras de ácido propiônico e tornar a degradação desse ácido mais favorável termodinamicamente (LUO et al., 2010; SIVAGURUNATHAN; SEN; LIN, 2014), extração de H₂ através de injeção de N₂ para reduzir a pH₂ e, por conseguinte, reduzir o acúmulo de ácido propiônico (HAWKES et al., 2007) e alimentação em fluxo contínuo em vez de batelada, para reduzir o acúmulo de H₂ no *headspace* e tornar a degradação de ácido propiônico termodinamicamente mais favorável (KIM et al., 2008).

Por outro lado, quanto menor o valor da S₀/X₀, maior foi a produção de metano e menor a de H₂ (Tabela 4.2). Isso acontece porque o desenvolvimento de micro-organismos consumidores de hidrogênio (bactérias homoacetogênicas e *archaeas* metanogênicas) é favorecido em baixos valores de S₀/X₀, sobretudo abaixo de 1,8 gDQO/gSTV (AQUINO et al., 2007). Os resultados mostrados na Tabela 4.2 comprovam esse fato, pois houve produção de 17,2 mL CH₄ quando aplicou-se relação S₀/X₀ igual a 1 gDQO/gSTV. Todavia, o volume acumulado de CH₄ tornou-se baixo ou desprezível quando utilizou-se maiores valores da relação S₀/X₀.

Quanto maior a relação S₀/X₀, maior a fase lag. Provavelmente as mudanças nas condições ambientais (pH, temperatura etc.) influenciaram na taxa de germinação dos esporos e, conseqüentemente, na produção de H₂. No entanto, após a fase lag, a produção de H₂ aumentou para todos os valores de relação S₀/X₀ testadas, com menor inclinação da curva para o frasco com 1 gDQO/gSTV, justamente por não oferecer valor de S₀/X₀ favorável à produção de H₂, pelos motivos anteriormente mencionados (Figura 4.2). Fan e Chen (2004) já haviam mencionado que baixos tempos de adaptação estão associados a menores relações S₀/X₀. Isso ocorre porque o inóculo, adaptado a um meio com baixa relação S₀/X₀, precisa de um certo tempo para se aclimatar a um ambiente com elevada concentração de matéria orgânica.

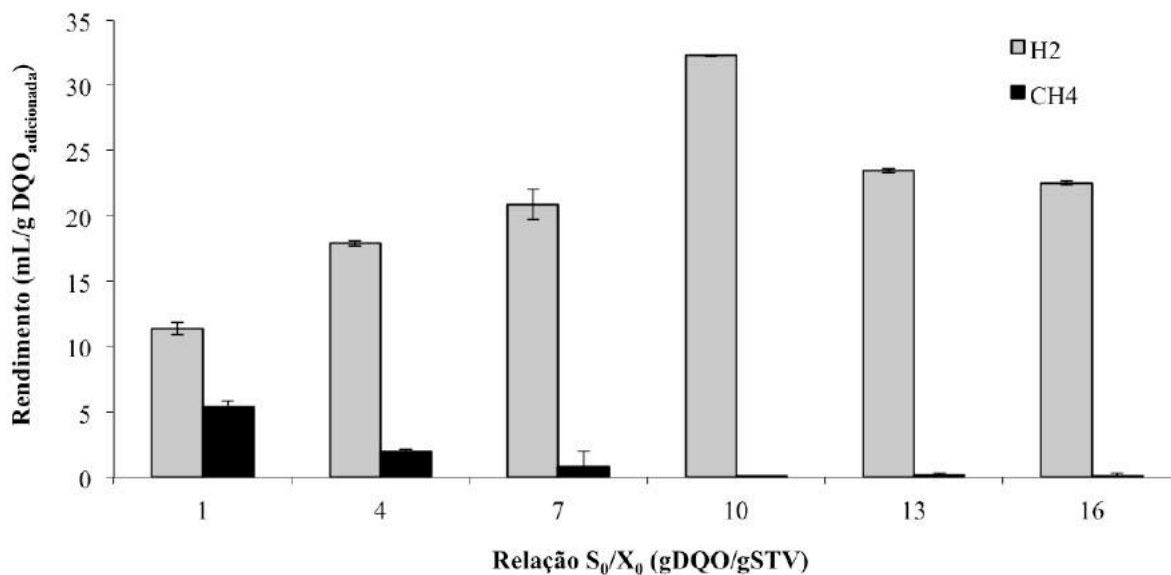
Figura 4.2 – Produção acumulada de hidrogênio em cada relação S_0/X_0 em função do tempo de teste. As barras verticais representam o desvio padrão das médias.



Nesta pesquisa, o maior rendimento de H_2 alcançado foi 32 mL H_2 /gDQO_{adicionada} (28 mL H_2 /gDQO_{adicionada} sob condições normais de temperatura e pressão – CTNP) e aconteceu quando o lodo foi submetido a uma relação S_0/X_0 igual a 10 gDQO/gSTV (Figura 4.3). Esse rendimento foi superior ao alcançado por Vlassis et al. (2012) ao testarem diferentes valores de relação S_0/X_0 em frascos alimentados com glicerol puro. Estes pesquisadores, igualmente, utilizaram lodo proveniente de estação de tratamento de esgoto doméstico como inóculo, porém pré-tratado termicamente, e produziram 26 mL H_2 /gDQO_{adicionada} (23 mL H_2 -CNTP/gDQO_{adicionada}) a uma relação S_0/X_0 de 4,2 gDQO/gSTV. Seifert et al. (2009), da mesma forma, verificaram a influência da relação S_0/X_0 no rendimento de H_2 a partir de glicerol, utilizando inóculo com características semelhantes às do presente experimento. Foi obtido um rendimento máximo de 111 mL H_2 /gDQO_{adicionada} (98 mL H_2 -CNTP/gDQO_{adicionada}) quando a relação S_0/X_0 era de 10 gDQO/gSTV (Seifert et al., 2009). Duas hipóteses podem justificar os maiores rendimentos encontrados nesse último trabalho, a saber: i) eficácia do pré-tratamento do inóculo, pois o choque térmico (calor úmido seguido de congelamento) a que o lodo foi submetido pode ter sido bastante eficiente na seleção de bactérias produtoras de hidrogênio, como já comprovado por outros pesquisadores (HU; CHEN, 2007; ROSSI et al., 2011); ii) uso de glicerol puro em lugar de residual, o que pode reduzir a possibilidade de inibição

bacteriana pela presença de compostos tóxicos, por exemplo, de sais e graxas (VIANA et al., 2012a).

Figura 4.3 – Rendimentos de hidrogênio e metano alcançados para cada relação S_0/X_0 .



Quando o glicerol é a única fonte de carbono para os micro-organismos, o rendimento máximo teórico de hidrogênio é igual a 1 mol H_2 /mol glicerol. Logo, bioquimicamente, a 37°C é possível se produzir 276 mL H_2 por grama de DQO adicionada (243 mL H_2 -CNTP/gDQO_{adicionada}). Isso significa que, neste experimento, foi possível chegar a 12% do rendimento máximo teórico, enquanto esse percentual foi de 9% e 40% para os trabalhos de Vlassis et al. (2012) e Seifert et al. (2009), respectivamente. O rendimento elevado alcançado por Seifert et al. (2009) pode ser atribuído ao pH do meio que ficou dentro da faixa ótima para produção de hidrogênio (em média 5,2 ao final do teste) e abaixo da faixa de produção de 1,3-PPD (entre 6,0 e 7,5), que reduziria o rendimento de H_2 .

São poucos os estudos que estudaram o efeito da relação S_0/X_0 na produção biológica de H_2 a partir de glicerol. Incluindo os resultados obtidos no presente trabalho, é possível observar que os maiores rendimentos foram alcançados com valor de relação S_0/X_0 acima de 4 gDQO/gSTV (SEIFERT et al., 2009; VLASSIS et al., 2012). Por outro lado, a maior parte dos experimentos que utilizaram outras fontes de matéria orgânica alcançou o rendimento máximo utilizando S_0/X_0 abaixo de 4 gDQO/gSTV. Argun et al. (2008) avaliaram a influência da concentração de substrato (pó de trigo) e inóculo nos frascos e encontraram que os maiores

rendimentos ocorreram em S_0/X_0 próxima a 3,0 gDQO/gSTV. Nasr et al. (2011) testaram diversas relações S_0/X_0 utilizando efluente à base de glicose e alcançaram rendimento máximo em S_0/X_0 de 4 gDQO/gSTV utilizando inóculo pré-aclimatado. Ao utilizarem inóculo não aclimatado, o maior rendimento obtido pelos mesmos pesquisadores ocorreu em uma relação S_0/X_0 de 2 gDQO/gSTV. Fan e Chen (2004) utilizaram resíduo de fermentado de cervejaria desidratado como substrato para produção biológica de H_2 e concluíram que foi necessário se aplicar S_0/X_0 igual a 4 gDQO/gSTV para se chegar ao maior rendimento de H_2 .

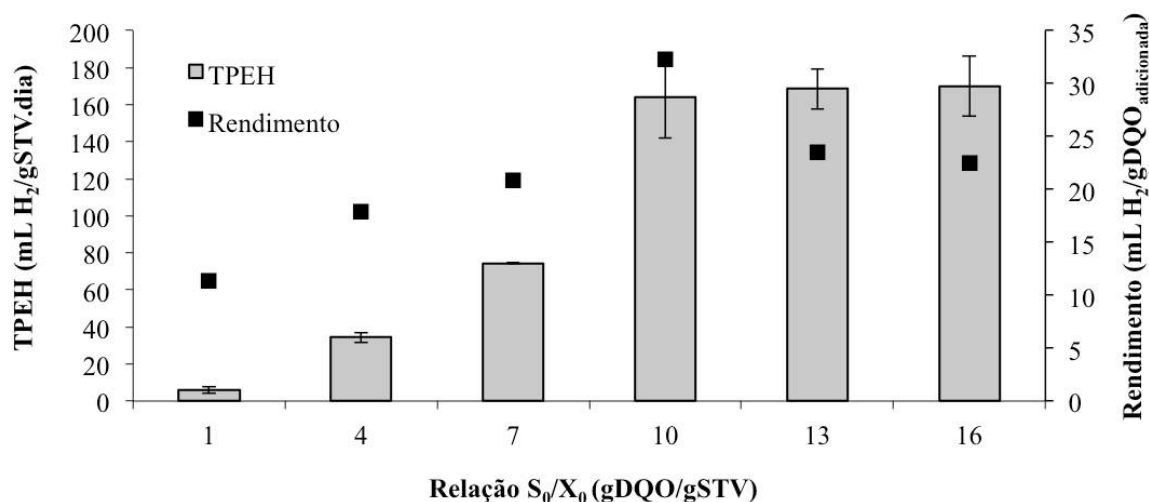
O uso de valores elevados da relação S_0/X_0 mostra a possibilidade de um sistema ser operado com maior quantidade de matéria orgânica utilizando uma mesma quantidade de lodo, podendo reduzir custos relacionados com estrutura do reator (redução do volume) ou com diluição do afluente.

4.3.2 Taxa de produção específica de hidrogênio (TPEH)

As taxas de produção específicas de hidrogênio (TPEH) obtidas para cada relação S_0/X_0 testada podem ser visualizadas na Figura 4.4. Os resultados mostraram ter a TPEH aumentada com o incremento da relação S_0/X_0 até 10 gDQO/gSTV, sem alterações significativas entre 10 e 16 gDQO/gSTV ($p < 0,05$), atingindo um valor máximo entre 164 e 170 mL H_2 /[gSTV.d] (144 e 150 mL H_2 -CNTP/[gSTV.d]), o equivalente a 0,117 e 0,121 gDQO $_{H_2}$ /[gSTV.d] (0,103 e 0,107 gDQO $_{H_2}$ -CNTP/[gSTV.d]). Ao contrário dos resultados obtidos por Argun et al. (2008), Hafez et al. (2010) e Nasr et al. (2011), os resultados deste trabalho mostraram não ter havido redução do valor da TPEH com a queda do rendimento de H_2 . Esse fenômeno também foi observado em outros trabalhos (LEE et al., 2007), quando da avaliação do efeito do aumento da COV na eficiência de um CSTR na conversão de glicose a H_2 . Nessa última pesquisa, foi observado que o rendimento caiu de 1,36 para 1,05 mol H_2 /mol glicose, ao elevarem a COV de 40 para 120 kg DQO/m³.d. A TPEH, em contrapartida, aumentou de 2184 para 4752 mL H_2 /[gSTV.d].

Os resultados mostrados anteriormente indicam que a capacidade do lodo em converter matéria orgânica em H_2 em um determinado espaço de tempo não é afetada em condições de sobrecarga orgânica. Ações sinérgicas e relações de simbiose e simbioses, bastante típicas em culturas mistas, podem ter prevalecido sobre o efeito da maior concentração de substrato em relação à de micro-organismos (SONG et al., 2012).

Figura 4.4 – Taxas de produção específica (TPEH) e rendimento de hidrogênio obtidos para cada relação S_0/X_0 testada.



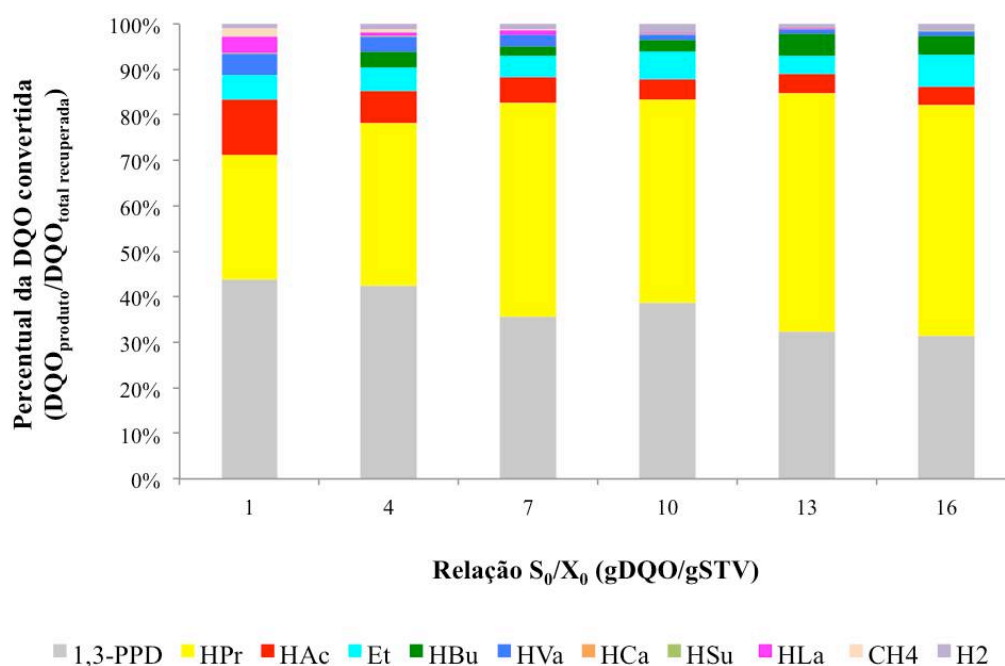
O valor máximo da TPEH obtido nesta pesquisa foi semelhante ao alcançado por Nasr et al. (2011) ao utilizarem lodo metanogênico submetido a diferentes relações S_0/X_0 , de 181 mL H_2 /[gSTV.d] (159 mL H_2 -CNTP/[gSTV.d]), todavia, sob relação S_0/X_0 inferior (4,0 gDQO/gSTV). No entanto, os mesmos autores observaram que a TPEH pode aumentar para 585 mL H_2 /[gSTV.d] (515 mL H_2 -CNTP/[gSTV.d]) com a utilização de lodo aclimatado à produção de H_2 trabalhando a 6,0 gDQO/gSTV. Argun et al. (2008) alcançaram 386 mL H_2 /[gSTV.d] (340 mL H_2 -CNTP/[gSTV.d]) ao testarem diversas relações S_0/X_0 , utilizando trigo em pó com 97% de amido, em uma razão equivalente a 2,8 gDQO/gSTV. Acima desse valor, a TPEH caiu para 235 mL H_2 /[gSTV.d] (207 mL H_2 -CNTP/[gSTV.d]). Hafez et al. (2010), operando um CSTR de 5 L, conseguiram alcançar valores entre 2300 e 2400 mL H_2 /[gSTV.d] (relação S_0/X_0 média de 6,3 gDQO/gSTV), mostrando que sistemas operados em fluxo contínuo incrementam a atividade bacteriana, seja por causa da aclimatação do lodo (NASR et al., 2011), seja pela saída contínua de gás do sistema, que reduz a pH_2 , fator limitante nesse bioprocessamento (HALLENBECK, 2009).

4.3.3 Consumo de glicerol, produção de metabólitos solúveis e balanço de massa

Durante todos os ensaios, praticamente todo o glicerol foi consumido, independentemente da relação S_0/X_0 aplicada (Tabela 4.3). Isso se deu devido à alta biodegradabilidade do glicerol residual (VIANA et al., 2012b). A concentração final de metabólitos solúveis mostrados na Tabela 4.3 e distribuição dos produtos convertidos

ilustrados na Figura 4.5 evidenciaram que 1,3-PPD e ácido propiônico predominaram sobre os outros metabólitos. Isso não era esperado, pois, de acordo com Biebl (2001), Biebl et al. (1999) e Zeng et al. (1993), os metabólitos predominantes na produção de H₂ são etanol, ácido acético e principalmente o ácido butírico (SEIFERT et al., 2009). Elevados rendimentos de 1,3-PPD estão associados à uma baixa produção de H₂, pois são formados por rotas metabólicas concorrentes, além de consumir 1 mol de H₂ para o sucesso da reação (SELEMBO et al., 2009). Apesar disso, diversos relatos mostram que o rendimento máximo de H₂ a partir de glicerol foram alcançados quando o 1,3-PPD foi o metabólito solúvel de maior concentração, pelo menos em testes em batelada sem controle de pH (ITO et al., 2005; SEIFERT et al., 2009; VLASSIS et al., 2012). No presente experimento, o rendimento máximo de H₂ foi alcançado quando o rendimento de 1,3-PPD alcançou 43% da massa de DQO inicial, valor semelhante aos encontrados por Ito et al. (2005), Vlassis et al. (2012) e Seifert et al. (2009), que alcançaram rendimento máximo de H₂ quando o rendimento de 1,3-PPD foi 34%, 54% e 44%, respectivamente.

Figura 4.5 – Distribuição dos produtos convertidos para cada relação S₀/X₀ testada.



Notas: HAc, HPr, HBu, HVa, HCa, HSu, HLa representam os ácidos acético, propiônico, butírico, valérico, caproico, succínico e lático, respectivamente; 1,3-PPD, Et, CH₄ e H₂ representam o 1,3-propanodiol, etanol, metano e hidrogênio, respectivamente.

No presente experimento, as elevadas concentrações de 1,3-PPD são atribuídas ao pH do meio, que se manteve dentro da faixa ótima para a síntese deste diol (entre 6,0 e 7,5), como já fora descrito no item 4.1. O 1,3-PPD pode ser utilizado como monômero para síntese de plásticos, durante a aplicação nas reações de síntese de poliuretanos, poliésteres e poliéteres (BIEBL et al., 1992).

As elevadas concentrações de ácido propiônico dissolvido (Tabela 4.3) também indicam desvio de rota metabólica. Isso ocorre quando o fosfoenolpiruvato é transformado em succinato e depois a propionato, antes mesmo de ser convertido a piruvato. Com isso, não há formação de piruvato, rota que daria origem ao H₂ (YAZDANI; GONZALEZ, 2007). Como já foi mencionado, a pressão parcial de hidrogênio contribuiu para o acúmulo de ácido propiônico, posto ser sabido que elevadas concentrações de hidrogênio dissolvido tornam a rota do succinato-propionato termodinamicamente mais favorável do que a rota do piruvato-formiato (MIZUNO et al., 2000). O acúmulo de ácido propiônico tem sido relatado principalmente em casos de choque de carga, sobrecarga orgânica ou até mesmo na etapa de partida (COHEN et al., 1980; KENNEDY; VAN DEN BERG, 1982).

O balanço de massa realizado a partir das concentrações de matéria orgânica inicial e dos produtos formados, em termos de DQO é apresentado na Tabela 4.4. Observa-se que a DQO recuperada ficou próxima de 100% na maioria dos casos, com erros variando entre 2% e 23%. Esse valor de erro pode ser atribuído à algumas variáveis, tais como taxa de crescimento celular, acúmulo de matéria orgânica na forma de biopolímeros intracelulares, produtos microbianos solúveis (SMPs), perdas de metabólitos por evaporação (sobretudo, álcoois e ácidos graxos de cadeia mais curta), dissolução de gases que não foi levada em conta, além da imprecisão analítica de alguns dos métodos empregados, podem ter contribuído para os erros encontrados. Ainda pode ter contribuído aceptores alternativos de elétrons como o sulfato, o qual estava presente no meio basal.

Tabela 4.4 – Balanço de massa realizado a partir das concentrações de matéria orgânica inicial e dos produtos formados, em termos de DQO. Os valores seguidos de \pm representam o desvio padrão da média.

S_0/X_0^a	Produto formado (g DQO) ^b										Total (gDQO) ^e	DQO rec. ^f
	HAc	HPr	HBu	HVa	HSu	HLa	1,3-PPD	Et	H ₂ ^c	CH ₄ ^d		
1	0,30±0,07	0,68±0,16	0,00±0,00	0,11±0,08	0,00±0,01	0,09±0,01	1,08±0,27	0,13±0,02	0,02±0,01	0,04±0,00	2,46	77%
4	0,20±0,04	1,01±1,12	0,09±0,02	0,09±0,03	0,01±0,01	0,02±0,01	1,20±0,21	0,15±0,01	0,04±0,00	0,02±0,00	2,83	88%
7	0,21±0,04	1,70±1,03	0,07±0,05	0,09±0,06	0,00±0,00	0,03±0,03	1,29±0,23	0,17±0,02	0,04±0,00	0,01±0,00	3,61	113%
10	0,16±0,12	1,58±1,10	0,09±0,12	0,04±0,04	0,00±0,01	0,01±0,01	1,37±0,13	0,21±0,07	0,06±0,01	0,00±0,00	3,54	111%
13	0,20±0,03	2,55±0,19	0,23±0,03	0,05±0,06	0,00±0,01	0,00±0,01	1,58±0,12	0,20±0,04	0,05±0,00	0,00±0,00	4,87	152%
16	0,12±0,04	1,59±0,60	0,13±0,12	0,03±0,02	0,01±0,01	0,00±0,00	0,98±0,37	0,22±0,12	0,05±0,00	0,00±0,00	3,12	98%

Notas: ^a relação substrato/micro-organismo, em gDQO/gSTV; ^b $[MS] \times V_u \times f$, onde $[MS]$, V_u e f são a concentração do metabólito solúvel, o volume útil e o fator de conversão g DQO_{teórica}/g metabólito, respectivamente. f é calculada pela seguinte equação, descrita em Lettinga, Hulshof Pol e Zeeman (1999): $\frac{8 \times (4X+Y-2Z)}{12X+Y+16Z}$, onde X, Y e Z são os números de carbono, hidrogênio e oxigênio da molécula, respectivamente; ^c 1,590 L H₂/gDQO_{removida}, a 37°C; ^d 0,398 L CH₄/gDQO_{removida}, a 37°C; ^e Σ produtos formados; ^f percentual de DQO recuperada, calculada através da seguinte equação: $\frac{\Sigma \text{ produtos formados}}{(S_0 \times V_u)} \times 100$, onde S_0 é a concentração de matéria orgânica inicial (expressa em DQO).

4.4 Conclusões

Neste trabalho, o glicerol residual foi utilizado como única fonte de matéria orgânica para avaliar o efeito da relação S_0/X_0 na produção de hidrogênio, metano e metabólitos solúveis. Os resultados obtidos permitiram concluir que o rendimento e a taxa de produção específica de hidrogênio (TPEH) é maior à medida em que se aplica maiores valores de S_0/X_0 . O rendimento máximo (32 mL H_2 /gDQO_{adicionada} ou 28 mL H_2 -CNTP/gDQO_{adicionada}) foi alcançado a 10 gDQO/gSTV. Acima desse valor, a produção de hidrogênio é inibida mas a TPEH se mantém constante (em média 167 mL H_2 /[gSTV.d] ou 147 mL H_2 -CNTP/[gSTV.d]). Considerando que cada grama de H_2 possui uma DQO de 8g de O_2 , a TPEH máxima alcançada equivale a 0,119 gDQO _{H_2} /[gSTV.d] (0,105 gDQO _{H_2 -CNTP}/[gSTV.d]), valor inferior ao obtido em pesquisa onde o objetivo foi a produção de metano a partir de glicerol, que foi de 0,990 gDQO _{CH_4} /[gSTV.d] (0,878 gDQO _{CH_4 -CNTP}/[gSTV.d]) (VIANA et al., 2012b). Já a produção de metano alcançado no presente experimento foi praticamente nula ao aplicar valor de relação S_0/X_0 maior que 1 gDQO/gSTV. Durante os ensaios, todo o glicerol foi consumido, sendo convertido principalmente a 1,3-PPD e ácido propiônico, independentemente da relação S_0/X_0 . Os resultados alcançados no presente experimento servirão de suporte para que pesquisas futuras não enfrentem problemas de sobrecarga orgânica na produção de H_2 a partir de glicerol. Além disso, outros pesquisadores saberão qual o impacto da relação S_0/X_0 na produção de metabólitos.

5 PRODUÇÃO DE METANO E HIDROGÊNIO A PARTIR DE GLICEROL RESIDUAL USANDO UM PROCESSO ANAERÓBIO DE DUAS FASES

5.1 Introdução

Diversos países têm incluído o biodiesel na sua matriz energética em substituição ao óleo diesel. No Brasil, a Lei Nº 13.033/14 obriga os produtores de óleo diesel a adicionarem 7% de biodiesel à mistura (BRASIL, 2014). Já em outros países, como nos EUA, esse percentual pode chegar a 20% (TAM, 2004).

A cada 10 kg de biodiesel produzido, gera-se 1 kg de glicerol como subproduto (glicerol residual). O glicerol puro possui diversas aplicações industriais, mas o glicerol residual precisa passar por processo de purificação para remoção das impurezas, de modo a ter viabilidade de uso. Segundo dados de produção de biodiesel da Organização para Desenvolvimento e Cooperação Econômica (OECD) e da Organização de Agricultura e Alimentos das Nações Unidas (FAO), estima-se que 3.200.000 toneladas de glicerol residual foram geradas em 2015 em todo o mundo, com previsão de aumento para 3.860.000 toneladas em 2024 (OECD/FAO, 2015). A demanda mundial por glicerol é estimada em 2.000.000 de toneladas (CIRIMINNA et al., 2014). Isso significa que a oferta por glicerol residual já excede a demanda atual, fazendo que esse subproduto torne-se, em breve, um passivo ambiental se novos usos não forem encontrados, inviabilizando, portanto, a produção de biodiesel.

Diversos pesquisadores têm estudado a síntese biológica de produtos de valor agregado a partir de glicerol (DA SILVA; MACK; CONTIERO, 2009), incluindo o hidrogênio (SARMA et al., 2012b; VIANA et al., 2014b). Entretanto, o rendimento máximo teórico de hidrogênio a partir de glicerol é de apenas 1 mol H₂/mol glicerol (ZENG, 1996), valor considerado baixo quando comparado a outros substratos (o rendimento a partir da glicose é de 4 mol/mol). Usando os dados de previsão de consumo de mundial de H₂ para 2020 (BOND et al., 2011), estimado em $4,5 \times 10^{13}$ mol (excluindo refinação de petróleo), o glicerol residual tem um potencial para fornecer apenas 0,1% da demanda mundial, mesmo havendo uma conversão completa de glicerol a H₂. O uso de um sistema de reatores em duas fases, operados em série, poderia aumentar o aproveitamento energético, pois, além do H₂

gerado a partir do glicerol, o seu efluente rico em ácidos orgânicos poderia ser convertido em CH₄ em outro reator.

Se forem aplicados em escala real, o H₂ e o CH₄ produzidos pelos reatores anaeróbios poderão servir de fonte de energia para a própria usina de biodiesel ou comunidades adjacentes. Além do aproveitamento energético, Ke, Shi e Fang (2005) citam outras vantagens da digestão anaeróbia em duas fases: i) isolamento das etapas limitantes (hidrólise e acidogênese na primeira fase e metanogênese na segunda); ii) melhora da cinética de reação devido ao controle das condições ambientais ideais de cada fase; iii) aumento da resistência à toxicidade metanogênica, posto serem as bactérias acidogênicas mais resistentes a compostos potencialmente tóxicos. Por outro lado, esse sistema apresenta algumas desvantagens, tais como, redução das relações sintróficas, maior complexidade de operação e aumento dos gastos com construção dos reatores (KE; SHI; FANG, 2005).

As vantagens do uso do H₂ na produção de energia está associado ao seu potencial energético (122 kJ/g) e ao subproduto da sua combustão, a água. Apesar das vantagens do processo, existe apenas um registro científico sobre o uso de reatores operados em série para produção desses gases a partir de glicerol como única fonte de carbono (DOUNAVIS et al., 2016). Não há nenhum estudo utilizando reatores do tipo UASB (*upflow anaerobic sludge blanket*) para esse fim. Esses reatores possuem a vantagem de suportar elevada carga orgânica volumétrica (COV), mantendo uma alta concentração de lodo no interior do sistema. Isso se reflete na possibilidade de tratar maior quantidade de glicerol residual por volume de reator.

Elevadas COVs favorecem o aumento do rendimento de H₂, pois tanto podem aumentar a atividade das bactérias produtoras de H₂, como inibir as *archaeas* metanogênicas consumidoras de H₂ (AMORIM; SADER; SILVA, 2012). Dounavis, Ntaikou e Lyberatos (2015) já haviam observado que o aumento da COV de 9 para 30 kg de demanda química de oxigênio (DQO)/m³.d elevou o rendimento de H₂ a partir de glicerol residual. Por outro lado, COV acima do limite pode inibir o processo, seja por desvio de rota metabólica, limitação cinética causado pelo excesso de substrato (ANDREWS, 1968; BEKINS, B; WARREN; GODSY, 1998), acúmulo de metabólitos no meio (KRAEMER; BAGLEY, 2007) e consequente reesporulação dos micro-organismos produtores de H₂ (HAFEZ et al., 2010); seja pela presença de inibidores, tais como, íons Na⁺ e Cl⁻, presentes no glicerol residual (VIANA et al., 2012a).

A pressão parcial de H_2 (p_{H_2}) também influencia no rendimento (MIZUNO et al., 2000). Para a reação de produção de H_2 ser termodinamicamente favorável, a p_{H_2} deve ficar abaixo de 0,3 atm (ANGENENT et al., 2004). Se a p_{H_2} é suficientemente baixa, o NADH e a ferredoxina reduzida podem ser oxidadas pela hidrogenase (HAWKES et al., 2007). No caso de reatores de fluxo contínuo, o aumento da p_{H_2} está diretamente relacionado ao aumento da COV, pois quanto maior a quantidade de matéria orgânica afluenta, maior a quantidade de H_2 produzido e maior a p_{H_2} .

Não existe um consenso sobre qual COV proporciona um maior rendimento de H_2 (KRAEMER; BAGLEY, 2007), sendo necessário estudar caso a caso qual a COV mais adequada, levando-se em consideração algumas variáveis do processo, a saber: o rendimento e a produção volumétrica de hidrogênio (quantidade de hidrogênio produzida por volume de reator em um determinado intervalo de tempo).

A digestão anaeróbia de glicerol pode ocorrer via rota metabólica redutiva ou oxidativa. O H_2 é produzido somente pela rota oxidativa, na qual o glicerol é convertido a dihidroxiacetona pela enzima glicerol dehidrogenase (GDH) e, depois, fosforilado pela dihidroxiacetone kinase. Na etapa seguinte, a dihidroxiacetona é convertida a piruvato (somente por anaeróbios estritos) e depois a acetil-CoA ou formiato pela enzima hidrogenase. O formiato, por sua vez, é convertido a H_2 e CO_2 (KUBIAK et al., 2012). Se a reação é desviada para formação de acetil-CoA, enzimas agem na produção dos metabólitos finais, que dependerá da espécie do micro-organismo e das condições ambientais. Se a fermentação anaeróbia continua, o metano é formado a partir de acetato e H_2/CO_2 , por *archaeas* metanogênicas acetoclásticas e hidrogenotróficas, respectivamente.

A rota redutiva é metabolicamente concorrente à formação de H_2 , pois o glicerol é primeiramente desidratado a 3-hidroxi propionaldeído por GDH e, então, convertido a 1,3-propanodiol (1,3-PPD) pela 1,3-propanodiol oxidoreductase. Logo, elevados rendimentos de 1,3-PPD podem estar associados à baixa ou nenhuma produção de H_2 , porque o estado reduzido de carbono no glicerol é menor do que na biomassa, gerando uma maior quantidade de $NADH_2$ para formação de biomassa quando o glicerol está em maiores concentrações. Esse $NADH_2$, por sua vez, é usado na conversão de glicerol a 1,3-PPD (YAZDANI; GONZALEZ, 2007), consumindo 1 mol de H_2 para cada mol de 1,3-PPD (SELEMBO et al., 2009).

Alguns fatores podem influenciar no rendimento, tais como: características físico-químicas do glicerol residual, a espécie do micro-organismo (no caso do uso de culturas

puras) ou a fonte de inóculo (no caso de culturas mistas), regime de alimentação (batelada, contínuo ou semicontínuo), configuração do reator, concentração de glicerol e de nutrientes, temperatura, pH, dentre outros. A Tabela 5.1 mostra as condições operacionais e o rendimento máximo obtido por diferentes pesquisadores que utilizaram glicerol como substrato para produção de H_2 .

Além dos problemas de inibição mencionados anteriormente, alguns autores têm relatado que o glicerol residual tem causado flotação de lodo e sua consequente lavagem do sistema (*washout*) (HUTŇAN et al., 2013; VIANA et al., 2014a). A fim de solucionar esse problema, Hutnan et al. (2013) reinocularam um reator do tipo UASB com lodo granular, durante tratamento anaeróbio de glicerol residual, para produção de metano. Entretanto, testes preliminares comprovaram não ser o lodo granular um bom produtor de hidrogênio (ver capítulo 2 desta tese). Além disso, os micro-organismos metanogênicos, localizados na camada mais interna do grânulo (GUIOT; PAUSS; COSTERTON, 1992), não sobreviveriam às condições ácidas da produção de H_2 , o que poderia torná-lo oco e menos denso, aumentando as chances de uma nova flotação. Para completar, se as condições ótimas para granulação não forem mantidas, o lodo granular pode se tornar floculento e o problema de flotação retornar (KALYUZHNYI et al., 1999). Dessa forma, o uso de reatores de crescimento aderido parece ser a estratégia mais adequada no aumento da retenção de lodo no sistema, durante a produção de hidrogênio a partir de glicerol (DOUNAVIS; NTAIKOU; LYBERATOS, 2015; ITO et al., 2005).

Especificamente no caso do reator acidogênico produtor de hidrogênio, algumas estratégias devem ser adotadas para evitar o consumo de H_2 , por exemplo, pré-tratamento do inóculo, aplicando técnicas físicas e químicas favorecedoras da inibição ou morte das *archaeas* metanogênicas (ROSSI et al., 2011), ou adição de compostos químicos que inibem a atividade dos micro-organismos consumidores de H_2 no interior do reator, como o clorofórmio (NING et al., 2012).

Tabela 5.1 - Condições operacionais e rendimento máximo de H₂ obtido por diversos autores que utilizaram glicerol como substrato para produção de H₂.

Ref.	Reator	Inóculo	Temp ^a	pH _{inicial}	[DQO] ^b	S ₀ /X ₀ ^c ou COV ^d	Y _{H₂} ^e
1	RBEB*	Lodo de reator de leito fixo produtor de H ₂ a partir de sacarose	25	5,5	0,3	-	1,62
2	RBEB	<i>Thermotoga neapolitana</i>	75	6,8	5,0	-	1,42
3	RBEB	<i>Enterobacter aerogenes</i>	37	6,8	0,72 ^f	-	1,12
4	RBEB	<i>Clostridium pasteurianum</i>	35	7,5	10,0	-	1,11
5	RBEB	Lodos ativados	40	6,5	1,0	-	1,10
6	RBEB	Lodos ativados	38	8,0	15,0	-	0,95
7	RBEB	Lodos ativados	38	8,0	15,0	1,3	0,90
5	CSTR**	<i>Clostridium pasteurianum</i>	35	7,5	10,0	-	0,77
8	Reator anaeróbio de leito fixo e fluxo ascendente**	Lodo anaeróbio tratando esgoto doméstico pré-tratado termicamente	35	6,0	25,0	29,7	0,42
9	RBEB	Cultura mista extraída de solo de plantio de trigo	30	7,0	3,0	-	0,31
10	RBEB	Lodo anaeróbio de cervejaria pré-tratado termicamente	35	5,5	22,2	5,2	0,30
11	RBEB	Cultura mista de sedimentos de fonte termal	55	5,5	20,3	5,4	0,30
12	RBEB	<i>Klebsiella pneumonia</i>	40	8,0	20,0	-	0,25
13	RBEB	Lodo anaeróbio tratando esgoto doméstico pré-tratado termicamente	35	6,5	8,3	11,3	0,07

¹ Fernandes et al. (2010); ² Ngo, Kim e Sim (2011); ³ Ito et al. (2005); ⁴ Lo et al. (2013); ⁵ Mangayil, Karp e Santala (2012); ⁶ Varrone et al. (2012); ⁷ Varrone et al. (2013); ⁸ Dounavis; Ntaikou e Lyberatos (2015); ⁹ Selembo et al. (2009); ¹⁰ Sittijunda e Reungsang (2012a); ¹¹ Sittijunda e Reungsang (2012b); ¹² Chookaew, O-Thong e Prasertsan (2012); ¹³ Vlassis et al. (2012); ^a temperatura, em °C; ^b DQO inicial, em gDQO/L; ^c relação inicial substrato/micro-organismo, em gDQO/gSTV, apenas para testes em batelada; ^d carga orgânica volumétrica, em kgDQO/m³.d, apenas para testes em fluxo contínuo; ^e rendimento, em mol H₂/mol glicerol adicionado; ^f concentração de matéria orgânica, em termos de carbono orgânico total (COT). * reator em batelada em escala de bancada; ** reatores operados em fluxo contínuo.

Os objetivos deste trabalho foram: i) determinar as variáveis operacionais de um reator UASB, de maneira a chegar ao máximo rendimento de H₂ a partir de glicerol residual; ii) avaliar o clorofórmio como inibidor da atividade metanogênica; iii) avaliar a eficiência do meio suporte na retenção de lodo durante a produção de H₂; iv) conhecer os principais metabólitos formados durante a produção biológica de H₂ a partir de glicerol residual; v) determinar as variáveis operacionais de um reator UASB para chegar aos máximos valores de produção específica de metano – PEM (em m³CH₄/kgDQO) e produção volumétrica de metano – PVM (em L CH₄/L reator.d) a partir da digestão anaeróbia do efluente do reator produtor de H₂; ix) avaliar a melhor opção para digestão anaeróbia de glicerol residual, comparando a energia produzida pelo sistema de duas fases (H₂ e CH₄) a um sistema único (apenas CH₄).

5.2 Material e métodos

5.2.1 Glicerol

Dois tipos de glicerol foram utilizados nesta pesquisa: residual e comercial. O glicerol residual foi fornecido pela usina de biodiesel da empresa Petróleo Brasileiro S.A. – Petrobrás, na unidade denominada UBQ (Usina de Biodiesel de Quixadá), localizada no município de Quixadá, Ceará. Esse glicerol foi gerado no processo de produção de biodiesel a partir de uma mistura de óleo de soja (56%) e sebo bovino (44%). O glicerol residual possuía concentração de matéria orgânica equivalente a 1374 gDQO/L. As características físico-químicas do glicerol eram: matéria orgânica não glicerídea (MONG) 1%; pH 5,5; pureza 81,5%; cinzas 4,8%; umidade 12,71%; metanol 0,03%; teor de NaCl 5,3%; densidade 1255,9 kg/m³. O glicerol comercial possuía 99,5% de pureza e concentração de matéria orgânica igual a 1418 gDQO/L.

5.2.2 Reatores UASB

Reator produtor de hidrogênio (RH)

Um reator produtor de hidrogênio (RH) do tipo UASB foi utilizado nesta pesquisa. Ele foi construído em vidro borossilicato, com diâmetro de 100 mm e altura total de 1,35 m. A operação do RH foi dividida em três etapas, onde cada operação se iniciava ao final da anterior. Na Etapa 1 (RH₁) e na Etapa 2 (RH₂), o volume útil do reator foi igual a 14,70 L.

Entretanto, na Etapa 3 (RH₃), foi necessário aumentar o volume do *headspace* (controlando a profundidade do selo hídrico), a fim de diminuir problemas de entupimento da saída do biogás, que fez o volume útil do reator diminuir para 13,08 L.

O RH₃ foi operado com meio suporte, que consistiu em pedaços de tubo PVC corrugado, com cerca de 10 mm e diâmetro de 16 mm, com área específica de 907 m²/m³ (Figura 5.1). O volume ocupado pelo meio suporte contribuiu, igualmente, para a redução do volume útil do reator produtor de H₂. Contudo, o elevado índice de vazios ainda permitia um elevado acúmulo de biomassa no sistema de tratamento.

Figura 5.1 – Pedaços de tubo PVC corrugado utilizados como meio suporte na Etapa 3 de operação de reator produtor de hidrogênio (RH₃).



A vazão afluyente foi controlada por uma bomba peristáltica da marca Gilson, modelo Minipuls 3. Uma bomba dosadora, fabricada pela Seko, modelo Tekna Evo, era responsável por promover a recirculação do efluente e manter a velocidade ascendente em aproximadamente 0,6 m/h. O pH foi monitorado *on-line*, por meio de um controlador automático (marca Hanna Instruments, modelo HI1006-3205), com sensor de pH acoplado à linha de recirculação do reator, programado para acionar uma bomba dosadora de NaOH

0,5% (v/v) (marca LMI Milton Roy, modelo P133-398TI) a cada vez que o pH do reator alcançava valores iguais ou inferiores a 5,3. Quando o pH ultrapassava esse valor, a bomba dosadora era automaticamente desligada.

Um gasômetro Ritter, modelo TG05/05, foi utilizado para medir o volume de biogás produzido. Antes que o biogás chegasse ao gasômetro, passava por um selo hídrico com a finalidade de controlar a pressão de gás no *headspace* do reator e visualizar a produção de gás pelo borbulhamento do biogás na água contida no recipiente. Na mangueira que conduzia o biogás do reator até o selo hídrico, foi instalado um ponto de coleta de amostra para determinação das concentrações de CH₄ e CO₂ no gás produzido.

Ao longo do corpo do reator, foram instaladas 8 torneiras (uma a cada 15 cm) para retirada de amostras do lodo. O esquema e a fotografia do RH utilizado em todas as etapas da pesquisa estão apresentados na Figura 5.2. O reator foi envolto em papel alumínio, de modo a evitar a fotoxidação e o crescimento de algas.

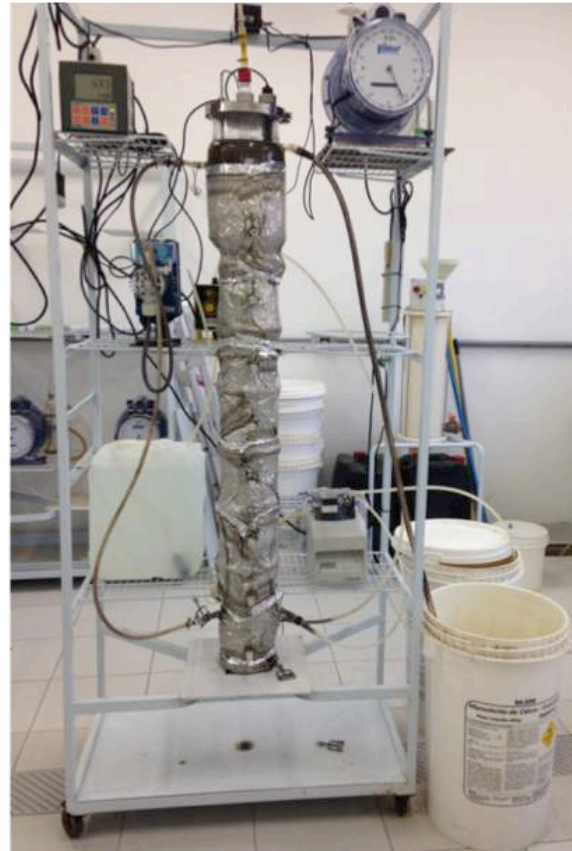
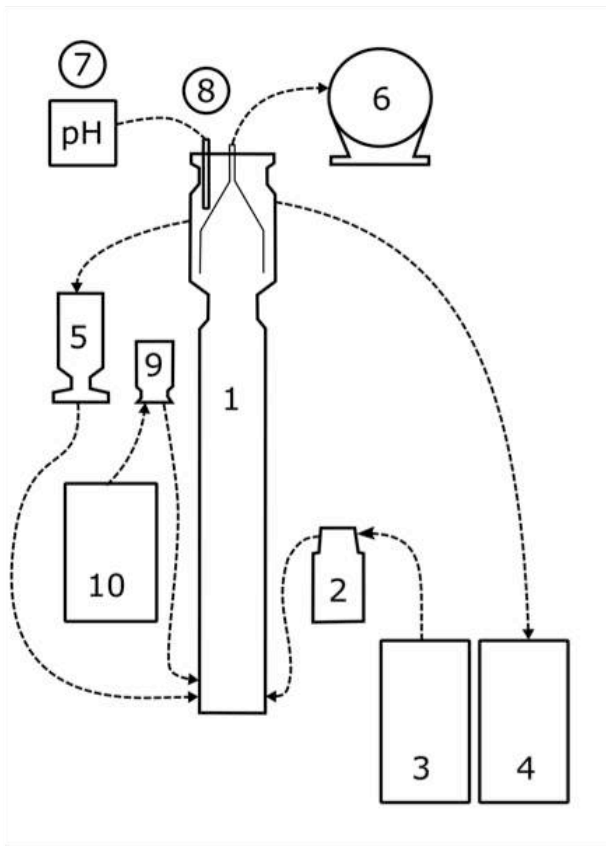
Reator produtor de metano

O reator produtor de metano (RM) foi construído em PVC, com configuração em “Y”, seguindo os procedimentos desenvolvidos por Cavalcanti (2003), com diâmetro de 100 mm altura total de 1,82 m e volume útil de 14,9 L. O RM possuía, também, oito torneiras para coleta de lodo. O sistema de transporte, coleta e quantificação de biogás produzido, bem como os aspectos relacionados à alimentação e recirculação do efluente eram os mesmos descritos para o RH. A Figura 5.3 ilustra o esquema e a fotografia do reator produtor de metano utilizado nesta pesquisa.

5.2.3 Inóculo

Em todas as etapas de operação, o RH foi inoculado com lodo proveniente de um reator UASB da Companhia de Águas e Esgoto do Ceará (Cagece), em escala plena, que possuía as seguintes características: concentração de sólidos voláteis (STV) de 59,1 g/L; atividade hidrogenogênica e metanogênica específicas (AHE e AME) de 0,24 L H₂/kgSTV.d e 0,83 kgDQO/kgSTV.d, respectivamente.

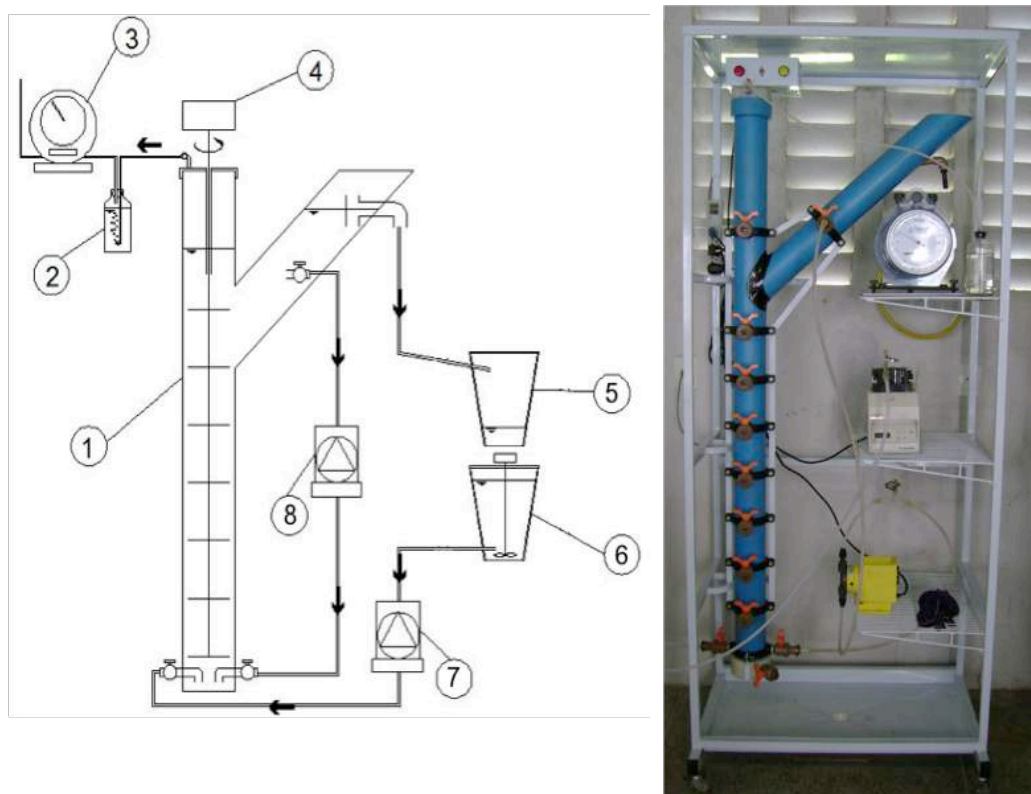
Figura 5.2 – Esquema e fotografia do reator produtor de hidrogênio utilizado em todas as etapas da pesquisa.



Legenda:

- | | |
|-------------------------------|-----------------------------------|
| 1) Reator UASB | 6) Gasômetro |
| 2) Bomba para afluente | 7) Controlador de pH |
| 3) Reservatório para afluente | 8) Sensor de pH |
| 4) Reservatório para efluente | 9) Bomba dosadora de NaOH (0,5%) |
| 5) Bomba para recirculação | 10) Reservatório para NaOH (0,5%) |

Figura 5.3 – Esquema e fotografia do reator produtor de metano utilizado nesta pesquisa.



Legenda:

- | | |
|-----------------------------------|-------------------------------|
| 1) Reator UASB | 5) Reservatório para efluente |
| 2) Selo hidráulico | 6) Reservatório para afluente |
| 3) Gasômetro | 7) Bomba para afluente |
| 4) Agitador rotativo lento (1rpm) | 8) Bomba para recirculação |

5.2.4 Partida e operação

Reatores produtores de hidrogênio (RHs)

Para a partida, os RHs foram preenchidos com 9 L do inóculo, resultando em uma massa de lodo igual a 531 gSTV. A Tabela 5.2 mostra o programa de operação dos RHs (parâmetros de partida), conforme cada etapa. Na primeira etapa, o RH foi alimentado com glicerol residual (RH₁), mas, após a expurga total de lodo do sistema, o reator foi reinoculado e alimentado com glicerol comercial (RH₂), a fim de eliminar qualquer possibilidade de inibição pelas impurezas contidas no glicerol residual. Mesmo sendo alimentado com glicerol comercial, houve uma nova flotação total de lodo, que acarretou em uma nova etapa de operação (RH₃), com o reator sendo inicialmente alimentado com glicerol comercial e

preenchido com meio suporte descrito no item 5.2.2. Entretanto, para verificar o efeito dessa mudança, todo o glicerol comercial foi substituído pelo glicerol residual no 150° dia de operação do RH₃ (Fase VI-b).

Tabela 5.2 – Programa de operação dos reatores produtores de hidrogênio (RHs) (parâmetros de partida)

Etapa	Tipo de glicerol	V _r ^a	[DQO] inicial afluente ^b	Q _{inicial} ^c	COV _{inicial} ^d	pH _{afluente}	t _{oper} ^e
RH ₁	glicerol residual	14,7	29,3	10	20	7	111
RH ₂	glicerol comercial	14,7	40,0	6,9	19	7	64
RH ₃	glicerol comercial e residual	13,1	40,0	1,6	5	12	380

^a volume útil do reator, em L; ^b concentração de matéria orgânica afluente, em gDQO/L; ^c vazão afluente, em L/d; ^d carga orgânica volumétrica (kgDQO/m³.d); ^e tempo de operação, em dias.

O programa de operação consistiu em aumentar gradativamente a COV, com o objetivo de tratar maior quantidade de glicerol por volume de reator. Na Etapa RH₁, a vazão foi fixada e aumentou-se a concentração de DQO afluente para elevar a COV. Para evitar problemas de inibição por excesso de substrato (ANDREWS, 1968; BEKINS, B; WARREN; GODSY, 1998), a concentração de DQO afluente nas etapas RH₂ e RH₃ foi fixada e aumentou-se gradativamente a vazão afluente para elevar a COV.

Buscando suprimir a atividade das *archaeas* metanogênicas e, assim, reduzir a partida do reator, foi adicionado clorofórmio a 0,05% (v/v) ao afluente do RH₃ (NING et al., 2012). Com isso, foi possível avaliar o seu efeito inibidor na atividade metanogênica. Para saber se houve inibição permanente das *archaeas* metanogênicas no RH₃, todo o clorofórmio foi retirado do afluente após o 234° dia de operação do RH₃ (Fase VII-b).

Em todas as etapas dos reatores produtores de H₂, foi adicionada uma solução de nutrientes adaptada de Lin e Lay (2005), que possuía a seguinte constituição (mg/L): MgCl₂·6H₂O (40,0); CoCl₂·6H₂O (5,0); CaCl₂·2H₂O (0,1); NiCl₂·6H₂O (2,5); MnCl₂·4H₂O (10,6); KCl (1,1); NH₄H₂PO₄ (107,5); ZnCl₂ (0,1); FeSO₄·7H₂O (5,0); MnSO₄·H₂O (0,3); CuSO₄·5H₂O (5,0); (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O (51,1).

Reator produtor de metano

O RM era alimentado com o efluente do RH₁ (rico em ácidos orgânicos e álcoois) diluído em água o suficiente para alcançar a concentração de matéria orgânica coerente com a COV desejada. O pH do afluente era corrigido para 7 com NaOH 50% (v/v). Inicialmente, foi adicionado bicarbonato de sódio ao afluente do RM a uma razão de 1 gNaHCO₃/gDQO, para tamponar o sistema, reduzindo gradualmente essa razão a cada vez que o reator mantinha o pH estável próximo ao neutro por 15 dias seguidos. Nenhuma suplementação de nutrientes foi feita ao afluente do RM, pois uma elevada carga de nutrientes saía junto ao efluente do RH₁, suficiente para suprir a necessidade dos micro-organismos metanogênicos.

5.2.5 Monitoramento dos reatores

As variáveis monitoradas, a frequência de análise e os métodos utilizados estão descritos na Tabela 5.3. A determinação da concentração de DQO afluente era realizada imediatamente após fazer o afluente para ajustar a COV ao valor desejado. A DQO do efluente (bruta e filtrada) era feita a partir de amostras coletadas durante 24 horas, buscando-se obter uma amostra composta e representativa e, igualmente, diminuir a variação da DQO afluente ao RM.

Para obter a DQO relativa à produção de lodo para determinação do tempo de retenção celular (TRC), foram realizadas amostras do efluente filtrado. Para tanto, considerou-se que a diferença entre a DQO total do efluente e a DQO do filtrada é a DQO relativa à massa de lodo expulsa do sistema (LEITÃO et al., 2009).

A fim de analisar a constituição do biogás, uma amostra era coletada no *headspace* do selo hídrico, por meio de uma seringa de cromatografia, e imediatamente injetada no cromatógrafo gasoso. Os gases H₂, CH₄, CO₂, N₂ e H₂S eram determinados por cromatógrafo gasoso (C2V-200 micro GC, Thermo Fisher Scientific, The Netherlands), equipado com um detector de condutividade térmica e uma coluna capilar de aço inoxidável (10 m x 0,5 mm). A temperatura do injetor, do forno e do detector foram 120, 60 e 120°C, na devida ordem. Os metabólitos solúveis foram determinados por análises de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC), utilizando um cromatógrafo da marca Shimadzu, equipado com uma coluna C₁₈ Shimpack CLC-ODS Column (150 mm x 4,6 mm) e a detecção foi realizada por um detector de arranjos de diodos (DAD). A fase móvel era composta de ácido

fosfórico/acetonitrila, a vazão da corrida era de 0,4 mL/min, e a temperatura, de 25°C. O pH, a concentração de sólidos totais voláteis e a demanda química de oxigênio foram determinadas seguindo os procedimentos descritos em *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2005).

Tabela 5.3 – Variáveis monitoradas, frequência de análise e os métodos utilizados no monitoramento dos reatores.

Variável	Frequência		Método
	RH	RM	
Vazão afluyente	diária	diária	Relação volume/tempo
Volume de gás	diária	diária	Gasometria
Composição de gás	2x semana	Final da operação	Cromatografia gasosa
pH	diária	diária	Potenciometria
DQO afluyente e efluente	2 x semana	3 x semana	Titulometria
Metabólitos	-	2 x semana	Cromatografia líquida de alta eficiência
Alcalinidade total e à bicarbonato	2 x semana	-	Titulometria
Cloretos	Início de cada etapa		Titulometria
Série de sólidos	Início de cada etapa		Gravimetria

Nota: RH = reator produtor de hidrogênio; RM = reator produtor de metano.

As amostras para determinação de pH, alcalinidade e AGV's eram coletadas antes do procedimento, de maneira a não haver modificação do valor dessas variáveis até a leitura. Para determinação da concentração e massa do lodo nos reatores, amostras eram coletadas de cima para baixo pelas torneiras localizadas no corpo principal do reator UASB, em quantidades iguais, para formação de uma amostra composta.

5.2.6 Potencial energético

O potencial energético foi estimado a partir dos maiores valores de produção volumétrica de H₂ e CH₄ (L_{gás}/L_{reator}) obtidos em escala de laboratório, e com base na quantidade de glicerol gerada por uma indústria que produz diariamente 250 m³ de biodiesel

(25 m³ glicerol/d). A sequência de cálculos e equações utilizadas para realizar a estimativa de geração de energia a partir do H₂ e CH₄ produzidos em escala de laboratório estão mostradas na Tabela 5.4.

5.3 Resultados e discussão

5.3.1 Operação dos reatores UASB produtores de H₂

A Tabela 5.5 apresenta um resumo das variáveis monitoradas a cada etapa de operação do RH, utilizando valores médios para cada parâmetro, seguidos do intervalo de confiança. A Figura 5.4 apresenta a variação de COV, produção diária de biogás e H₂, concentração de H₂ e CH₄ no biogás e rendimento de H₂, em função do tempo e das etapas de operação.

Etapa 1 (RH₁)

O aumento da COV provocou aumento do rendimento de H₂. Esse efeito foi mais pronunciado em COV a partir de 50 kgDQO/m³.d, quando a produção média diária de biogás elevou-se de 1,7 para 6,8 L/d, fazendo o rendimento de H₂ aumentar de 0,015 para 0,049 mol H₂/mol glicerol. Dounavis, Ntaikou e Lyberatos (2015) observaram, igualmente, aumento considerável do rendimento de H₂ (de 0,15 para 0,42 mol H₂/mol glicerol) ao elevar a COV de 9 para 30 kgDQO/m³.d. Os autores atribuíram esse aumento à predominância da rota butírica de produção de H₂. No presente experimento, o aumento gradual do rendimento de H₂ no RH₁ ocorreu, principalmente, porque a elevada COV (acima de 40 kgDQO/m³.d) inibiu o crescimento de *archaeas* metanogênicas, reduzindo o consumo de H₂ e favorecendo sua liberação para o *headspace* do reator. Isso pôde ser comprovado pela redução gradual da concentração de metano no biogás à medida que se aumentava a COV, chegando a 0% quando aplicou-se COV de 60 kgDQO/m³.d (Tabela 5.5), em linha com o proposto por Rittman e McCarty (2001), de que a produção de metano em reatores UASB fica comprometida em COV acima de 15 kgDQO/m³.d. No mesmo período, o percentual de H₂ aumentou de 18% (início da operação) para 85% (ao alcançar 60 kgDQO/m³.d).

Tabela 5.4 – Sequência de cálculos e equações utilizadas para realizar a estimativa de geração de energia a partir do H₂ e CH₄ produzidos em escala de laboratório. (Continua)

Variável	Equação	Abreviaturas
Para escala de laboratório		
1. Carga orgânica em escala de laboratório (kgDQO/d)	$CO = DQO_{afl} \times Q_{afl}$	CO = carga orgânica (kgDQO/d) DQO_{afl} = concentração de DQO afluyente (kgDQO/m ³) Q_{afl} = vazão afluyente (m ³ /d)
2. Produção específica do gás (m ³ gás/kgDQO)	$Prod_{esp}^{gás} = \frac{V_{gás}}{CO}$	$Prod_{esp}^{gás}$ = produção específica do gás (m ³ gás/kgDQO) $V_{gás}$ = volume diário de gás produzido (m ³ gás/d)
Para escala industrial		
3. Carga orgânica (kgDQO/d)	$CO = DQO_{gli} \times Q_{gli}$	DQO_{gli} = concentração de DQO do glicerol residual (kgDQO/m ³) Q_{gli} = vazão de glicerol (m ³ /d)
4. Volume do reator (m ³)	$V_{reator} = \frac{CO}{COV_{lab}^{mpv}}$	V_{reator} = volume do reator (m ³) COV_{lab}^{mpv} = carga orgânica volumétrica em que se alcançou maior produção volumétrica do gás em escala de laboratório (kgDQO/m ³ .d)
5. Volume diário de gás produzido (m ³ gás/d)	$V_{gás} = CO \times \frac{V_{lab}^{gás}}{CO_{lab}}$	$V_{gás}$ = volume diário de gás produzido em escala industrial (m ³ gás/d) $V_{lab}^{gás}$ = volume diário de gás produzido em escala de laboratório (m ³ gás/d) CO_{lab} = carga orgânica em escala de laboratório (kgDQO/d)

Tabela 5.4 – Sequência de cálculos e equações utilizadas para realizar a estimativa de geração de energia a partir do H₂ e CH₄ produzidos em escala de laboratório. (Conclusão)

Para conversão em energia

6. Energia produzida (MJ/d)

$$E_{MJ} = PCI_{gás} \times V_{gás}$$

E_{MJ} = Energia produzida em Megajoule (MJ/d)
 $PCI_{gás}$ = poder calorífico inferior do gás (MJ/m³)

7. Energia produzida (kWh/d)

$$E_{kWh} = \frac{E_{MJ}}{f_{kWh}^{MJ}} \times \frac{Ef_{ger}}{100}$$

E_{kWh} = Energia produzida em Quilowatt-hora (kWh/d)
 f_{kWh}^{MJ} = fator de conversão de Megajoule para Quilowatt-hora = 3,6
 Ef_{ger} = eficiência do motogerador (%)

8. Famílias abastecidas (famílias)

$$Fam_{abast} = \frac{E_{kWh}}{Cons_{fam}^{kWh}}$$

Fam_{abast} = famílias abastecidas
 $Cons_{fam}^{kWh}$ = consumo diário médio familiar de energia

Tabela 5.5 – Resumo das variáveis monitoradas a cada etapa de operação dos reatores produtores de hidrogênio (RH), utilizando valores médios para cada parâmetro seguidos do desvio padrão (Continua).

Etapa	Fase	Tempo Acum. ^a	Duração ^a	COV plan. ^b	COV medida	Vazão afluyente ^c	DQO Afl Tot ^d	DQO Efl Tot ^e	Ef ^f	pH
RH ₁	I	24	24	20	14,4±3,9	8,3±2,3	26,6±1,3	24,0±5,5	10±18	5,7±0,5
	II	45	21	30	26,5±5,3	9,7±1,7	43,4±9,0	42,9±8,0	0±14	5,3±0,2
	III	59	14	40	39,2±5,5	10,2±0,7	58,2±8,3	54,0±10,6	8±7	5,4±0,2
	IV	73	14	50	48,6±1,6	10,1±1,1	66,1±3,2	58,7±11,5	11±16	5,2±0,1
	V	84	11	60	54,5±14,7	10,4±0,7	74,0±21,0	58,2±17,0	20±11	5,2±0,1
	VI	111	27	70	79,1±11,4	9,0±2,2	121,5±27,4	118,6±37,3	3±24	5,3±0,3
RH ₂	I	9	9	20	18,8±2,7	6,8±0,5	37,4±5,5	43,3±8,1	0±5	5,5±0,4
	II	23	14	30	28,9±4,9	8,3±1,2	45,4±5,1	41,0±4,0	9±16	5,3±0,2
	III	37	14	40	37,4±3,8	11,8±1,1	34,6±19,5	42,5±4,2	2±7	6,0±1,2
	IV	50	13	50	54,0±4,6	17,6±1,6	41,9±0,8	39,5±5,3	6±12	5,4±0,3
	V	64	14	60	61,5±5,8	18,5±1,3	32,6±22,4	32,7±22,7	0±9	5,4±0,1
RH ₃	I	6	6	5	4,2±1,0	1,4±0,3	31,1±0,9	22,9±26,3	25±86	5,3±0,1
	II	10	4	10	9,0±2,4	3,8±1,0	31,0±1,7	28,2±0,0	12±0	5,3±0,1
	III	26	16	15	12,8±1,2	4,8±0,3	35,7±3,1	30,6±16,3	0±20	5,3±0,1
	IV	45	19	20	20,0±3,4	5,7±0,8	44,3±2,5	42,9±4,7	4±9	5,3±0,1

Tabela 5.5 – Resumo das variáveis monitoradas a cada etapa de operação dos reatores produtores de hidrogênio (RH), utilizando valores médios para cada parâmetro seguidos do desvio padrão (Continuação).

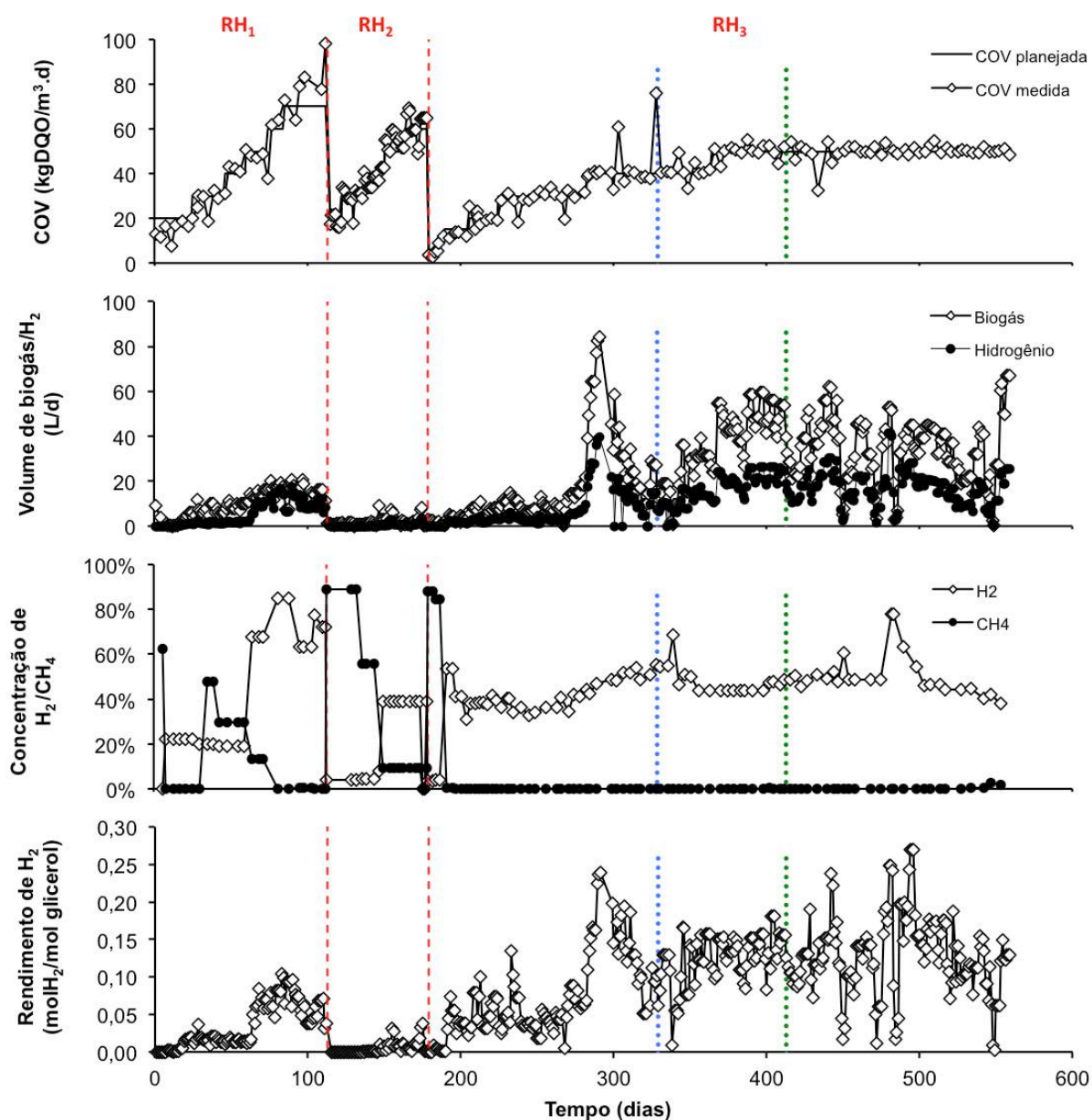
	V	103	58	30	28,9±4,6	8,4±2,3	47,7±9,1	42,4±10,4	7±28	5,3±0,1
	VI-a	150	47	40	42,9±10,9	12,9±3,4	44,9±11,7	34,5±8,2	17±30	5,2±0,1
RH ₃	VI-b	184	34	40	41,2±4,0	12,3±2,0	43,4±7,9	37,0±8,7	14±17	5,6±1,2
	VII-a	234	50	50	50,1±3,1	18,2±2,3	36,4±5,4	33,7±5,6	5±21	4,9±1,2
	VII-b	380	146	50	50,0±3,4	15,6±3,6	44,6±11,0	36,8±10,0	17±30	5,1±0,6
Etapa	Fase	Q biogás^g	%H₂^h	%CH₄ⁱ	pH₂^j	Vol H₂^k	PVH^l	Y H₂^m	COLⁿ	TRC^o
	I	2,4±2,6	18±10	12±28	0,04±0,0	0,3±0,4	0,0±0,0	0,005±0,01	0,6±0,2	40±40
	II	6,8±2,1	20±1	25±24	0,11±0,1	1,4±0,4	0,1±0,0	0,017±0,01	1,2±0,4	23±20
RH ₁	III	8,8±1,5	19±0	30±0	0,19±0,0	1,7±0,3	0,1±0,0	0,015±0,00	1,6±0,3	19±8
	IV	13,1±1,9	68±0	13±0	0,63±0,0	6,8±3,4	0,5±0,2	0,049±0,03	2,5±0,3	16±20
	V	17,1±2,1	85±0	0±0	0,73±0,0	13,3±2,6	0,9±0,2	0,076±0,02	2,8±0,4	10±7
	VI	14,3±3,7	71±8	0±0	0,56±0,3	10,5±3,2	0,7±0,2	0,062±0,02	4,1±1,3	15±27
					RH ₂					
	I	1,0±0,3	-	-	-	0,0±0,0	0,0±0,0	0,000±0,00	0,8±0,1	0±0
	II	0,9±0,5	4±0	89±0	0,00±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,000±0,00	1,0±0,2	9±10
RH ₂	III	1,9±2,2	5±2	56±0	0,03±0,0	0,1±0,1	0,0±0,0	0,002±0,00	1,5±0,1	7±5
	IV	2,6±1,9	39±0	9±0	0,38±0,0	0,9±0,8	0,1±0,1	0,011±0,01	2,1±0,2	3±1
	V	2,1±2,5	26±20	6±5	0,38±0,0	0,8±1,0	0,1±0,1	0,010±0,01	17,0±6,9	1±1

Tabela 5.5 – Resumo das variáveis monitoradas a cada etapa de operação dos reatores produtores de hidrogênio (RH), utilizando valores médios para cada parâmetro seguidos do desvio padrão. (Conclusão)

	I	2,1±0,8	4±0	87±2	0,03±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,003±0,00	0,1±0,0	1069±1351
	II	1,3±0,6	4±0	85±1	0,04±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,002±0,00	0,3±0,1	93±0
	III	3,3±1,3	44±9	0±0	0,41±0,1	1,5±0,7	0,1±0,1	0,037±0,02	0,5±0,1	41±33
	IV	6,8±2,1	39±1	0±0	0,37±0,0	2,6±0,9	0,2±0,1	0,055±0,02	1,0±0,2	40±39
RH ₃	V	9,6±3,9	37±3	0±0	0,28±0,1	3,7±1,6	0,3±0,1	0,051±0,02	2,2±1,1	21±21
	VI-a	34,6±20,6	49±4	0±0	0,46±0,0	15,2±10,0	1,2±0,8	0,134±0,05	4,8±0,8	4±8
	VI-b	22,3±10,1	52±8	0±0	0,47±0,1	10,6±4,6	0,8±0,4	0,113±0,04	4,6±0,5	7±5
	VII-a	46,0±9,7	45±2	0±0	0,41±0,0	20,6±4,5	1,6±0,3	0,135±0,02	5,8±0,6	4±3
	VII-b	34,0±14,1	51±10	0±1	0,47±0,1	16,9±7,6	1,3±0,6	0,128±0,05	5,9±1,2	4±4

Notas: ^a dias; ^b kgDQO/m³.d; ^c L/d; ^d DQO afluente, em g/L; ^e DQO total do efluente, em g/L; ^f eficiência de remoção de matéria orgânica total, em % (DQO/DQO); ^g vazão de biogás, em L/d; ^h percentual de H₂ no biogás; ⁱ percentual de CH₄ no biogás; ^j pressão parcial de hidrogênio, em atm; ^k produção de hidrogênio, em L H₂/d; ^l produção volumétrica de hidrogênio, em L H₂/[L reator.d]; ^m rendimento, em mol H₂/mol glicerol; ⁿ carga orgânica aplicada ao lodo, em kgDQO/[kgSTV.d]; ^o tempo de retenção celular, em dias; os valores seguidos de ± representam o desvio padrão.

Figura 5.4 – Variação de carga orgânica volumétrica (COV), produção diária de biogás e de H_2 , concentração de H_2 e CH_4 no biogás e rendimento de H_2 em função do tempo.



Notas: As linhas tracejadas em vermelho separam as etapas de operação do reator produtor de hidrogênio; as linhas pontilhadas em azul indicam o dia em que o glicerol comercial foi totalmente substituído pelo glicerol residual (dia 329); as linhas pontilhadas em verde indicam o dia em que o todo o clorofórmio foi retirado do afluente (dia 413).

Apesar de diversos pesquisadores sugerirem pré-tratamento de lodo antes de inocular reatores anaeróbios para produção de H_2 (DATAR et al., 2007; ZHANG et al., 2004), os resultados deste trabalho mostraram que apenas mantendo COV elevada e o controle do pH foram suficientes para inibir as *archaeas* metanogênicas, mesmo a longo prazo. Em escala industrial, esse procedimento é interessante pois há redução de gastos com adição de compostos químicos ou com aquecimento prévio do lodo de inóculo. Entretanto, a partida do reator torna-se mais longa, porque necessita de mais tempo para inibir as bactérias consumidoras de H_2 .

Ao alcançar $60 \text{ kgDQO/m}^3\text{.d}$, o reator atingiu seu maior rendimento médio, $0,08 \text{ mol } H_2/\text{mol glicerol}$ (8% do rendimento máximo teórico), alcançando picos de $0,10 \text{ mol } H_2/\text{mol glicerol}$ e 20 L biogás/d . O rendimento máximo obtido nessa etapa de operação foi maior do que o alcançado por Vlassis et al. (2012), que produziram $0,07 \text{ mol } H_2/\text{mol glicerol}$ residual utilizando inóculo proveniente de estação de tratamento anaeróbio de esgoto doméstico pré-tratado termicamente. Entretanto, esse valor foi bastante inferior aos alcançados por outros pesquisadores que utilizaram o glicerol para produzir H_2 (Tabela 5.1).

As hipóteses mais prováveis para explicar o baixo rendimento alcançado nessa etapa de operação são: i) desvio de rota metabólica; ii) elevada pressão parcial de H_2 ; iii) acúmulo de metabólitos solúveis; iv) limitação da capacidade metabólica; v) toxicidade causada pelas altas concentrações de sódio; vi) ou uma associação entre dois ou mais aspectos.

O desvio de rota metabólica acontece quando uma condição operacional favorece a produção de um ou mais metabólitos específicos, reduzindo o rendimento do produto desejado. No caso do glicerol, é comum ocorrer um desvio de rota metabólica para formar 1,3-propanodiol, sobretudo quando a concentração inicial de glicerol está acima de 10 g glicerol/L (SEIFERT et al., 2009). Entretanto, isso não pôde ser analiticamente comprovado nessa etapa de operação, devido à impossibilidade de determinar a concentração de subprodutos alcoólicos, tais como, 1,3-propanodiol, etanol e butanol. Uma alta produção de 1,3-PPD está diretamente relacionada a baixos rendimentos de H_2 , pois os compostos são formados a partir de rotas metabólicas concorrentes (BIEBL et al., 1992). Além disso, a formação de 1,3-PPD requer o consumo de 1 mol de hidrogênio (SELEMO et al., 2009), que equivale ao rendimento máximo teórico de H_2 a partir de glicerol.

A inibição pela pH_2 ocorreu porque o valor dessa variável foi superior a $0,3 \text{ atm}$ na maior parte do experimento (Tabela 5.5), valor que dificulta a oxidação do NADH e da

ferrodoxina reduzida pela hidrogenase e consequente liberação de H₂ (ANGENENT et al., 2004; HAWKES et al., 2007). Com base nos valores de potencial redox dos doadores de elétrons NADH ($E_{\text{NADH}}^{\circ'} = -320$ mV) e ferrodoxina ($E_{\text{Fd}}^{\circ'} = -400$ mV), e do receptor de elétrons H₂ ($E_{\text{H}_2}^{\circ'} = -414$ mV), é possível determinar o limite máximo da p_{H₂} para que a síntese deste gás ocorra (Equação 5.1). Assumindo que as concentrações intracelulares das formas oxidadas e reduzidas de NADH e ferrodoxina são praticamente as mesmas, a produção de H₂ torna-se termodinamicamente desfavorável quando a p_{H₂} ultrapassar 0,3 atm para a ferrodoxina e 6×10^{-4} atm para o NADH.

$$p_{\text{H}_2, \text{máx}} \leq \exp \left\{ \frac{2F(E_{\text{H}_2}^{\circ'} - E_x^{\circ'})}{RT} \right\} \quad (5.1)$$

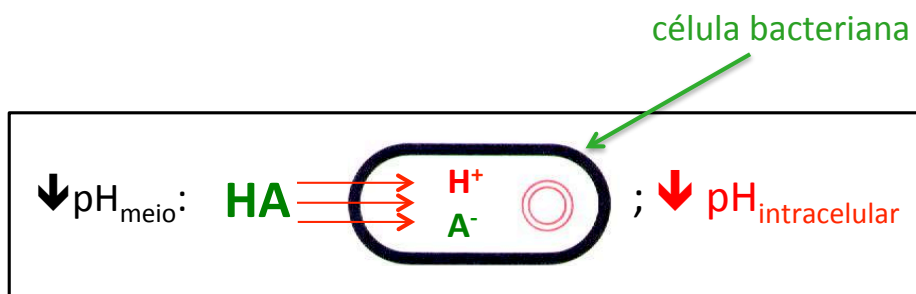
Onde: p_{H₂,máx} é a pressão parcial de hidrogênio máxima para que a síntese deste gás seja termodinamicamente favorável; F é a constante de Faraday 96485,33289(59) C/mol; R é a constante dos gases ideais (0,082 atm.L/mol.K); T é a temperatura absoluta; $E_x^{\circ'}$ é o potencial redox do doador de elétrons.

Como consequência da elevada p_{H₂}, o rendimento de NADH na fase acidogênica também se eleva, induzindo os micro-organismos a sintetizarem ácido propiônico em vez de ácido butírico, para manter uma razão NADH/NAD⁺ apropriada dentro da célula, pois a produção de ácido propiônico produz mais NAD⁺ do que a síntese de ácido butírico (SIVAGURUNATHAN; SEN; LIN, 2014). Dessa forma, o ácido propiônico acumulou no sistema (Tabela 5.6) e reduziu a síntese de H₂, que ocorreria pela rota butírica ou acética. Além disso, p_{H₂} maior que 10⁻⁴ atm torna a reação de degradação de ácido propiônico (e consequente liberação de H₂) termodinamicamente desfavorável (KIM et al., 2006; HARPER; POHLAND, 1986). Nessa e nas outras etapas da pesquisa, a p_{H₂} sempre esteve acima de $2,6 \times 10^{-2}$ atm (Tabela 5.5). O excesso de NADH (acima de 0,75 mM) também pode inibir a enzima glicerol desidrogenase e reduzir o consumo de glicerol (MCGREGOR; PHILLIPS; SUELTER, 1974).

O processo também pode ter sido inibido pelo aumento da concentração de ácidos dissociados no interior da célula. Nesse caso, a força iônica da solução torna-se elevada resultando na mudança de produção de hidrogênio para a produção solventes (CHONG et al., 2009). Esse fenômeno é potencializado em pH ácido, caso do RH₁, com pH entre 5,2 e 5,4 na maior parte do tempo. O mecanismo de inibição acontece quando os ácidos não dissociados

apolares penetram na parede celular, liberando prótons no interior das células, que possui maior pH (VAN GINKEL; LOGAN, 2005), conforme esquema mostrado na Figura 5.5. Em virtude disso, bactérias do gênero *Clostridium* (principais produtoras de H₂) podem esporular e reduzir a conversão de glicerol em H₂, diminuindo o rendimento (HAFEZ et al., 2010). A esporulação é um mecanismo que bactérias específicas (sobretudo *Clostridium* e *Bacillus*) possuem para se manter vivas sob condições adversas. Essas bactérias formam uma parede espessa resistente e suspendem suas atividades metabólicas até as condições mínimas de sobrevivência serem reestabelecidas (LOWE; JAIN; ZEIKUS, 1993).

Figura 5.5 – Esquema do mecanismo de inibição pelo excesso de ácidos não dissociados apolares.



A inibição pela capacidade metabólica ocorre quando a concentração de matéria orgânica é suficientemente elevada para que a massa de micro-organismos presente no sistema não seja capaz de consumir integralmente o substrato. Como consequência, o glicerol é consumido apenas parcialmente, reduzindo a produção e o rendimento de H₂. Em termos práticos, isso acontece quando a COV ultrapassou o limite máximo.

A toxicidade causada pelo excesso de Na⁺ pode ter ocorrido por causa da carga elevada desse cátion, seja por meio da alimentação (o glicerol residual utilizado como substrato possuía cerca de 21 g Na⁺/L em sua composição), seja por meio da solução utilizada para controlar o pH (NaOH 0,5% v/v). A concentração de Na⁺ no interior do sistema variou entre 4,6 e 6,0 g/L, valor considerado superior ao inibitório ao processo anaeróbio, de 4,5 g/L, em média (MCCARTY, 1964b). O efeito tóxico do sódio deve-se à plasmólise celular causada pelo excesso de Na⁺ (DE BAERE et al., 1984; YERKES; BOONYAKITSOMBUT; SPEECE, 1997).

Em diversos momentos da operação do RH₁, houve expulsões pontuais de lodo do

sistema. Contudo, ao alcançar 60 kgDQO/m³.d (COV média medida de 54 kgDQO/m³.d – Fase V), esse problema repetiu-se com maior frequência e intensidade, que fez uma grande quantidade de lodo anaeróbio sair junto ao efluente. A massa total de lodo expurgado foi de cerca de 151 gSTV, ou seja, 43% do lodo inicialmente inoculado. Após 6 dias sem perda de lodo, decidiu-se elevar a COV para 70 kgDQO/m³.d, e quase todo o lodo anaeróbio foi expulso do reator em apenas 7 dias de operação sob essa COV, reduzindo o rendimento de 0,10 mol H₂/mol glicerol para 0,04 mol H₂/mol glicerol.

Possivelmente a flotação do lodo foi causada em razão da presença de impurezas contidas no glicerol residual, tais como, sais (ITO et al., 2005) e graxas (HUTŇAN et al., 2013). A fim de solucionar esse problema, o RH foi reinoculado e alimentado com glicerol comercial. Outra estratégia foi reduzir a concentração da DQO afluente (fixando-a em 40 g/L) para diminuir a carga de sódio proveniente da solução de correção do pH, pois quanto menor a concentração de matéria orgânica afluente, menor seria a produção de ácidos. Reduzir a concentração de DQO afluente apresenta, também, outras vantagens: i) diminui a possibilidade de desvio de rota metabólica para produção de 1,3-propanediol, como mencionado anteriormente (SEIFERT et al., 2009); ii) reduz a possibilidade de causar inibição em decorrência da concentração elevada de substrato.

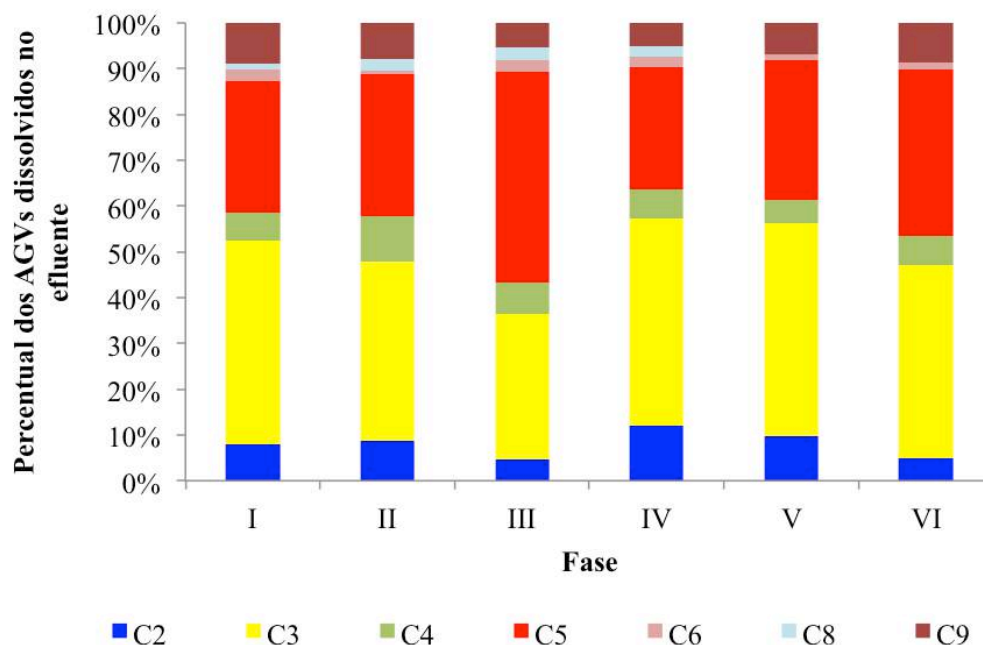
A Tabela 5.6 ilustra a concentração média dos principais ácidos produzidos e rendimento médio obtido em cada fase da 1^a etapa de operação do reator produtor de hidrogênio (RH₁). Os resultados dessa tabela mostram que o ácido propiônico apresentou-se em maior concentração dentre os principais ácidos produzidos. De acordo com a Figura 5.6, a concentração correspondeu a 32-46% dos principais ácidos produzidos pelo reator. O desvio de rota metabólica pode justificar os baixos rendimentos dessa etapa, pois esses metabólitos não são predominantes quando há elevada eficiência de conversão a H₂. De acordo com Biebl (2001), Biebl et al. (1999) e Zeng et al. (1993), a produção de H₂ ocorre pela rota do piruvato-formiato, cujos principais subprodutos são os ácidos acético, butírico e etanol. Seifert et al. (2009) avaliaram a produção de hidrogênio a partir de glicerol e verificaram que etanol, 1,3-PPD, ácido láctico e ácido butírico foram os principais subprodutos da fermentação de glicerol, e os maiores rendimentos (0,4 mol H₂/mol glicerol, em média) ocorreram quando predominou-se a fermentação butírica. Além disso, a elevada concentração de ácido propiônico no meio pode ter inibido as bactérias fermentativas.

Tabela 5.6 – Concentrações médias dos principais ácidos produzidos em cada fase da 1ª etapa de operação do reator produtor de hidrogênio (RH₁). Os valores seguidos de ± representam o desvio padrão.

Fase	Concentração (g/L)						
	C2	C3	C4	C5	C6	C8	C9
I	0,7±0,5	2,9±1,8	0,3±0,3	1,4±1,3	0,1±0,1	0,0±0,1	0,3±0,3
II	1,0±0,3	3,1±1,4	0,7±0,3	1,8±1,4	0,1±0,1	0,1±0,1	0,4±0,2
III	0,4±0,3	1,8±1,7	0,3±0,2	1,9±1,3	0,1±0,1	0,1±0,2	0,2±0,2
IV	1,6±0,4	4,3±0,7	0,5±0,2	1,9±0,4	0,2±0,2	0,1±0,2	0,3±0,4
V	1,8±0,9	6,0±1,4	0,6±0,2	2,9±0,9	0,1±0,0	0,0±0,0	0,5±0,4
VI	1,0±0,3	6,0±0,9	0,8±0,3	3,8±1,2	0,1±0,1	0,0±0,0	0,7±0,2

Notas: C2, C3, C4, C5, C6, C8 e C9 representam os ácidos acético, propiônico, butírico, valérico, caproico, caprílico e pelargônico, respectivamente; Não houve análise para detecção de C7 (ácido enântico) e álcoois nessa etapa de operação.

Figura 5.6 – Percentual dos principais ácidos produzidos em cada fase de operação do RH₁.



Notas: C2, C3, C4, C5, C6, C8 e C9 representam os ácidos acético, propiônico, butírico, valérico, caproico, caprílico e pelargônico, respectivamente; Não houve análise para detecção de álcoois nesta etapa de operação.

Etapa 2 (RH₂)

Mesmo após a mudança do tipo de glicerol (partida do RH₂), não foi percebida melhora no desempenho do sistema. Apesar de o rendimento médio de hidrogênio ter o seu valor aumentado em cinco vezes após a COV aumentar de 40 para 50 kgDQO/m³.d, passando de 0,002 para 0,011 mol H₂/mol glicerol, esse valor foi bem inferior ao alcançado na operação do RH₁ com glicerol residual (0,08 mol H₂/mol glicerol), muito abaixo dos rendimentos encontrados por outros pesquisadores que estudaram a produção de H₂ a partir de glicerol (Tabela 5.1). Não foi possível verificar se houve relação direta entre os metabólitos formados e o rendimento de H₂, sugerindo ter o aumento ocorrido devido ao aumento da COV e à inibição da metanogênese. No entanto, a inibição foi apenas parcial, pois mesmo operando com COV de 60 kgDQO/m³.d, o percentual de CH₄ ainda era de 6%.

A maior fração de H₂ no biogás ocorreu quando a COV era de 50 kgDQO/m³.d, em média 39%. Após o aumento da COV, esse percentual caiu para 26%, indicando inibição das bactérias produtoras de H₂. As causas do baixo rendimento obtido na etapa RH₂ podem ter sido consequência da concentração de Na⁺ no interior do reator, entre 3,8 e 5,0 g/L, ou pela pH₂ elevada nas fases finais de operação (IV e V), 0,38 atm (Tabela 5.5).

A nova estratégia de alimentar o reator com glicerol de elevado teor de pureza não foi suficiente para diminuir os problemas de expurga de lodo, o que também pode ter contribuído para os baixos rendimentos de H₂. Ao alcançar 60 kgDQO/m³.d, 88% da massa inicial de lodo inoculado havia sido expurgada junto ao efluente, após 10 dias operando sob essa COV. Por conseguinte, nos últimos dias de operação, a produção diária de biogás foi de apenas 0,2 L e o rendimento chegou a apenas 0,001 mol H₂/mol glicerol. Logo, as impurezas presentes no glicerol residual não foram responsáveis pela flotação de lodo na etapa anterior. Assim, a operação do RH₂ foi interrompida no 64° dia, quando não havia mais biomassa no interior do sistema.

A única possibilidade, portanto, para explicar o problema de flotação e expurga de lodo do sistema seria o arraste causado pelo fluxo ascendente das bolhas de gás produzidas no próprio reator. A fim de sanar esse problema, o RH reator foi reinoculado, utilizando meio suporte para aumentar a retenção de lodo no interior do sistema (esse procedimento iniciou a Etapa 3, descrita no item a seguir).

A Tabela 5.7 mostra as concentrações médias dos principais ácidos produzidos em cada fase da 2ª etapa de operação do reator produtor de hidrogênio (RH₂). É possível notar que, nas fases I, II e III, o ácido propiônico (C3) predominou sobre os ácidos acético e

butírico, com concentração correspondente a 23-56% dos principais ácidos produzidos pelo reator (Figura 5.7). No entanto, a soma das concentrações dos ácidos em termos de DQO fica bem abaixo da concentração média de DQO afluente, 40 g/L. A matéria orgânica presente no glicerol pode ter sido convertida a outros metabólitos que não puderam ser medidos nessa etapa de operação, tais como, 1,3-PPD e etanol. Outra possibilidade é a de o glicerol afluente não ter sido totalmente convertido, saindo junto com o efluente. Isso acontece se o tempo necessário para o crescimento bacteriano for inferior ao tempo de detenção hidráulica (TDH) do reator ou quando a COV estiver acima da suportada pela massa microbiana. Dounavis, Ntaikou e Lyberatos (2015) aumentaram gradualmente a COV de 9 a 30 kgDQO/m³.d (diminuindo o TDH) e observaram que a eficiência de conversão de glicerol diminuiu de 97% para 83% nesse mesmo intervalo.

Tabela 5.7 – Concentrações médias dos principais ácidos produzidos em cada fase da 2^a etapa de operação do reator produtor de hidrogênio (RH₂). Os valores seguidos de ± representam o desvio padrão.

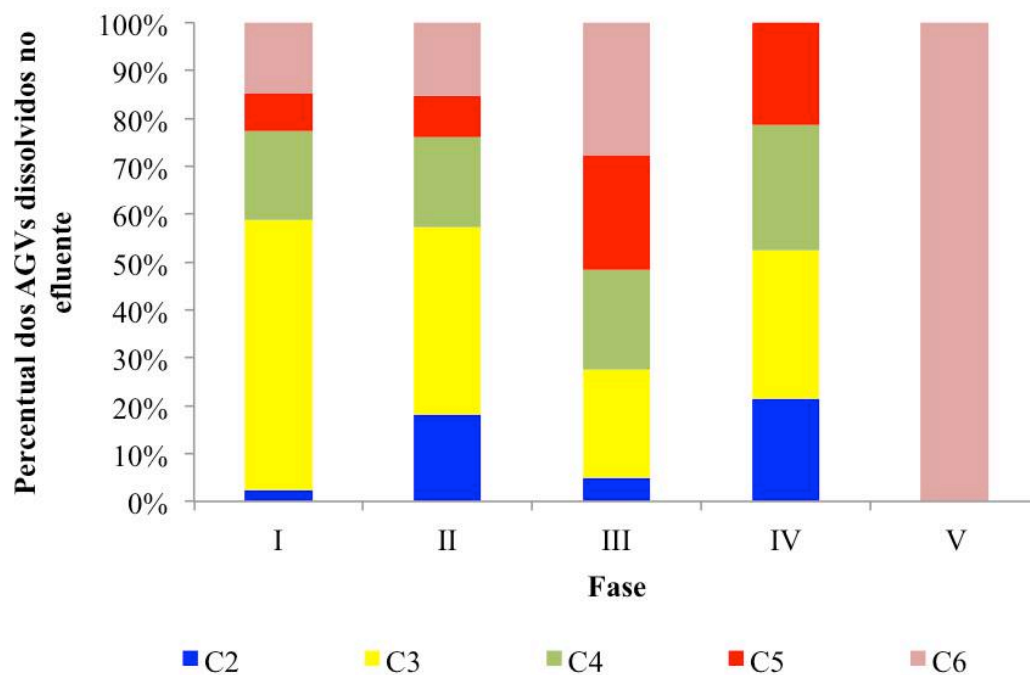
Fase	Concentração (g/L)				
	C2	C3	C4	C5	C6
I	0,1±0,0	0,9±0,0	0,3±0,0	0,1±0,0	0,2±0,0
II	0,9±0,4	1,4±0,3	0,5±0,1	0,2±0,1	0,4±0,2
III	0,4±0,0	1,2±0,3	0,9±0,4	0,9±0,7	1,0±1,7
IV	0,8±0,4	0,8±0,5	0,6±0,3	0,4±0,2	0,0±0,0
V	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,1±0,0

Notas: C2, C3, C4, C5 e C6 representam os ácidos acético, propiônico, butírico, valérico e caproico, respectivamente; Não houve análise para detecção de álcoois nesta etapa de operação.

O pico de ácido caproico (C6) foi de 1,0 g/L e aconteceu sob 40 kgDQO/m³.d (Fase III). Essa concentração é considerada alta, se é levada em conta que a sua concentração de inibição é entre 0,8 e 0,9 g/L em pH ácido (≈5,5) (GE et al., 2015; WEIMER; NERDAHL; BRANDL, 2015), como foi o caso do presente experimento. Entretanto, em COV maiores, a produção de C6, praticamente, cessou. Apesar disso, Dounavis, Ntaikou e Lyberatos (2015) conseguiram produzir 2,3 g C6/L a partir de glicerol residual, operando um reator anaeróbio de fluxo ascendente a 11 kgDQO/m³.d. O ácido caproico pode ser utilizado como precursor,

para síntese de biocombustíveis (AGLER et al., 2012) e aromatizantes (BUDAVARI, 1989), e suplemento alimentar de aves e suínos no controle de doenças entéricas (BOYEN et al., 2008).

Figura 5.7 – Percentual dos principais ácidos produzidos em cada fase de operação do RH₂.



Notas: C2, C3, C4, C5 e C6 representam os ácidos acético, propiônico, butírico, valérico e caproico, respectivamente; Não houve análise para detecção de álcoois nesta etapa de operação.

Etapa 3 (RH₃)

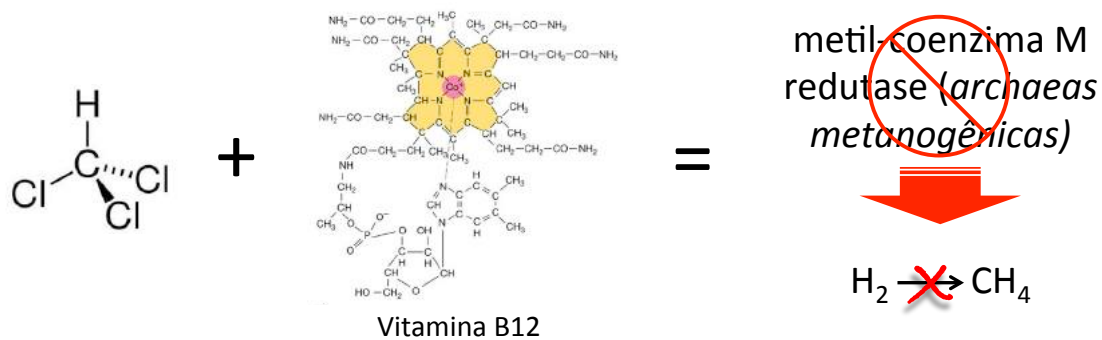
Diante do problema persistente, a estratégia adotada na Etapa 3 (RH₃) foi reinocular o reator com meio suporte, a fim de aumentar a retenção de lodo no sistema, mantendo a mesma DQO afluente (40 g/L). O glicerol comercial com elevado teor de pureza foi o substrato utilizado até o 149° dia de operação, sendo totalmente substituído pelo glicerol residual a partir do 150° dia (Fase VI-b). Além disso, adicionou-se clorofórmio ao afluente para eliminar a metanogênese e diminuir o tempo de partida do reator. A eficiência desse composto químico em inibir a atividade metanogênica foi previamente comprovada em testes em batelada, imediatamente antes da inoculação do RH₃. Os resultados desse experimento estão descritos no capítulo 3 e publicados por Dams et al. (2016). Para verificar se houve inibição

permanente das *archaeas* metanogênicas, o clorofórmio foi totalmente retirado do afluente no dia 234 (início da Fase VII-b)

O clorofórmio mostrou-se bastante eficiente em inibir a produção de CH₄ no reator, já que, a partir do 18° dia de operação, quando a COV era de apenas 15 kgDQO/m³.d, nenhum metano foi detectado no biogás. Já o percentual de H₂ era de 44%, com uma leve tendência a aumento ao longo do tempo de operação do RH₃ (Figura 5.4).

O clorofórmio é um inibidor seletivo, agindo como um corrinóide antagonista, que bloqueia o funcionamento da vitamina B12, responsável por ativar a metil-coenzima M redutase, enzima presente apenas nas *archaeas* metanogênicas e responsável pela formação de CH₄ (HU; CHEN, 2007). A Figura 5.8 ilustra de forma simplificada como ocorre essa interação. Outros estudos já haviam demonstrado a eficiência de clorofórmio em reduzir a atividade metanogênica (FORREST; SIERRA; HOLTZAPPLE, 2010; HU; CHEN, 2007; NING et al., 2012). No entanto, deve-se considerar a concentração desse inibidor no meio, pois clorofórmio acima de 0,10% pode afetar, inclusive, as bactérias produtoras de hidrogênio (HU; CHEN, 2007).

Figura 5.8 – Ação do clorofórmio sobre a vitamina B12 para bloquear a ação da metil-coenzima M redutase, presente apenas em *archaeas* metanogênicas).



Apesar da eficiência do clorofórmio, o rendimento permaneceu baixo até a Fase V (COV 30 kgDQO/m³.d), não passando de 0,05 mol H₂/mol glicerol. Os rendimentos obtidos nas Fases I e II podem ter sido baixos, porque o H₂ pode ter sido consumido para formar ácido caproico, de forma indireta ou direta. De forma indireta, bactérias homoacetogênicas sintetizam ácido acético a partir de H₂ e CO₂ e, em seguida, esse ácido acético é utilizado como aceptor de elétrons no alongamento de cadeia. Algumas espécies de bactérias têm a capacidade de utilizar diretamente o H₂ como doador de elétrons no alongamento de cadeia

(β -oxidação reversa), onde ácidos acético (C2) e butírico (C4) são convertidos a ácidos de cadeia média, como os ácidos caproico (C6) e caprílico (C8) (DING; TAN; WANG, 2010; STEINBUSCH et al., 2011). Ding, Tan e Wang (2010) mostraram ser possível haver consumo de H_2 para alongar a cadeia a ácido caproico, sobretudo, quando há escassez de etanol (doador preferencial de elétrons). Entretanto, o consumo direto de H_2 para formar C6 é contestado, seja pelo fato de *C. kluyveri* (principal micro-organismo responsável pelas reações de alongamento de cadeia) não ter sido capaz de utilizar H_2 como doador de elétrons (KENEALY; WASELEFSKY, 1985) ou porque esta rota metabólica não foi identificada em um estudo minucioso que abordou a termodinâmica de rotas metabólicas de alongamento de cadeia, dentre outras rotas (GONZÁLEZ-CABALEIRO et al., 2013). No presente experimento, a ocorrência do alongamento de cadeia pode ser comprovado pelas altas concentrações de ácido caproico nessas etapas (entre 1,0 e 1,7 g/L), vide Tabela 5.8. A partir da Fase III, a produção de ácido caproico reduziu substancialmente para 0,2 g/L, pois o alongamento de cadeia fica comprometido sob elevadas COVs (GE et al., 2015).

O aparecimento de ácido caproico tem sido relatado, também, em estudos que avaliaram a produção de H_2 a partir de glicerol residual em concentrações entre 0,4 e 2,3 g/L, sobretudo em COV inferiores a 11 kgDQO/m³.d (DOUNAVIS; NTAIKOU; LYBERATOS, 2015; DOUNAVIS et al., 2016), caso do presente experimento.

Outra explicação aos baixos rendimentos encontrados é o uso de glicerol para formar 1,3-PPD. Uma elevada produção desse diol desfavorece a síntese de H_2 , já mencionado anteriormente (BIEBL et al., 1992). Apesar de o 1,3-PPD não ter sido detectado nas Fases I e II de operação do RH₃, a partir da Fase III foi possível observar concentrações elevadas de 1,3-PPD, com médias variando entre 1,8 a 3,7 g/L (Tabela 5.8), quantidade equivalente a 43,2% e 62,5% de todos os metabólitos solúveis totais, respectivamente (Figura 5.9).

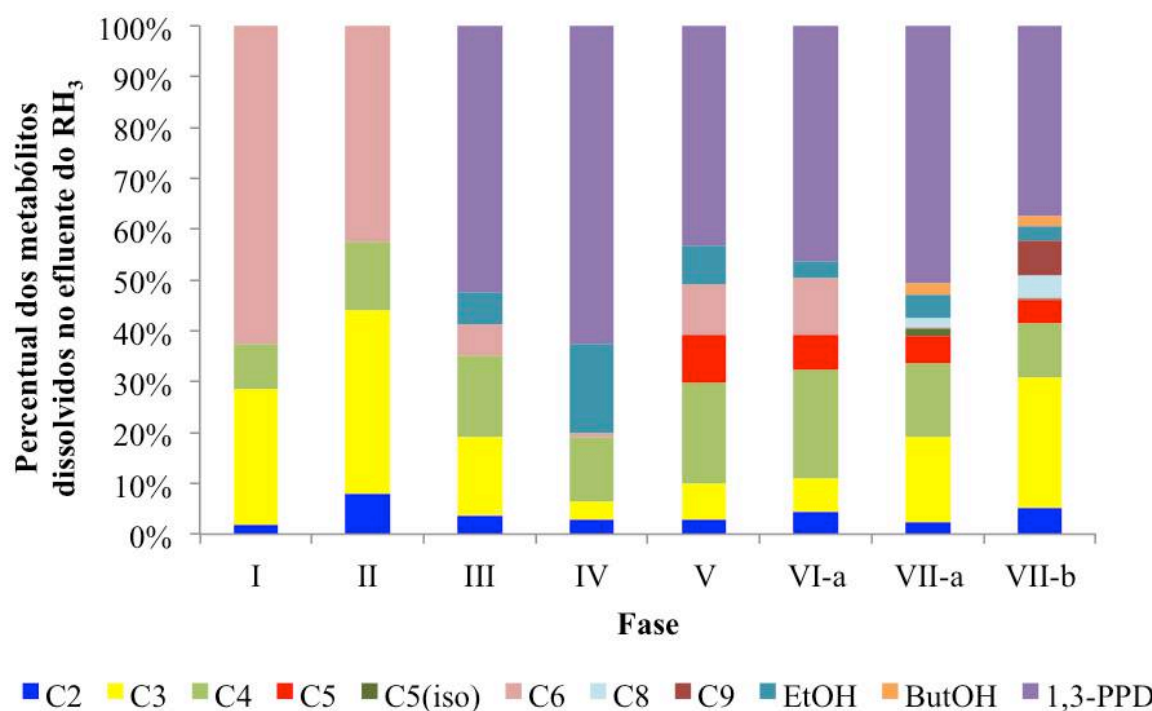
Quando a COV aumentou para 40 kgDQO/m³.d (Fase VI-a), o rendimento de H_2 aumentou de 0,051 para 0,134 mol H_2 /mol glicerol, ao passo que a concentração de 1,3-PPD diminuiu para 1500 mg/L, confirmando a relação entre esses dois produtos metabólicos. Quando o glicerol comercial foi substituído pelo glicerol residual (dia 151), o rendimento diminuiu para 0,113 mol H_2 /mol glicerol, aumentando para 0,135 mol H_2 /mol glicerol após elevar a COV para 50 kgDQO/m³.d (Fase VII-a).

Tabela 5.8 – Concentrações médias dos principais metabólitos formados e do glicerol remanescente em cada fase da 3^a etapa de operação do reator produtor de hidrogênio (RH₃). Os valores seguidos de ± representam o desvio padrão.

Fase	Concentração (g/L)											
	C1	C2	C3	C4	C5 _(iso)	C5	C6	HSu	1,3-PPD	EtOH	ButOH	Glicerol
I	N.D	0,1±0,2	1,1±0,8	0,3±0,5	N.D	N.D	1,7±2,8	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
II	N.D	0,4±0,2	1,3±0,3	0,4±0,3	N.D	N.D	1,0±0,3	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
III	N.D	0,2±0,2	0,6±0,4	0,5±0,3	N.D	N.D	0,2±0,2	N.D	1,8±0,4	0,2±0,1	N.D	3,5±1,2
IV	N.D	0,3±0,1	0,2±0,1	0,7±0,1	N.D	N.D	0,0±0,1	N.D	3,7±0,3	0,8±0,3	N.D	9,8±1,8
V	N.D	0,3±0,1	0,5±0,3	1,1±0,4	N.D	0,5±0,1	0,4±0,3	N.D	2,5±1,7	0,4±0,4	N.D	5,2±4,5
VI-a	N.D	0,5±0,2	0,5±0,2	1,3±0,3	N.D	0,4±0,2	0,6±0,4	N.D	3,0±1,1	0,2±0,1	N.D	6,3±3,6
VI-b	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
VII-a	0,0±0,0	0,3±0,1	1,2±1,7	0,9±0,2	0,1±0,1	0,3±0,1	0,0±0,0	0,2±0,3	3,3±1,1	0,2±0,1	0,1±0,0	11,8±2,0
VII-b	2,8±6,2	0,7±0,4	2,4±2,7	0,8±0,3	0,0±0,0	0,3±0,2	0,0±0,0	0,6±0,7	3,1±1,7	0,2±0,1	0,1±0,1	5,1±5,0

Notas: C1, C2, C3, C4, C5_(iso), C5, C6, HSu representam os ácidos fórmico, acético, propiônico, butírico, isovalérico, valérico, caproico e succínico, respectivamente; 1,3-PPD: 1,3-propanodiol; EtOH: etanol; ButOH: butanol; N.D: dado não disponível.

Figura 5.9 – Percentual dos principais metabólitos produzidos em cada fase de operação do RH_3 .



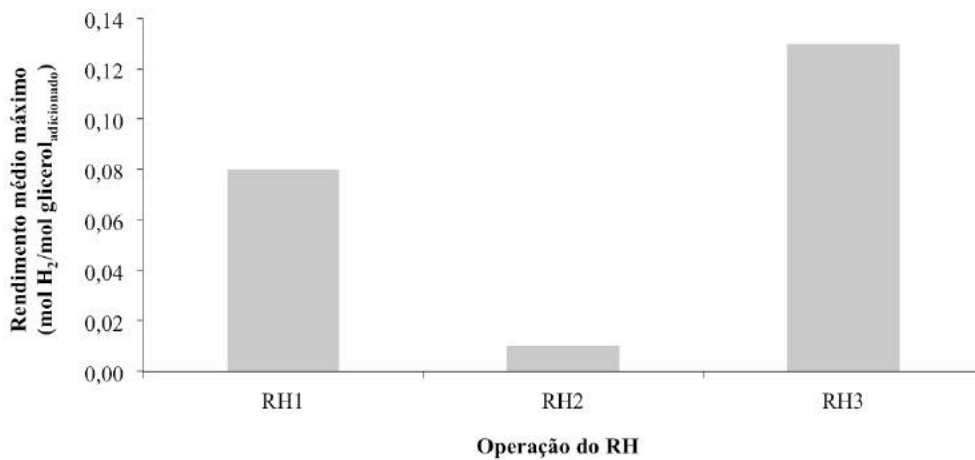
Notas: C2, C3, C4, C5, C5(iso), C6, C8 e C9 representam os ácidos acético, propiônico, butírico, valérico, isovalérico, caproico, caprílico e pelargônico, respectivamente; EtOH, ButOH e 1,3-PPD representam o etanol, butanol e 1,3-propanodiol; Não houve medição durante a Fase VI-b.

Após 146 dias operando sem clorofórmio do afluente (Fase VII-b), nenhum metano foi detectado no biogás, mostrando ter o clorofórmio eliminado completamente a atividade metanogênica. Apesar disso, o rendimento teve uma redução suave para $0,128 \text{ mol H}_2/\text{mol glicerol}$. A inibição das *archaeas* metanogênicas também pode estar concomitantemente associada à elevada COV nessa fase de operação, já que a sobrevivência desse grupo de micro-organismos fica comprometida em COV acima de $15 \text{ kgDQO}/\text{m}^3.\text{d}$ (RITTMANN; MCCARTY, 2001). Não houve nova tentativa de aumento da COV, porque o reator apresentou problemas de entupimento da saída de gás, ocasionado pela formação excessiva de espuma.

O rendimento médio máximo de H_2 foi alcançado durante a operação do RH_3 , de $0,135 \text{ mol H}_2/\text{mol glicerol}$, como mostrado na Figura 5.10, que compara as 3 etapas de operação do RH. Apesar disso, esse valor máximo foi inferior à maioria das pesquisas cuja

única fonte de carbono para produzir H_2 foi o glicerol, utilizando cultura pura ou mista (Tabela 5.1). Isso ocorreu, sobretudo, porque a pH_2 nesta pesquisa esteve acima de 0,3 atm em praticamente toda operação (Tabela 5.5), dificultando a oxidação da ferredoxina, como já mencionado. Expurga com gás inerte, a exemplo do N_2 , é a principal alternativa para sanar esse tipo de problema (NATH; DAS, 2004). Contudo, os custos atrelados ao uso desse gás devem ser considerados.

Figura 5.10 – Rendimento médio máximo alcançado durante as três etapas de operação do reator produtor de hidrogênio (RH).



Nota: RH1, RH2 e RH3 representam as etapas 1, 2 e 3 de operação do RH, na sua devida ordem.

O aumento do pH afluente contribuiu para a redução da carga de sódio aplicada pela solução de NaOH (0,5%) utilizada para regular o pH do reator, porque, se o pH do afluente é maior, menor a quantidade de base bombeada ao reator para manter o pH entre 5,3 e 5,5. Enquanto a concentração média de Na^+ no interior do sistema do RH₁ e RH₂ foi de 5,5 e 4,3 g/L, no RH₃ foi de 3,9 g/L. Apesar de a concentração de sódio dentro do reator ainda ser considerada moderadamente inibitória, reatores de crescimento aderido aumentam a capacidade dos micro-organismos de resistirem ao efeito deletério de compostos tóxicos (BISHOP, 1997).

Em nenhum momento foi observada expurga de lodo na operação do RH₃, o que mostra o bom desempenho do meio suporte na retenção de lodo. Reatores com crescimento aderido apresentam maior capacidade de receber elevadas COVs do que sistemas com crescimento disperso sem que haja problemas de arraste de lodo. Além de aumentar a

aderência, o meio suporte dissipa a energia causada pelo fluxo das bolhas de gás e do escoamento ascendente do líquido. É conhecido, também, que a formação de biofilme aumenta o potencial de reação devido à alta densidade celular (VENKATA MOHAN; VIJAYA BHASKAR; SARMA, 2007). Nestas circunstâncias, a resistência a variações nos parâmetros operacionais do reator é, igualmente, maior (CHAUDHRY; BEG, 1998).

5.3.2 Balanço de massa e consumo de glicerol na produção de H_2

A Tabela 5.9 mostra o balanço de massa, em termos de DQO, realizado a partir dos valores médios de cada variável a cada fase das etapas de operação do reator produtor de hidrogênio (RH). Os resultados dessa tabela mostram que os percentuais de DQO recuperada sempre estiveram próximo de 100%.

De acordo com os resultados da Tabela 5.9, é possível observar que o consumo médio de glicerol oscilou na faixa dos 80% durante toda a operação do RH₃, evidenciando ter o sistema trabalhado em condições de sobrecarga orgânica. Mesmo com essa limitação na degradação do substrato, o rendimento médio aumentou com o passar das etapas, posto que a produção volumétrica de hidrogênio (PVH) aumentou com a elevação da COV, alcançando valor máximo na Etapa VII-a, com 1,6 L H₂/[L reator.d] (Tabela 5.5). Os resultados apresentados por outros pesquisadores corroboram o comportamento observado neste experimento: Dounavis, Ntaikou e Lyberatos (2015) variaram a COV em um reator anaeróbio de leito fixo e observaram que o rendimento aumentou de 0,15 para 0,42 mol H₂/mol glicerol, mesmo com o consumo de substrato diminuindo de 97% para 83%; Shen, Bagley e Liss (2009) aumentaram a COV de um reator anaeróbio do tipo CSTR de 13 para 22 kgDQO/m³.d e constataram ter o percentual de consumo de substrato caído de 100% para 60%, ao passo que o rendimento saltou de 1,3 para 1,8 mol H₂/mol glicose. Isso aconteceu porque a TPV aumentou de 1,9 para 3,2 L H₂/[L afluyente.d].

Tabela 5.9 – Balanço de massa, em termos de DQO, realizado a partir dos valores médios de cada variável a cada fase das etapas de operação do reator produtor de hidrogênio (RH).

Fase	Q afl (L/d)	Conc. de matéria orgânica (gDQO/L)		Produção de gases (L/d)		Carga de DQO (gDQO/d)			Percentual de DQO recuperada
		Afl	Efl	H ₂	CH ₄	Afl	Efl	Biogás (CH ₄ +H ₂) ^a	
RH ₁									
I	8,3	26,6	24,0	0,3	0,3	221,5	199,8	0,98	91%
II	9,7	43,4	42,9	1,4	1,7	420,9	416,2	5,31	100%
III	10,2	58,2	54,0	1,7	2,6	592,1	548,7	7,91	94%
IV	10,1	66,1	58,7	6,8	1,8	665,2	590,9	8,99	90%
V	10,4	74,0	58,2	13,3	0,0	767,2	604,2	8,61	80%
VI	9,0	121,5	118,6	10,5	0,0	1087,2	1061,8	6,89	98%
RH ₂									
I	6,8	37,4	43,3	-	-	253,1	292,8	-	116%
II	8,3	45,4	41,0	0,0	0,8	377,4	341,1	2,16	91%
III	11,8	34,6	42,5	0,1	1,0	409,4	503,5	2,76	124%
IV	17,6	41,9	39,5	0,9	0,2	739,4	695,8	1,19	94%
V	18,5	32,6	32,7	0,8	0,1	603,4	606,4	0,87	101%
RH ₃									
I	1,4	31,1	22,9	0,0	1,8	44,6	32,8	4,78	84%
II	3,8	31,0	28,2	0,0	1,1	117,4	106,9	2,78	93%
III	4,8	35,7	30,6	1,5	0,0	170,6	146,4	1,02	86%
IV	5,7	44,3	42,9	2,6	0,0	254,8	246,7	1,67	98%
V	8,4	47,7	42,4	3,7	0,0	399,0	354,5	2,37	89%
VI-a	12,9	44,9	34,5	15,2	0,0	579,4	444,8	9,86	78%
VI-b	12,3	43,4	37,0	10,6	0,0	535,3	457,0	6,86	87%
VII-a	18,2	36,4	33,7	20,6	0,0	663,0	612,7	13,40	94%

Nota: ^a Considerando 0,386 L CH₄/gDQO e 1,544 L H₂/gDQO, a uma temperatura média ambiente de 28°C.

5.3.3 Operação do reator UASB produtor de CH₄ (RM)

Um reator UASB foi alimentado com efluente do reator produtor de hidrogênio (RH), a fim de produzir metano a partir dos ácidos orgânicos e álcoois dissolvidos nesse efluente e, por conseguinte, aumentar o aproveitamento energético do glicerol residual. O efluente do RH foi diluído em água da torneira em quantidade suficiente para manter a COV desejada. A Tabela 5.10 apresenta um resumo das variáveis monitoradas durante a operação do RM, utilizando valores médios para cada parâmetro, seguidos do desvio padrão.

A Figura 5.11 apresenta a variação de COV, DQO afluente e efluente, eficiência de remoção de matéria orgânica e produção diária de biogás em função do tempo de operação. A COV do reator produtor de CH₄ foi aumentada gradualmente, buscando alcançar a maior COV possível para chegar à maior quantidade de glicerol tratado por volume de reator. Na maior parte do tempo, a COV medida esteve próxima ao valor desejado, mas alguns fatores contribuíram para a ocorrência de oscilações da COV, tais como, as variações na vazão afluente do RM e no valor da DQO do efluente do RH.

Ao alcançar COV teórica de 10 kgDQO/m³.d, o reator apresentou acumulação de AGVs, diminuindo o pH de 7,0 para 5,8, fazendo a eficiência de remoção média de matéria orgânica diminuir de 94% para 73% (Tabela 5.10), chegando a atingir 56% no 63° dia de operação (Figura 5.11). Ao mesmo tempo, a produção de biogás caiu de 50 para 15 L/d. Esse problema pode ter ocorrido porque a COV medida aumentou de 6,4 para 11,5 kgDQO/m³.d, o que pode ter causado uma sobrecarga orgânica. Após esse problema, decidiu-se por reduzir a COV até as variáveis operacionais (principalmente eficiência de remoção de matéria orgânica e produção de biogás) voltarem às condições de estabilidade. Após 15 dias sob 7,5 kgDQO/m³.d, houve uma nova tentativa de aumento gradual da COV. Esse aumento ocorreu com sucesso até alcançar 20 kgDQO/m³.d (COV média de 19 kgDQO/m³.d).

A COV máxima alcançada nesta pesquisa é considerada alta para reatores UASB, já que reatores desse tipo são operados tipicamente com, no máximo, 15 kgDQO/m³.d (RITTMANN; MCCARTY, 2001). A acidogênese ocorrida no RH foi o principal responsável por permitir que o RM operasse sob COV elevada, pois separou a fase acidogênica das fases acetogênica e metanogênica.

Tabela 5.10 – Resumo das variáveis monitoradas em cada fase de operação do reator metanogênico (RM), utilizando valores médios seguidos do desvio padrão (Continua).

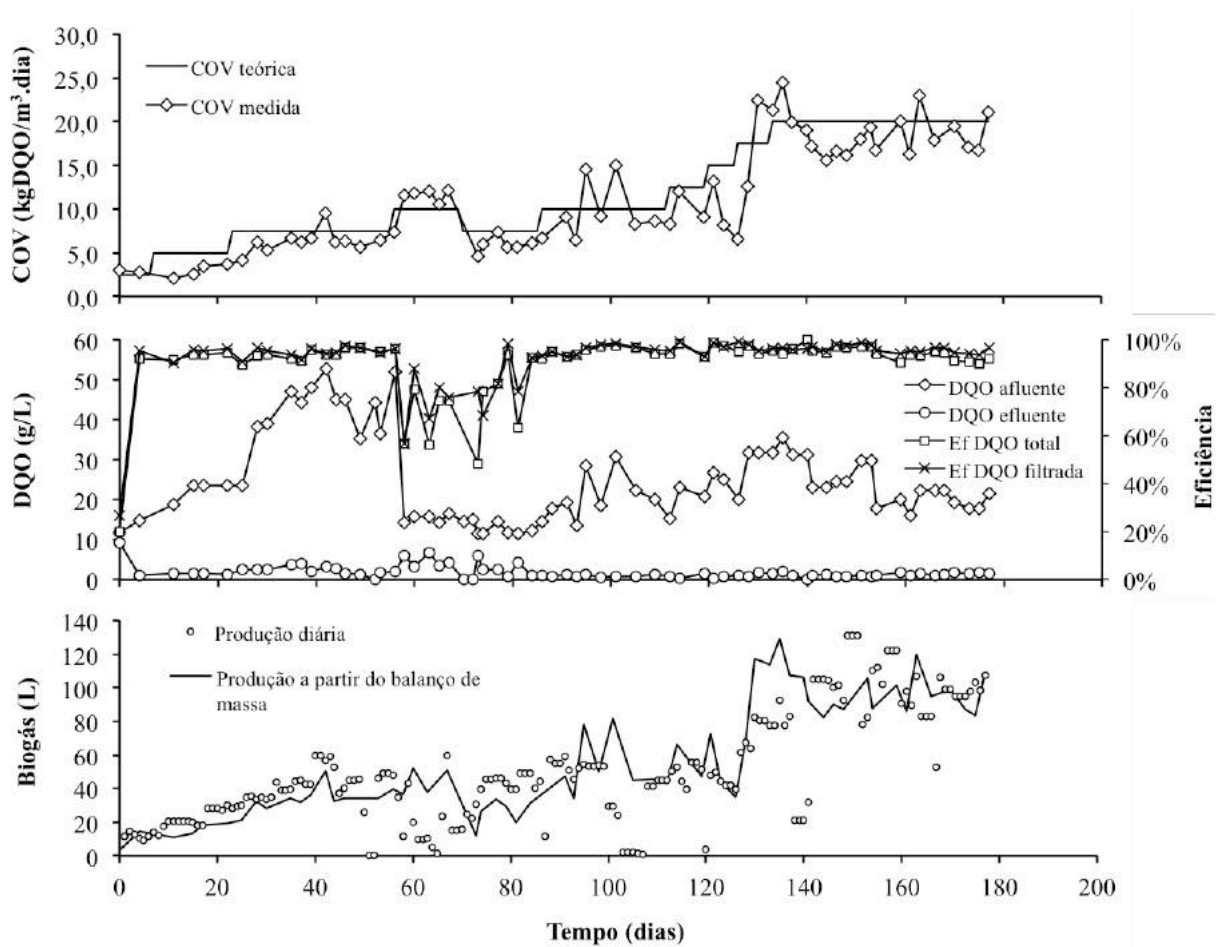
Fase	Tempo acumulado^a	Duração^a	COV^b planejada	COV medida	Vazão afluyente^c	DQO Afl^d	DQO Efl^e	Ef^f	pH
I	6	6	2,5	2,9±0,1	3,0±0,4	13,3±2,2	5,3±5,8	56,1±51,0	7,5±0,2
II	22	16	5,0	2,9±0,7	2,2±0,5	22,3±2,3	1,4±0,1	93,4±1,3	7,4±0,1
III	55	33	7,5	6,3±1,3	2,3±0,4	41,5±7,6	2,6±0,9	93,6±2,3	7,4±0,5
IV	69	14	10,0	10,9±1,8	10,1±2,5	21,4±15,0	4,4±1,8	72,8±15,0	7,2±0,2
V	85	16	7,5	5,9±0,9	7,3±0,4	12,9±1,6	2,9±2,0	76,2±17,5	7,0±0,5
VI	111	26	10,0	9,7±3,3	7,0±1,1	20,5±5,8	1,0±0,3	94,9±1,9	7,7±0,7
VII	119	8	12,5	9,8±2,0	6,6±1,3	19,7±3,9	0,9±0,5	95,1±2,8	7,8±1,1
VIII	125	6	15,0	10,6±3,5	4,8±1,9	25,8±1,2	0,5±0,3	98,0±1,1	7,9±0,3
IX	132	7	17,5	13,8±8,0	7,8±2,3	27,8±6,7	1,3±0,6	95,4±1,7	7,5±0,2
X	177	45	20,0	18,7±2,5	12,4±2,4	24,1±5,6	1,3±0,5	94,3±2,6	7,5±0,3
Fase	Vol. biogás^g	Vol. CH₄^h	PEMⁱ	PVM^j	Alcalinidade^k	AGV^l	TDH^m	TRCⁿ	COL^o
I	11,8±1,8	8,8±1,3	0,09±0,1	0,5±0,2	3,8±0,0	0,1±0,0	120±12	198±105	0,2±0,0
II	21,5±5,4	16,0±4,0	0,39±0,1	1,1±0,3	4,8±0,2	0,6±0,5	169±41	470±42	0,2±0,1
III	39,5±13,5	29,4±10,1	0,34±0,0	2,0±0,7	4,6±0,8	0,7±0,2	158±26	640±511	0,3±0,1
IV	21,9±17,6	16,3±13,1	0,13±0,1	1,1±0,9	3,8±1,5	1,4±0,4	44±37	274±473	1,0±0,5
V	39,1±10,3	29,1±7,7	0,35±0,0	2,0±0,5	4,5±1,5	1,0±0,2	49±3	46±39	0,3±0,1
VI	37,1±20,7	27,6±15,4	0,23±0,1	1,9±1,0	5,0±1,5	0,9±1,0	53±12	373±255	0,6±0,2
VII	49,3±5,7	36,7±4,2	0,26±0,0	2,5±0,3	5,8±0,0	0,3±0,0	57±16	303±148	0,5±0,1

Tabela 5.10 – Resumo das variáveis monitoradas em cada fase de operação do reator metanogênico (RM), utilizando valores médios seguidos do desvio padrão (Conclusão).

VIII	38,2±17,1	28,5±12,7	0,23±0,1	1,9±0,9	5,3±3,1	0,4±0,2	95±69	-	0,5±0,2
IX	68,1±15,3	50,6±11,4	0,25±0,1	3,4±0,8	9,0±0,1	1,1±0,4	50±15	185±159	0,8±0,3
X	92,1±26,7	68,6±19,9	0,25±0,1	4,6±1,3	9,2±1,2	1,6±0,6	30±6	109±107	1,1±0,2

Notas: ^a dias; ^b kgDQO/m³.d; ^c L/d; ^d DQO afluyente, em g/L; ^e DQO total do efluente, em g/L; ^f Eficiência de remoção de DQO, em %; ^g produção de biogás, em L/d; ^h produção de metano, em L CH₄/d, considerando 74% de CH₄ no biogás; ⁱ produção específica de metano, em m³CH₄/kgDQO; ^j produção volumétrica de metano, em L CH₄/[L reator.d]; ^k em gCaCO₃/L; ^l concentração de ácidos graxos voláteis totais, em g/L; ^m tempo de detenção hidráulica, em horas; ⁿ tempo de retenção celular, em dias; ^o carga orgânica aplicada ao lodo, em kgDQO/kgSV.d.

Figura 5.11 – Variação da COV, DQO afluente e efluente, eficiência de remoção de DQO e produção diária de biogás em função do tempo de operação.



Durante a operação do RM, o valor médio da relação AGV/alcalinidade manteve-se sempre abaixo de 0,3, indicando estabilidade do sistema (RIPLEY; BOYLE; CONVERSE, 1986) (Tabela 5.10). Entretanto, o valor dessa relação chegou a medir 0,41 no 60° dia de operação, justamente quando o reator sofreu sobrecarga orgânica (Etapa IV), denotando ter havido acúmulo de ácidos orgânicos nesse período. Com a redução da COV, o valor da relação AGV/alcalinidade baixou para 0,13. Ao final da operação, a quantidade de bicarbonato de sódio adicionada ao afluente foi de, apenas, 0,3 gNaHCO₃/gDQO. Provavelmente, o fosfato presente no afluente do RM, remanescente da suplementação nutricional do RH, contribuiu, de igual maneira, com o tamponamento do sistema.

Ao final da operação, o reator foi capaz de remover 94% de matéria orgânica e produzir 92 L de biogás por dia (valor bastante próximo ao calculado por meio do balanço de massa), sendo 74% dele composto por CH₄. Nas primeiras fases de operação, a produção

específica de metano (PEM) chegou a ser de $0,39 \text{ m}^3\text{CH}_4/\text{kgDQO}$, mas, com o aumento da COV, esse valor manteve-se entre 0,23 e $0,26 \text{ m}^3\text{CH}_4/\text{kgDQO}$ (Tabela 5.10). Ao final da operação do RM, a PEM foi de $0,25 \text{ m}^3\text{CH}_4/\text{kgDQO}$. Considerando que, a 28°C (temperatura ambiente média), é possível produzir $0,39 \text{ m}^3\text{CH}_4/\text{kgDQO}$, a PEM na Fase II (COV média de $2,9 \text{ kgDQO}/\text{m}^3.\text{d}$) alcançada foi equivalente a 100% do valor máximo teórico. Já na fase final, esse percentual foi de 64%. A redução do valor da PEM pode ser atribuída a uma limitação da capacidade metabólica das *archaeas* metanogênicas, que significa que esse grupo de microorganismos não conseguiu manter o seu poder de conversão da matéria orgânica afluyente em metano com o aumento da COV, mas a partir da Fase VI, as mudanças no valor de PEM foram muito baixas. Mesmo operando sob COV média de $19 \text{ kgDQO}/\text{m}^3.\text{d}$, esse valor foi levemente superior ao encontrado por Dounavis et al. (2016). Os pesquisadores utilizaram, também, glicerol residual como substrato para produzir H_2 e CH_4 em série e alcançaram $0,24 \text{ m}^3\text{CH}_4/\text{kgDQO}$ quando o CSTR metanogênico foi alimentado a uma COV máxima de apenas $3,7 \text{ kgDQO}/\text{m}^3.\text{d}$.

A Tabela 5.11 compara o valor da PEM alcançada a partir da biodigestão de efluente de reator produtor de H_2 alimentado com glicerol (RHAG) com os valores obtidos em pesquisas que utilizaram o glicerol residual como única fonte de carbono para produzir metano. Os resultados dessa tabela mostram ser a PEM a partir do efluente do RHAG apenas maior do que a PEM a partir de glicerol residual se a COV utilizada não ultrapassar $2,9 \text{ kgDQO}/\text{m}^3.\text{d}$. Quando o RM foi operado em COV de $18,7 \text{ kgDQO}/\text{m}^3.\text{d}$, a PEM foi inferior ao valor encontrado em pesquisas cujo substrato foi o glicerol. Apesar da redução da PEM, a produção volumétrica de metano aumentou com o a elevação da COV, alcançando valor máximo em COV real de $18,7 \text{ kgDQO}/\text{m}^3.\text{d}$ (Etapa X), com $4,6 \text{ L CH}_4/[\text{L reator.d}]$ (Tabela 5.10).

Um balanço de massa foi realizado a partir dos valores médios de vazão afluyente, concentrações de DQO afluyente e efluente, taxa de produção celular e produção de metano e está mostrada na Tabela 5.12. De acordo com essa tabela, é possível observar ter o percentual de matéria orgânica recuperada variado entre 51% e 113%. Na maior parte da pesquisa, o erro percentual foi de, no máximo, 28%. Esse valor de erro pode ser atribuído à variáveis na taxa de crescimento celular, acúmulo de matéria orgânica na forma de biopolímeros intracelulares, produtos microbianos solúveis (SMPs), perdas de metabólitos por evaporação (sobretudo, álcoois e ácidos graxos de cadeia mais curta), dissolução de gases (não considerada), além da imprecisão analítica de alguns dos métodos empregados, podem ter contribuído para os erros

encontrados. Outrossim, podem ter cooperado aceptores alternativos de elétrons, como o sulfato, presente no meio basal.

Tabela 5.11 – Produção específica de metano (PEM) alcançada em pesquisas que utilizaram efluente de reator produtor de H₂ alimentado com glicerol residual (RHAG) e que utilizaram apenas o glicerol residual como substrato.

Referência	Reator	Substrato	COV ^a	PEM ^b
Este estudo	UASB	Efluente de RHAG	2,9	0,39
Este estudo	UASB	Efluente de RHAG	18,7	0,25
1	CSTR	Efluente de RHAG	1,6	0,24
2	CSTR piloto	Glicerol residual	2,2	0,40
3	UASB	Glicerol residual	10,6	0,38
4	UASB (semi-contínuo)	Glicerol residual	6,5	0,31
5	CSTR	Glicerol residual	0,3	0,30
6	RBEB*	Glicerol residual	-	0,30
1	CSTR	Glicerol residual	0,8	0,28
7	RBEB	Glicerol residual	-	0,22

¹ Dounavis et al. (2016); ² Kolesárová et al. (2011); ³ Viana (2011); ⁴ Hutňan et al. (2013)
⁵ Vlassis et al. (2012); ⁶ Siles López et al. (2009); ⁷ Viana et al. (2012a); ^a carga orgânica volumétrica, em kgDQO/m³.d; ^b produção específica de metano, em m³CH₄/kgDQO; * reator em batelada em escala de bancada.

5.3.4 Potencial energético a partir do H₂ e CH₄ produzidos a partir de glicerol

A partir dos volumes de H₂ e CH₄ produzidos em laboratório, pode-se realizar uma estimativa do potencial energético, tomando como base uma usina de biodiesel capaz de gerar 25 m³ glicerol/d. Os dados de laboratório utilizados nesse cenário foram escolhidos com base nos valores médios obtidos durante a COV que proporcionou as maiores produções volumétricas de H₂ e de CH₄. Enquanto a maior produção volumétrica de H₂ (1,6 L H₂/L reator.d) aconteceu com COV 50,1 kgDQO/m³.d (Fase VII-a), para CH₄ o valor máximo (4,6 L CH₄/L reator.d) ocorreu com COV 18,7 kgDQO/m³.d (Fase X). A Tabela 4.12 apresenta os dados utilizados para compor o cenário de produção de energia a partir de hidrogênio e metano e os resultados de estimativa energética a partir do glicerol gerado por uma usina em escala real.

Tabela 5.12 – Balanço de massa realizado a partir dos valores médios de vazão afluente, concentrações de DQO afluente e efluente, taxa de produção celular e produção de metano.

Fase	Q_{Afl}^a	DQO_{Afl}^b	$DQO_{Efl}^{Tot\ c}$	$DQO^X\ d$	$DQO_{CH_4}^e$	DQO_{rec}^f	$\%DQO_{rec}^g$
I	3,0	40,0	15,9	4,4	22,7	42,9	107%
II	2,2	49,7	3,2	5,5	41,2	49,8	100%
III	2,3	96,1	6,0	10,6	75,7	92,2	96%
IV	10,1	215,8	44,2	23,7	42,0	109,9	51%
V	7,3	93,6	20,7	10,3	75,0	106,1	113%
VI	7,0	142,8	6,9	15,7	71,0	93,6	66%
VII	6,6	130,2	6,1	14,3	94,5	114,9	88%
VIII	4,8	124,6	2,5	13,7	73,3	89,5	72%
IX	7,8	216,0	9,8	23,8	130,5	164,1	76%
X	12,4	298,4	15,8	32,8	176,6	225,2	75%

Notas:

^a vazão afluente, em L/d;

^b carga de DQO afluente, em gDQO/d;

^c carga de DQO efluente total, em gDQO/d;

^d massa de lodo produzida, em termos de DQO, em gDQO/d (calculada pelo produto $DQO_{Afl} \times Y_{x/s}$, onde $Y_{x/s}$ é a taxa de produção celular, e foi adotada como sendo igual 0,11 kgSV/kgDQO, seguindo recomendações de Metcalf e Eddy (2003);

^e volume diário de CH_4 (V_{CH_4}), expresso em g DQO (calculado através da seguinte equação:

$$\frac{V_{CH_4} \times \%CH_4}{V_{28^\circ C}^{DQO}} \times 100, \text{ onde } \%CH_4 \text{ é o percentual de metano no biogás; } V_{28^\circ C}^{DQO} \text{ é o volume de metano}$$

equivalente a cada grama de DQO digerida anaerobiamente a 28°C, ou seja, 0,386 L CH_4 /gDQO);

^f matéria orgânica recuperada, termos de DQO (calculada por $DQO_{Efl}^{Tot} + DQO^X + DQO_{CH_4}$);

^h percentual de DQO recuperada (calculada por DQO_{rec}/DQO_{Afl}).

Tabela 5.13 – Dados utilizados para compor o cenário de produção de energia a partir de hidrogênio e metano e os resultados de estimativa energética a partir do glicerol gerado por uma usina em escala real. (Continua)

Hidrogênio	
Dados de laboratório	
DQO do glicerol (g/L)	1374
Volume diário de H ₂ (L/d)	20,6
Vazão afluyente (L/d)	18,2
Concentração de DQO afluyente (g/L)	36,4
Carga orgânica (gDQO/d)	662,5
Produção específica de H ₂ (L H ₂ /kg DQO)	31,1
Dados da usina de biodiesel	
Vazão de glicerol (m ³ /d)	25
Carga orgânica (kg DQO/d)	34350
Volume do reator (m ³)	687
Volume diário de H ₂ produzido (m ³ H ₂ /d)	1068
Conversão em energia	
PCI do H ₂ a 25°C e 1 atm (MJ/m ³ H ₂)	10,71
Energia produzida (MJ/d)	11437
Produção volumétrica (MJ/m ³ _{reator} .d)	17
Eficiência do motogerador	40%
Energia produzida (kWh/d)	1153
Consumo médio familiar (kWh/mês)	117
Consumo médio familiar (kWh/d)	3,9
Famílias abastecidas	296

Tabela 5.13 – Dados utilizados para compor o cenário de produção de energia a partir de hidrogênio e metano e os resultados de estimativa energética a partir do glicerol gerado por uma usina em escala real. (Conclusão)

Metano	
Dados de laboratório	
Volume diário de CH ₄ (L/d)	68,60
DQO afluente (g/L)	24,1
Vazão afluente (L/d)	12,4
Carga orgânica (g DQO/d)	298,8
Produção específica de metano (L CH ₄ /kgDQO)	229,6
Concentração de DQO do efluente do RH (g/L)	33,7
Vazão efluente do RH (m ³ /d)	944
Dados da usina de biodiesel	
Vazão afluente ao RM (m ³ /d)	1320
Carga orgânica afluente ao RM (kg DQO/d)	44470
Volume do reator (m ³)	2378
Volume diário de CH ₄ produzido (m ³ /d)	10208
Conversão em energia	
PCI do CH ₄ a 25°C e 1 atm (MJ/m ³ CH ₄)	36,03
Energia produzida (MJ/d)	367836
Produção volumétrica (MJ/m ³ _{reator.d})	155
Eficiência do motogerador	40%
Energia produzida (kWh/d)	40871
Consumo médio familiar (kWh/mês)	117
Consumo médio familiar (kWh/d)	3,9
Famílias abastecidas	10480
Potencial energético do sistema de duas fases em série	
Total de energia produzida (MJ/d)	379273
Total de energia térmica teórica (kWh/d)	42141

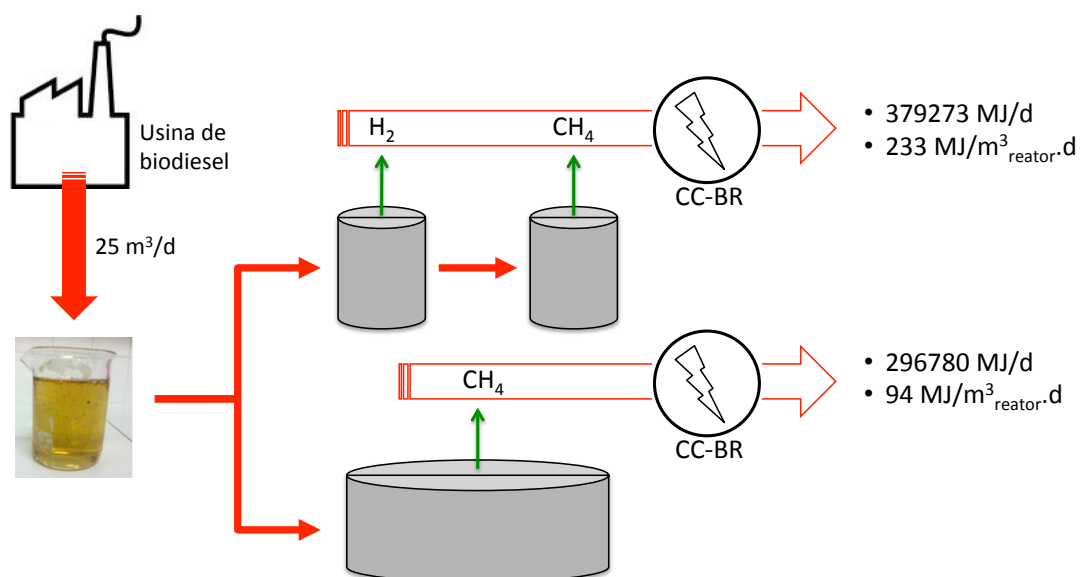
Para essa simulação, foi utilizado um sistema de co-geração de energia elétrica utilizando ciclo combinado Brayton e Rankine. Esse sistema utiliza caldeiras para geração de energia elétrica e térmica e tem a vantagem de ter uma eficiência relativamente elevada, de 40% (MESSERLIE; STROTHER, 1984). Devido ao baixo rendimento de H₂ obtido a partir

do glicerol residual, a quantidade de energia gerada a partir deste gás foi bastante inferior à energia produzida a partir do CH₄, resultando em 379273 MJ/d. No fim, o sistema de duas fases foi capaz de produzir 42141 kWh/d, o suficiente para abastecer 10.806 famílias do Nordeste brasileiro, considerando um consumo médio familiar de 117 kWh/mês.

Viana (2011) simulou, igualmente, a quantidade de energia gerada a partir dos dados de um reator único produtor de CH₄ de 14,85 L, digerindo glicerol residual a 10 kgDQO/m³.d. A quantidade de metano gerada por este autor foi o suficiente para produzir 296780 MJ/d de energia, utilizando a mesma quantidade de glicerol gerada em escala industrial (25 m³) como alimento para um reator UASB. Utilizando ciclo combinado Brayton e Rankine, essa energia é suficiente para abastecer 8.455 famílias.

Ao comparar os resultados de estimativa energética entre o uso de um sistema de duas fases (presente trabalho) e um reator único produtor de CH₄ (VIANA, 2011), é possível observar uma superioridade do sistema de duas fases, tanto em termos de energia produzida como em termos de energia por unidade de volume de reator. Enquanto o sistema de duas fases produziu 233 MJ/m³_{reator}.d, um sistema único de produção de metano é capaz de gerar apenas 94 MJ/m³_{reator}.d. Ainda com base na simulação exposta na Tabela 5.13, observa-se que o volume total dos reatores de duas fases (2388 m³) é inferior ao volume do reator único de produção de metano (3150 m³), baseado nos parâmetros determinados por Viana (2011). Isso se reflete em redução de custos de construção. No tocante à eficiência de remoção de matéria orgânica, um sistema em duas fases é, em geral, mais vantajoso do que um sistema com um único reator (KE; SHI; FANG, 2005). O esquema ilustrado na Figura 5.12 mostra a quantidade estimada de energia produzida a partir da digestão anaeróbia de glicerol residual, tanto para um sistema de duas fases (H₂ e CH₄) como para sistema com único reator (apenas CH₄).

Figura 5.12 – Esquema mostrando a quantidade estimada de energia produzida a partir da digestão anaeróbia de glicerol residual, tanto para um sistema de duas fases (H_2 e CH_4) como para sistema com único reator (apenas CH_4).



5.4 Conclusões

Este trabalho avaliou o uso de dois reatores em série para produzir hidrogênio e metano a partir de glicerol proveniente da indústria de biodiesel. Com base nos resultados, foi possível chegar às seguintes conclusões:

- o reator UASB produtor de hidrogênio (RH) com meio suporte, alimentado com glicerol residual, pode ser operado estavelmente a 50 kgDQO/m³.d, DQO afluente de 36,4 g/L e pH 5,4. Com esses parâmetros operacionais, o RH foi capaz de produzir 46 L biogás/d, sendo 51% composto por H₂, o que se reflete em um rendimento de 0,135 mol H₂/mol glicerol e uma produção volumétrica de 1,6 L H₂/L reator.d;
- o uso de clorofórmio a 0,05% (v/v) foi eficiente em inibir a metanogênese em apenas 16 dias de operação do RH, sob uma COV de apenas 12,8 kgDQO/m³.d. Após a retirada total do clorofórmio do afluente, o percentual de metano no biogás permaneceu nulo, indicando ter o clorofórmio inibido permanentemente as *archaeas* metanogênicas;
- o meio suporte foi capaz de reter a biomassa no sistema e sanar os problemas de

expulsão de lodo ocorridos quando não havia nenhum mecanismo artificial de retenção de biomassa;

- os principais metabólitos formados durante a produção de H_2 a partir de glicerol residual foram o 1,3-PPD e o ácido propiônico, sendo este consequência direta da elevada pressão parcial de H_2 . Em COV abaixo de $9,0 \text{ kgDQO/m}^3\cdot\text{d}$, ocorreu uma produção de até $1,7 \text{ g ácido caproico/L}$;
- o reator UASB produtor de metano (RM), alimentado com efluente diluído do RH, pode ser operado, estavelmente, a $2,9 \text{ kgDQO/m}^3\cdot\text{d}$, DQO afluente de $22,3 \text{ g/L}$ e pH 7,4. Com esses parâmetros operacionais, o RM foi capaz de produzir 22 L biogás/d , sendo 74% composto por CH_4 , acarretando uma produção específica de metano (PEM) igual a $0,39 \text{ m}^3CH_4/\text{kgDQO}$. A maior produção volumétrica ($4,6 \text{ L } CH_4/[\text{L reator}\cdot\text{d}]$) foi alcançada a $18,7 \text{ kgDQO/m}^3\cdot\text{d}$, com DQO afluente de $24,1 \text{ g/L}$ e pH 7,5. Com esses parâmetros operacionais, o RM foi capaz de produzir 92 L biogás/d , sendo 74% composto por CH_4 ;
- tomando como base uma usina de biodiesel que produz $25.000 \text{ L glicerol/d}$ e comparando os resultados de laboratório obtidos no presente experimento e em Viana (2011), é possível afirmar que um sistema de duas fases que produz H_2 e CH_4 em série é capaz de gerar 379273 MJ/d , que é superior à quantidade de energia gerada por um sistema único de produção de CH_4 (296780 MJ/d). Além disso, o sistema de duas fases é capaz de produzir mais energia por unidade de volume de reator ($233 \text{ MJ/m}^3_{\text{reator}}\cdot\text{d}$) em relação ao sistema único de produção de CH_4 ($94 \text{ MJ/m}^3_{\text{reator}}\cdot\text{d}$).

6 PRODUÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA MÉDIA VIA DIGESTÃO ANAERÓBIA DE GLICEROL RESIDUAL USANDO CULTURA MISTA BIOAUMENTADA

6.1 Introdução

O glicerol é um subproduto do processo de produção de biodiesel, combustível derivado da reação de transesterificação de óleos vegetais e gordura animal (LO et al., 2013). Apesar do glicerol residual ser usado pela indústria química, em breve o aumento da demanda por biodiesel levará a um excesso desse subproduto e, conseqüentemente, se tornará um passivo ambiental. A cada 10 kg de biodiesel produzido, são gerados cerca de 1 kg glicerol residual (YANG; HANNA; SUN, 2012). De acordo com a Organização para Desenvolvimento e Cooperação Econômica (OECD) e a Organização de Agricultura e Alimentos das Nações Unidas (OECD/FAO, 2015), com base na produção de biodiesel, estima-se que 3.200.000 toneladas de glicerol foram geradas em 2015 em todo o mundo. A previsão para 2024 é um aumento para 3.700.000 toneladas, o que pode diminuir a viabilidade ambiental desse combustível renovável se novos usos não forem encontrados para o glicerol residual.

O glicerol puro pode ser utilizado nas indústrias de cosméticos, medicamentos, alimentos e produtos químicos (WANG et al., 2001). O glicerol proveniente da indústria de biodiesel (glicerol residual) parece ser um substrato promissor para processos biológicos por causa da sua elevada concentração de matéria orgânica (aproximadamente 1260 g de demanda química de oxigênio [DQO]/L, de acordo com Viana et al. (2012). Além disso, o glicerol residual é um substrato com alta disponibilidade e baixo custo de mercado. Diversos experimentos comprovaram que é possível produzir energias renováveis a partir de glicerol, a exemplo do hidrogênio (LO et al., 2013), metano (VIANA et al., 2012a), etanol (OH et al., 2011) e butanol (MOON et al., 2011) e uma variedade de produtos químicos de valor agregado, tais como 1,3-propanodiol (LI et al., 2013), 2,3-butanodiol (BIEBL et al., 1998), ácidos acético, butírico, fórmico (FORREST; SIERRA; HOLTZAPPLE, 2010), lático (POSADA; RINCÓN; CARDONA, 2012) e propiônico (TEMUDO et al., 2008).

Ácidos graxos de cadeia média (AGCM), isto é, ácidos orgânicos contendo entre 6 e 12 carbonos, têm sido utilizados na produção de fragrâncias, medicamentos, aditivos

alimentares, antimicrobianos, lubrificantes borracha e corantes (ANGENENT et al., 2016). O ácido caproico, um AGCM com 6 carbonos, é um precursor para síntese de biocombustíveis (AGLER et al., 2012) e aromatizantes (BUDAVARI, 1989) e pode ser utilizado como suplemento alimentar de aves e suínos para controle de doenças entéricas (BOYEN et al., 2008).

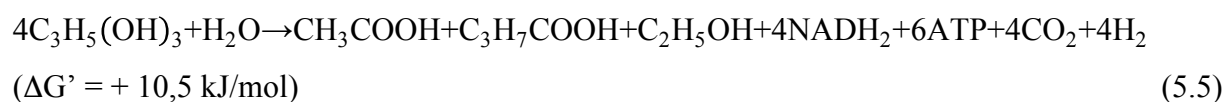
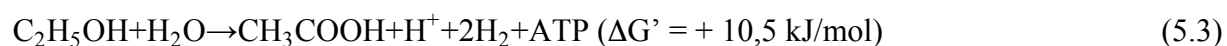
Tradicionalmente, o ácido *n*-caproico é produzido a partir da plataforma petroquímica. Entretanto, a síntese biológica pode ser uma alternativa ambientalmente amigável. Recentemente, Steinbusch et al. (2011) relataram a produção de ácidos caproico (8,2 g/L) e caprílico (0,32 g/L) a partir de acetato/etanol ou acetato/hidrogênio utilizando cultura mista de características granulares proveniente de um reator UASB tratando efluente de indústria cervejeira. Agler et al. (2012) utilizaram um reator anaeróbio de 5 L associado a um sistema de extração de ácido caproico em linha para diminuir os riscos de toxicidade pelo excesso do próprio ácido caproico. Esses autores utilizaram cultura mista como inóculo e alcançaram uma taxa de produção de ácido *n*-caproico igual a 2,1 g/[L_{reator}.d].

A produção biológica de ácido *n*-caproico ocorre por alongamento de cadeia onde ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) são convertidos em AGCM (GROOTSCHOLTEN et al., 2013a) através da rota metabólica da oxidação- β reversa (AGLER et al., 2011). As Equações 6.1 e 6.2 mostram a conversão de ácido acético e etanol a ácido butírico e, depois, a ácido caprílico (GROOTSCHOLTEN et al., 2013a). Embora seja termodinamicamente favorável, essa reação não é energeticamente auto-suficiente e não há formação de adenosina trifosfato (ATP) suficiente para que a reação ocorra. Dessa forma, o ATP tem de ser obtida a partir da oxidação do etanol, como descrito na Equação 6.3 (SPIRITO et al., 2014). Essa reação, por sua vez, gera energia suficiente para as que as reações das Equações 6.1 e 6.2 ocorram 5 vezes, gerando uma energia livre de Gibbs ($\Delta G'$) de -366,0 kJ para 5 mols do produto, como mostrado na Equação 6.4.

Se outros substratos como glicerol são a única fonte de carbono, seria necessário uma fermentação preliminar para a produção dos precursores de alongamento da cadeia (ácido acético e/ou ácido butírico, e etanol), como mostrado na Equação 6.5 (ZENG, 1996). Vários investigadores demonstraram altos rendimentos de ácidos acético, butírico e etanol a partir do glicerol residual (FORREST; SIERRA; HOLTZAPPLE, 2010; ITO et al., 2005).

A Equação 6.5 também mostra que a fermentação do glicerol é capaz de gerar ATP, que pode ser utilizado para fornecer energia para que as reações das Equações 6.1 e 6.2

ocorram sem a necessidade de o etanol sofrer oxidação. Isso é importante porque aumenta a disponibilidade de doador de elétrons (etanol) no alongamento de cadeia, elevando assim o rendimento do processo.



O micro-organismo mais estudado para produção de ácido caproico é o *C. kluyveri*, apesar de *Megasphaera elsdenii*, *Kluyveromyces marxianus*, *Eubacterium pyruvativorans*, *Eubacterium limosum* e *Rhodospirillum rubrum* também serem capazes de sintetizar ácido caproico por alongamento de cadeia (GENTHNER; DAVIS; BRYANT, 1981; GEST, 1995; RODDICK; BRITZ, 1997; WALLACE et al., 2003). Muitas dessas espécies estão presentes em culturas mistas (DING; TAN; WANG, 2010; HU; DU; XU, 2015; KENEALY; CAO; WEIMER, 1995; WEIMER; NERDAHL; BRANDL, 2015). No entanto, micro-organismos fermentadores são necessários para produzir os precursores do alongamento de cadeia (ácido acético ou butírico) (GROOTSCHOLTEN et al., 2014). Estes também estão presentes em culturas mistas.

O processo de alongamento da cadeia carboxílica pode ser potencializado pela adição de uma espécie ou grupo específico de micro-organismo a uma cultura mista, técnica chamada de bioaugmentação. Essa técnica parece ser uma alternativa promissora, já que a combinação de rotas metabólicas do consórcio microbiano e de culturas específicas pode otimizar a taxa de decomposição e de hidrogenação de compostos complexos (HUNG; CHANG; CHANG, 2011), incluindo o glicerol. A produção de metano e hidrogênio tem sido melhorada através de bioaugmentação (TALE; MAKI; ZITOMER, 2015; WANG et al., 2008)

mas não existem pesquisas sobre bioaugmentação de cultura mista para produção de AGCM a partir de glicerol.

A necessidade de se estudar a dinâmica de populações microbianas fez com que surgisse a técnica de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE). O primeiro registro do uso dessa técnica de biologia molecular aconteceu em 1993 em trabalho escrito por Muyzer, Dewaal e Uitterlinden (1993) e, desde então, tem sido amplamente utilizada para analisar a diversidade microbiana de culturas mistas, inclusive quando se deseja avaliar as mudanças na comunidade microbiana durante a síntese de AGCMs (HU; DU; XU, 2015; STEINBUSCH et al., 2011). A partir do perfil da DGGE, é possível se determinar a riqueza, organização funcional (Fo) e diversidade.

A riqueza, expressa em índice de riqueza de Shannon (Rr), representa o número de espécies diferentes e é calculada com base no número total de bandas pelo percentual de gradiente desnaturante necessário para caracterizar a diversidade total. A Fo é determinada com base em curvas de Pareto-Lorenz (MARZORATI et al., 2008) e pode ser definida como a capacidade da comunidade de se organizar em uma distribuição adequada de micro-organismos dominantes e resilientes. Isso é resultado da ação dos micro-organismos, mais adaptados às interações contínuas com o ambiente, que tornam-se dominantes na estrutura da comunidade microbiana. A diversidade tem sido definida em função de dois componentes: i) o número total de espécies presentes, conhecidos como riqueza (Rr) ou abundância das espécies; e ii) a distribuição dos indivíduos entre as espécies, conhecidas como uniformidade ou equidade (DEJONGHE et al., 2001).

Neste trabalho, a rota metabólica biológica de alongamento da cadeia foi usada para a produção biológica de ácidos AGCM a partir de glicerol utilizando cultura. O processo foi avaliado variando-se a fonte de inóculo (cultura mista provenientes de três diferentes fontes), o efeito de bioaugmentação usando *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 e a concentração de etanol no meio. Não há relatos sobre a produção de AGCMs usando glicerol como substrato nas condições mencionadas anteriormente. Por fim, a comunidade microbiana presente no lodo que alcançou maiores rendimentos de AGCMs foi avaliada utilizando a técnica de DGGE a partir dos produtos da PCR.

6.2 Material e Métodos

6.2.1 Glicerol

O glicerol residual foi fornecido pela usina de biodiesel da empresa Petróleo Brasileiro S.A. – Petrobrás, na unidade denominada UBQ (Usina de Biodiesel de Quixadá), localizada no município de Quixadá, Ceará. A matéria-prima utilizada na produção do biodiesel que gerou o glicerol foi uma mistura de óleo de soja (56%) e sebo bovino (44%). O glicerol possuía uma concentração de matéria orgânica equivalente à 1374 gDQO/L. As características físico-químicas do glicerol eram: matéria orgânica não glicerídea (MONG) 1%; pH 5,5; pureza 81,5%; cinzas 4,8%; umidade 12,71%; metanol 0,03%; teor de NaCl 5,3%; densidade 1255,9 kg/m³.

6.2.2 Inóculo e micro-organismo para bioaugmentação

Foram utilizados três diferentes fontes de inóculo. A Tabela 6.1 mostra a origem de cada inóculo e suas respectivas concentrações de sólidos totais voláteis (STV).

Tabela 6.1 – Inóculos e suas respectivas concentrações de sólidos totais voláteis (STV).

Inóculo	Sigla	[STV] ^a
Lodo flocculento oriundo de reator UASB tratando esgoto sanitário da cidade de Fortaleza, CE	ES	55
Lodo granular oriundo de reator UASB tratando efluente de uma cervejaria localizada em Pacatuba, CE	EC	26
Líquido ruminal extraído do organismo de caprino	LR	34

Nota: ^a concentração de sólidos totais voláteis, em g/L.

O micro-organismo utilizado para bioaugmentação foi o *C. acetobutylicum* ATCC 824. Essa cepa foi adquirida da American Type Culture Collection (ATCC). As culturas de reserva foram mantidas em suspensões em glicerol a 30% e armazenadas a -80° C. O procedimento de ativação da cultura consistiu em transferir a cultura de reserva para um meio de ativação

(Meio Reforçado para *Clostridium* – RCM) a pH 7,0 e incubá-la a 37° C durante 72 h. Em seguida, 10% (v/v) dessa cultura ativada foi transferida para o meio de inoculo (RCM), em pH 7,0, e incubou-se a 37° C por mais 24 h em frasco Schott de 250 mL. As células foram cultivadas em ambiente anaeróbio borbulhando N₂ gasoso no meio líquido e no *headspace* por um minuto. A coleta da cultura foi feita durante a fase log de crescimento (com base na densidade óptica a 600 nm) e usadas para inocular os bioreatores. O RCM continha (g/L): glicose (5,0), extrato de carne (10,0), peptona (10,0), cloreto de sódio (5,0), extrato de levedura (3,0), acetato de sódio (3,0), amido solúvel (1,0), hidrocloreto de L-cisteína (0,5) e ágar (0,5).

6.2.3 Procedimento experimental

Frascos Schott de 250 mL (volume útil de 100 mL) com septos de borracha e tampas de alumínio foram utilizados como biorreatores. O meio de cultura utilizado para suplementação nutricional foi o Meio de Crescimento para *Clostridium* (CGM) contendo de glicerol residual como fonte de carbono. O CGM possuía a seguinte composição (g/L): glicerol (5,0), (NH₄)₂SO₄ (2,0), K₂HPO₄ (2,4), KH₂PO₄ (1,8), Na₂HPO₄ (0,6), MgSO₄ (0,1) e 1 mL/L de solução de elementos traços diluída em HCl 5 M (g/L): FeSO₄.7H₂O (10,0), CaCl₂.2H₂O (2,0), ZnSO₄.5H₂O (2,0), MnSO₄.4H₂O (0,5), CuSO₄.5H₂O (1,0), (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O (0,1) e Na₂B₄O₇.10H₂O (0,02).

Para os ensaios bioaugmentação, cada frasco continha 10,0 g de lodo e meio CGM na presença ou ausência de *C. acetobutylicum* ATCC 824 (10% v/v). Etanol (100 e 200 mM) foi adicionado como doador de elétrons (GROOTSCHOLTEN et al., 2013b). Para inibir a atividade metanogênica, foi adicionado clorofórmio a 0,05% (v/v) (NING et al., 2012). Para assegurar a anaerobiose, cada frasco foi submetido a expurga de ar com N₂ gasoso por um minuto. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. O pH inicial foi ajustado para 6,5. Para os testes sem controle de pH, o valor de pH final foi verificado.

O teste teve duração de 14 dias. O volume de biogás foi medido por deslocamento líquido seguido de cromatografia, seguindo os procedimentos descritos por (SOTO; MENDEZ; LEMA, 1993). Essas determinações eram realizadas nos dias 2, 7 e 14 e consistiam em deslocar, através de uma mangueira delgada de Tygon[®], o volume acumulado de gás para uma garrafa de Mariotte invertida preenchida com solução salina (25 gNaCl/L)

acidificada até pH 2,0 com H₂SO₄. O volume de líquido deslocado para fora da garrafa de Mariotte correspondia ao volume de biogás produzido. Imediatamente após essa etapa, uma alíquota de biogás do *headspace* dos bioreatores foi extraída para a determinação das concentrações de CH₄, H₂ e CO₂ por cromatografia gasosa (CG) (C2V-200 micro GC, Thermo Fisher Scientific, The Netherlands). O CG foi equipado com um detector de condutividade térmica e uma coluna capilar de aço inoxidável (10 m x 0,5 mm). As temperaturas do injetor, forno e detector foram de 120, 60 e 120° C, respectivamente. As concentrações de STV foram medidas de acordo com o Standard Methods (APHA, 2005). No início e no final dos experimentos, foram retiradas alíquotas para análise de ácidos carboxílicos e álcoois em um cromatógrafo líquido de alto desempenho (HPLC) da marca Shimadzu (Japão), utilizando uma coluna Aminex HPX-87H (300 mm x 7,8 mm) (Bio-Rad, EUA) a 65° C, H₂SO₄ a 5 mM em água MiliQ como eluente, vazão de 0,6 mL/min e um detector de índice de refração (Shimadzu, RID-10A, Japão).

As diferenças significativas estatisticamente entre os tratamentos aplicados foram avaliadas por uma análise de variância (ANOVA) de um fator (one-way), utilizando o software Minitab versão 17.0 para Windows 07. Os níveis de significância foram cotados em um nível confiança de 95% ($p \leq 0,05$).

6.2.4 Extração e amplificação de DNA e DGGE

A população microbiana dos bioreatores foi caracterizada por análise de DGGE através da análise da comunidade microbiana antes da montagem do experimento (dia 0) e ao final dos ensaios (dia 14). Amostras de 50 mL de lodo foram centrifugadas a 3000 G durante dois minutos, e os sobrenadantes foram descartados. Os ácidos nucleicos foram extraídos de 0,5 g das amostras de lodo centrifugado utilizando um kit de isolamento de DNA PoweSoil (MO Bio, Carlsbad, CA). A concentração e integridade do DNA foram medidos a 260 nm (NanoDrop 2000 Spectrophotometer, Thermo Scientific, Holanda). A amplificação do DNA ocorreu por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), técnica feita para os domínios *Bacteria* e *Archaea* com iniciadores contendo grampos GC, para posterior análise por DGGE. No domínio *Archaea*, dois conjuntos de primers foram utilizados: 0515R-GC (5'-CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GGG GCG GCA CGG GGG GAT CGT ATT ACC GCG GCT GCT GGC AC-3 ') e 0109F-T (5'- ACT GCT CAG CAC TAA GT-3 '). Já para o domínio *Bacteria*, os primers utilizados foram 1401R (5'-CGG TGT GTA CAA GAC CC-3 ')

e 0968F-GC (5'-CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GGG GCG GCA CGG GGG GAA CGC GAA GAA CCT TAC-3'). Cada mistura de PCR (50 µL) continha desoxinucleosídeo trifosfato a uma concentração de 200 mM, MgCl₂ a 1,5 mM, primer a uma concentração de 0,2 mM, GoTaq DNA polimerase (Promega, Madison, WI, EUA) em 1,25 U, 1 ou 2 µL de padrão de DNA. Foi utilizada água Milli-Q para completar o volume. O tampão incolor de PCR foi fornecido com a enzima. Os fragmentos foram amplificados utilizando o programas distintos para os domínios Bacteria e *Archaea*. Domínio Bacteria: 95° C durante 2 min, 31 ciclos de 95° C durante 30 s, 58° C durante 45 s, 72° C durante 60 s, e 72° C durante 6 min. Domínio *Archaea*: 95° C durante 2 min, 31 ciclos de 95° C durante 30 s, 52° C durante 40 s, 72° C durante 90 s, e 72° C durante 6 min. Os tamanhos dos produtos de PCR foram estimados com um marcador de DNA de 2000 pares de bases Hypperladder II (Bioline, EUA Inc.) em eletroforese em gel de agarose (1,8%) e corante SYBR Safe. Todos os primers foram sintetizados comercialmente por IDT Integrated DNA Technologies (Iowa, EUA). Os amplicons bacterianos foram posteriormente separados por DGGE, utilizando um gradiente desnaturante variando de 57 a 72%.

6.2.5 DGGE e análise de impressões digitais

Um sistema universal de detecção de mutações Bio-Rad D Code™ (Hercules, CA, EUA) foi utilizado para corrida de 8% (m/v) de gel DGGA de poliacrilamida com um gradiente desnaturante variando de 57% a 72%. A electroforese foi conduzida em solução tampão 1x TAE (Tris/ácido acético/EDTA) a 60° C durante 16 h e 85 V para o domínio Bacteria. Para produtos de PCR de *Archaea*, o procedimento ocorreu a 60° C durante 18 h e 65 V. Os géis foram corados durante 1 hora com o corante SYBR Green I (diluição 1:10.000; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) durante 1 h e, subsequentemente, exibido em um transiluminador de UV (Bio Rad Laboratories, Inc.).

Os perfis de DGGE foram alinhados e analisados com o software Gel Compar II (Matemática Aplicada, Sint-Martens-Latem, Bélgica) para obter a matriz de intensidade da banda relativa de acordo com posição da banda. A construção do dendrograma de DGGE foi realizada e o coeficiente de similaridade foi calculado utilizando a correlação de Jaccard.

6.3 Resultados e discussão

6.3.1 Fermentação de glicerol por cultura mista

Diferentes testes foram realizados para investigar a produção de metabólitos com diferentes fontes de inóculos e glicerol como única fonte de carbono e energia. A Tabela 6.2 mostra as concentrações de metabólitos formados após 14 dias de fermentação de glicerol pelos diferentes inóculos testados. Etanol a 100 mM foi utilizado como doador de elétrons/fonte de carbono (GROOTSCHOLTEN et al., 2013b).

Tabela 6.2 – Concentração de metabólitos formados após 14 dias de fermentação de glicerol pelos diferentes inóculos testados, com e sem adição de etanol.

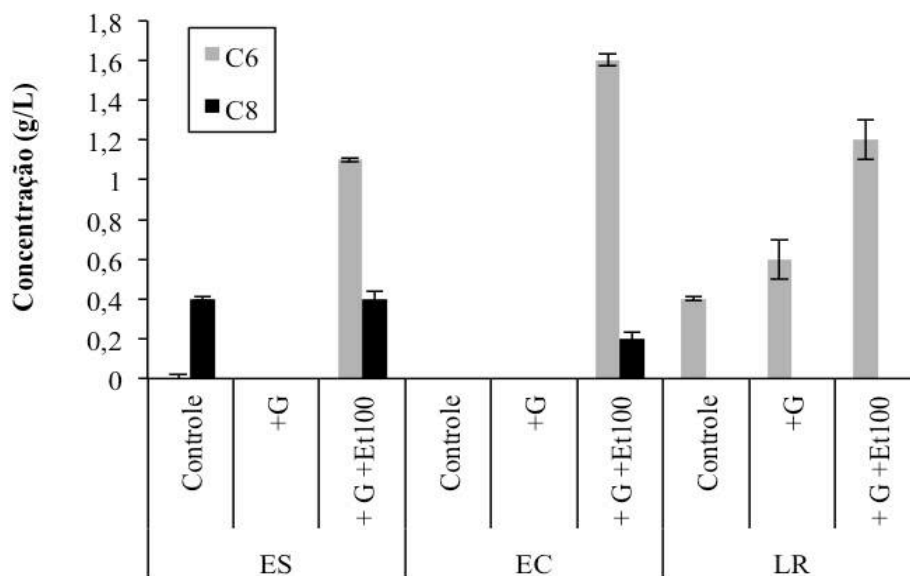
Inóculo	Tratamento	Concentração de metabólitos (g/L)					
		C2	C3	C4	C6	C8	1,3-PPD
ES	Controle	0,2±0,01	0,1±0,01	ND	0±0,02	0,4±0,01	ND
	+G	0,2±0,01	0,5±0,01	0,7±0,01	ND	ND	1±0,05
	+ G +Et ₁₀₀	ND	0,4±0,02	0,3±0,03	1,1±0,01	0,4±0,04	0,6±0,01
EC	Controle	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	+G	0,3±0,01	0,5±0,01	0,6±0,02	ND	ND	0,9±0,02
	+ G +Et ₁₀₀	ND	0,1±0,01	0,7±0,04	1,6±0,3	0,2±0,03	0,6±0,07
LR	Controle	ND	0,2±0,01	ND	0,4±0,01	ND	ND
	+G	0,2±0,03	0,3±0,01	0,3±0,03	0,6±0,1	ND	ND
	+ G +Et ₁₀₀	0,2±0,02	0,1±0,01	0,3±0,03	1,2±0,1	ND	1,0±0,05

Notas: ES: lodo oriundo de reator UASB tratando esgoto sanitário; EC: Lodo granular oriundo de reator UASB tratando efluente de cervejaria; LR: líquido ruminal de caprino; +G: inóculo mais glicerol (5 g/L); +G +Et₁₀₀: inóculo mais glicerol (5 g/L) mais etanol (100 mM); C2, C3, C4, C6 e C8 correspondem aos ácidos acético, propiônico, *n*-butírico, *n*-caproico e *n*-caprilico, respectivamente; 1,3-PPD: 1,3-propanediol.

O glicerol pode ser usado para a produção de 1,3-propanediol (1,3-PPD) (BIEBL et al., 1999). Para todos os inóculos testados, houve produção de 1,3-PPD, que é formado pela via redutora, onde o glicerol sofre desidratação, gerando 3-hidroxi-propionaldeído, pela enzima glicerol desidrogenase, que, por sua vez, é convertido a 1,3-PPD, por meio da 1,3-propanediol oxidoreductase (BIEBL et al., 1999).

A maior produção de AGCMs foi obtido com lodo EC, alcançando 1,6 g C6/L, mas apenas traços de ácido n-caprílico (C8) (0,2 g/L). Comportamento semelhante foi observado por Grootsholten et al. (2013a), que relataram um aumento na concentração de C6 de 1,8 para 2,8 g/L após adição de etanol. A Figura 6.1 mostra a concentração de C6 e C8 ao final dos 14 dias de fermentação de glicerol pelos diferentes inóculos testados, com e sem adição de etanol.

Figura 6.1 – Concentração de ácido caproico (C6) e ácido caprílico (C8) ao final dos 14 dias de fermentação de glicerol pelos diferentes inóculos testados, com e sem adição de etanol.



No presente experimento, o líquido ruminal (LR) foi o único inóculo capaz de produzir ácido n-caproico a partir de glicerol sem adição de etanol, alcançando 0,6 g/L. No entanto, se considerar que o frasco controle, sem matéria orgânica adicionada, produziu 0,4 g/L, é possível assumir que a produção líquida de C6 a partir de glicerol é muito baixa (0,2 g/L). A comunidade microbiana presente no líquido ruminal é naturalmente capaz de produzir ácido n-caproico. Isso deve à elevada densidade populacional de *Clostridium kluyveri* no líquido ruminal (WEIMER; STEVENSON, 2012). Essa espécie é conhecida como uma das poucas espécies capazes de converter eficientemente C2 e C4 em C6 e C8 (WEIMER; STEVENSON, 2012). Outros organismos, como *Eubacterium pyruvativorans*, uma bactéria anaeróbia não-sacarolítica, fermentadora de aminoácidos, presente no líquido

ruminal, também pode ter contribuído para formar caproato. *E. pyruvativorans* é uma espécie de micro-organismo com propriedades metabólicas análogas às do *C. kluyveri* (WALLACE et al., 2003).

A formação de C6 tem sido postulada como uma fermentação secundária da produção biológica de hidrogênio (DING; TAN; WANG, 2010). De acordo com esses investigadores, durante o processo de digestão anaeróbia, quando os micro-organismos metanogênicos são severamente inibidos, as bactérias acidogênicas produtoras de H₂ são favorecidas para converter carboidratos em H₂, ácidos carboxílicos de cadeia curta e álcoois. Ainda de acordo com Ding, Tan e Wang (2010), quando em condições ligeiramente ácidas, como observado no final dos ensaios em batelada, *Clostridium* sacarolíticos tendem a facilitar a produção de álcool e ácidos através da solventogênese. Esses metabólitos favoreceram a síntese de ácido n-caproico. Kenealy, Cao e Weimer (1995), utilizando co-culturas de *C. kluyveri* e espécies celulolíticas de rúmen, relataram produção de ácido n-caproico de 4,6 g/L a partir de etanol e celulose. Steinbusch et al. (2011) mostraram que culturas mistas alimentadas em batelada foram capazes de produzir 8,17 g ácido caproico (C6)/L e 0,32 g ácido caprílico (C8)/L, em pH de 5,5. Grootscholten et al. (2013a) relataram concentração mais elevada de AGCM, com 11,1 g C6/L e 0,9 g C8/L, utilizando etanol e acetato como substrato, entretanto em pH 7,0. É possível que tenha havido um erro analítico nos experimentos de Steinbusch et al. (2011), pois as concentrações de C6 encontradas por esses pesquisadores foram bastante superiores ao valor inibitório, que é de 0,8-0,9 g/L para pH ácido ($\approx 5,5$) (GE et al., 2015; WEIMER; NERDAHL; BRANDL, 2015).

O clorofórmio provou ser muito eficaz em inibir a atividade metanogênica uma vez que a quantidade de metano detectado no biogás foi muito baixa, equivalente a apenas 0,1-0,2% da DQO recuperada. Ning et al. (2012) demonstraram que a adição de 0,05% (v/v) de clorofórmio é capaz de inibir seletivamente as archaeas metanogênicas. O mecanismo de inibição pelo clorofórmio ocorre pela supressão da metil-coenzima M redutase presente apenas nas *archaeas* metanogênicas (HU; CHEN, 2007). Além disso, o clorofórmio pode se ligar aos corrinoides livres (forma análoga e ativa da vitamina B12) na célula microbiana, reduzindo as concentrações destes e bloqueando o funcionamento dessas enzimas (HU; CHEN, 2007). Em todos os testes, os principais componentes do biogás foram H₂ e CO₂. A baixa produção de H₂ (menos de 16 mL) também já era esperada, pois as reações de produção de caproato são predominantemente reações de solventogênese, diminuindo o rendimento de H₂ (DING; TAN; WANG, 2010).

6.3.2 Bioaugmentação com *C. acetobutylicum*

O lodo EC foi o inóculo que produziu a maior quantidade de ácido n-caproico dentre os demais inóculos testados. Em decorrência disso, foram conduzidos testes utilizando lodo EC como inóculo bioaugmentado com *C. acetobutylicum*. Além disso, a concentração de etanol foi aumentada para 200 mM com vista a aumentar a produção de ácido n-caproico. *C. acetobutylicum* ATCC 824 foi escolhido devido à sua capacidade para crescer em uma variedade de carboidratos, fazendo com que a fermentação de muitos resíduos industriais e agrícolas seja possível (EZEJI; BLASCHEK, 2008; QURESHI et al., 2006).

Por exemplo, Ezeji e Blaschek (2008) relataram que, durante a fermentação de diversos açúcares (glicose, manose, arabinose e xilose) por clostrídios solventogênicos, incluindo *C. acetobutylicum* 824, os principais produtos obtidos foram butanol, acetona e etanol. Como clostrídios solventogênicos, *C. acetobutylicum* 824 converte açúcares a acetato, butirato e H₂, para gerar energia para além da ATP glicolítica (LEHMANN; LÜTKE-EVERSLOH, 2011). Ainda de acordo com os últimos autores, isso ocorre principalmente na fase de crescimento exponencial. De acordo com Monot, Engasser e Petitdemange (1984), a produção de C₂ e C₄ por *C. acetobutylicum* é potencializada em pH 6,0. De fato, com base em resultados obtidos por Dams et al. (2016), observou-se que, na faixa de pH 5,5-6,5, os principais produtos formados durante a fermentação de glicerol (concentração variando de 5 a 20 g/L) com *C. acetobutylicum* 824 foram os ácidos acético e butírico. Na rota metabólica fermentativa oxidativa por espécies de *Clostridium*, o glicerol é convertido para formiato, etanol, butirato de acetato através do piruvato (KUBIAK et al., 2012). Estudos mostraram que o ácido n-caproico pode ser formado a partir de etanol e acetato ou etanol e butirato (DING; TAN; WANG, 2010). De acordo com Spirito et al. (2014), a formação de ácido n-caproico a partir de etanol requer ácido n-butírico, que pode ser formado indiretamente a partir de acetato e etanol. Assim, através da adição de *C. acetobutylicum* 824 a uma cultura mista alimentada glicerol, espera-se um aumento da produção de C₆. *C. acetobutylicum* 824 é capaz de produzir ácido acético, ácido butírico e etanol, como demonstrado por Girbal et al. (1995), dependendo das condições nutricionais. De fato, o *C. acetobutylicum* 824 contém a enzima butirato quinase, de atividade específica elevada (HARTMANIS, 1987), que catalisa a formação de butirato a partir de butiril fosfato com concomitante fosforilação de ADP (HARTMANIS; GATENBECK, 1984). No entanto, o mecanismo que envolve a transferase CoA para a formação de butirato pela *C. acetobutylicum* 824 difere daquele realizado pela *C. kluuyveri*. As enzimas fosfotransbutirilase e butirato quinase estão envolvidos na produção de

butirato a partir de butiril-CoA por *C. acetobutylicum* 824 (ANDERSCH; BAHL; GOTTSCHALK, 1983; HARTMANIS; GATENBECK, 1984).

Como já fora mencionado, *C. kluyveri* é o produtor mais conhecido de n-caproico (HU; DU; XU, 2015; KENEALY; CAO; WEIMER, 1995), e algumas similaridades filogenéticas foram encontradas entre esse micro-organismo e outras espécies de *Clostridium*. Söhling e Gottschalk (1996) relataram uma análise molecular em que semelhanças significativas de proteínas *hidrogenases* foram encontradas entre cepas de *C. kluyveri* e outros *Clostridium*, incluindo *C. acetobutylicum* 824.

A Tabela 6.3 mostra os resultados dos testes com bioaugmentação para as duas concentrações de etanol (100 e 200 mM). Usando 100 mM de etanol, a bioaugmentação melhorou a produção dos AGCM. Nesse cenário, o alongamento da cadeia ocorreu e potencializou a síntese de ácidos caproico e caprílico, alcançando concentrações de 3,8 e 1,7 g/L, respectivamente. A bioaugmentação é um fenômeno complexo que envolve diferentes rotas metabólicas de diferentes micro-organismos que agem em sinergismo e, portanto, difícil de ser estudado e elucidado. Entretanto, considerando que *C. acetobutylicum* 824 não possui metabolismo para o alongamento de cadeia (DAMS et al., 2016), é provável que o aumento da produção de C6 e C8 tenha ocorrido por espécies presentes no próprio lodo EC, enquanto que a influência da bioaugmentação se restringiu em aumentar a eficiência na produção dos precursores do alongamento de cadeia (ácido acético, ácido butírico e etanol).

Tabela 6.3 – Concentração de metabólitos formados após 14 dias de fermentação de glicerol por lodo granular oriundo de reator anaeróbio tratando efluente de cervejaria (EC) bioaugmentado com *C. acetobutylicum* ATCC 824 e adição de etanol em concentrações de 100 e 200 mM.

Tratamento	Concentração de metabólitos (g/L)						[Et]
	C2	C3	C4	C6	C8	1,3-PPD	(g/L)
G +Ca +Et ₁₀₀	ND	0,4±0,05	0,5±0,04	3,8±0,10	1,7±0,05	2,0±0,10	2,3
G +Ca +Et ₂₀₀	0,2±0,00	0,5±0,00	2,3±0,46	3,8±0,30	ND	1,6±0,10	3,7

Notas: G +Ca +Et₁₀₀: inóculo mais glicerol (5 g/L) mais bioaugmentação com *C. acetobutylicum* ATCC 824 mais etanol (100 mM); G +Ca +Et₂₀₀: inóculo mais glicerol (5 g/L) mais bioaugmentação com *C. acetobutylicum* ATCC 824 mais etanol (200 mM); C2, C3, C4, C6 e C8 correspondem aos ácidos acético, propiônico, n-butírico, n-caproico e n-caprílico, respectivamente; 1,3-PPD: 1,3-propanediol; [Et]: concentração final de etanol.

Além de aumentar a produção de ácidos carboxílicos e 1,3-PPD, a bioaugmentação pode contribuir para melhorar o desempenho dos reatores em termos práticos. Estudos comprovam que a cultura pura utilizada para bioaugmentação permaneceu ativa durante a operação de um CSTR alimentado com caldo de cana para produção de H₂, mesmo em condições não estéreis (PATTRA et al., 2011). Resultados semelhantes foram encontrados por Weimer, Nerdahl e Brandl (2015), que observaram que uma cultura ruminal mista bioaugmentada com *C. kluyveri* potencializou o alongamento de cadeia a partir de biomassa celulósica (talos de alfafa) suplementada com etanol. Os autores relataram um aumento de 9,5 para 26,4 g C4/L e de 10,4 para 15,2 g C6/L quando *C. kluyveri* foi adicionado ao meio.

Não houve produção de ácido n-caprílico (C8) quando a concentração de etanol foi aumentada de 100 para 200 mM, mas foi observada uma acumulação de ácido butírico e etanol (Tabela 6.3). Algumas razões podem explicar o por quê de o alongamento da cadeia não ter prosseguido: i) a toxicidade causada pelos metabólitos formados em excesso durante a fermentação primária de glicerol (GAVALA; ANGELIDAKI; AHRING, 2003); ii) toxicidade pelo próprio ácido n-caproico, uma vez que a concentração C6 obtida (3,8 g/L) foi muito superior àquela considerada tóxica em pH ácido ($\approx 5,5$) (800-870 mg/L) (GE et al., 2015; WEIMER; NERDAHL; BRANDL, 2015), como foi o caso do cenário com 200 mM de etanol (G +Ca +Et₂₀₀), que ficou com pH 4,5 ao final do experimento, enquanto que o cenário com 100 mM de etanol (G +Ca +Et₁₀₀) ficou com pH final em torno de 6,5.

De acordo com Steinbusch et al. (2011), a produção de ácidos carboxílicos é dependente do pH. Esses autores relataram baixa ou nenhuma produção de C6 e C8 em reatores operados com pH de 5,5. No entanto, a concentração desses ácidos aumentou para 8,27 e 0,32 g/L, respectivamente, ao trabalhar com pH igual a 7. Isso pode ter acontecido porque, em pH baixo, os ácidos não dissociados apolares penetram na parede celular a um pH baixo, liberando prótons no interior das células, com maior pH interno (GINKEL; SUNG; LAY, 2001). No presente estudo, o teste durou apenas 14 dias e, no final desse período, o pH manteve-se próximo a 6,5 quando 100 mM de etanol foi usado como doador de elétrons, permitindo que o alongamento da cadeia continuasse. Por outro lado, quando a concentração de etanol foi mais elevada (200 mM), o pH caiu para cerca de 4,5. Nessa situação, nenhum ácido n-caprílico foi produzido.

A Tabela 6.4 mostra os resultados do balanço de massa e seletividade de AGCM (percentual do substrato inicial convertido em C6 e C8) para os testes com e sem

bioaugmentação, usando inóculo EC, com 100 e 200 mM de etanol. De acordo com os resultados, o balanço de massa variou entre 80% e 143%. Os valores de DQO recuperada muito diferentes de 100% podem ser atribuídos à variação da taxa de crescimento celular, acumulação de matéria orgânica na forma de biopolímeros intracelulares, perdas por evaporação de metabolitos (especialmente álcoois e ácidos graxos voláteis), gases dissolvidos (que não foi contabilizado) e imprecisão analítica de alguns métodos utilizados. A Tabela 6.4 também mostra que a maior seletividade de AGCM foi de 80% e foi alcançada pelo inóculo EC bioaugmentado com *C. acetobutylicum*, quando foi alimentado com glicerol e 100 mM de etanol.

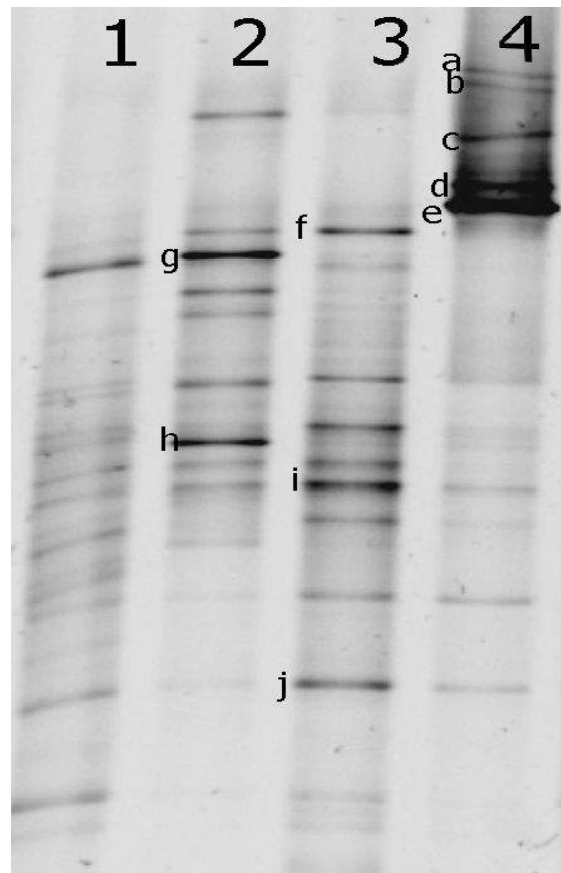
6.3.3 Análises de DGGE

A Figura 6.2 mostra o perfil da DGGE das amostras de lodo EC antes e ao final dos tratamentos. Pelo menos 20 bandas de DGGE detectáveis foram observadas para o inóculo EC (Amostra 1) e apresentou uma riqueza média de 16 (Tabela 6.5). Quando o apenas glicerol (Amostra 2) ou glicerol mais etanol (Amostra 3) foram adicionados, algumas bandas aumentaram sua intensidade (a exemplo das bandas *f*, *g*, *h*, *i* e *j*). Entretanto, a diversidade permaneceu praticamente a mesma (entre 2,2 e 2,6), em relação ao inóculo (Amostra 1). Isso indica que ###. Quando o lodo EC foi bioaugmentado com *C. acetobutylicum* (Amostra 4), apareceram novas populações dominantes (*a*, *b*, *c*, *d* e, principalmente, a banda *e*) enquanto a Rr diminuiu de 32 para menos de 10. Isso sugere que *C. acetobutylicum* foi capaz de se adaptar bem ao ambiente e, mais do que isso, permaneceu no microbioma.

Os valores de Fo apresentados na Tabela 6.5 indicam que as comunidades presentes em todos os tratamentos alcançaram uma boa funcionalidade e estabilidade em termos de composição de espécies, pois não houveram grandes variações desta variável (permaneceu entre 37 e 48). Isso mostra que os diferentes tratamentos aplicados aos biorreatores exerceram uma pressão seletiva na comunidade microbiana, com alta capacidade de adaptação às mudanças no ambiente e preservando sua funcionalidade. Isso sugere que o organismo adicionado, *C. acetobutylicum*, juntamente com outras espécies de micro-organismos, dominaram a comunidade e desempenharam uma função mais eficiente na síntese dos precursores da formação de ácido caproico. De forma semelhante, Yi et al. (2016) relataram que o filo *Firmicutes*, entre os quais *Clostridium* spp., tornou-se o gênero predominante em um lodo granular pré-tratado após fermentação de água residuária sintética à base de glicose.

A dominância de *C. acetobutylicum* pode ser observada pela intensidade da banda *e* na Figura 6.2, possivelmente referente à essa espécie bacteriana.

Figura 6.2 – Perfil da DGGE das amostras de lodo granular proveniente de estação de tratamento de efluente de cervejaria EC antes e ao final dos tratamentos.



Notas:

Amostra 1: inóculo antes dos tratamentos; Amostra 2: lodo EC mais glicerol (5 g/L); Amostra 3: lodo EC mais glicerol (5 g/L) mais etanol 100 mM; Amostra 4: lodo EC mais glicerol (5 g/L) mais etanol 100 mM mais *Clostridium acetobutylicum* 824 (10% v/v); a seta vermelha sinaliza o que parece ser a banda relativa à cultura utilizada para bioaugmentação (*C. acetobutylicum*).

Os resultados deste experimento sugerem que *C. acetobutylicum* foi resistente ao tratamento químico, o que já era esperado, já que, na concentração de 0,05%, o clorofórmio é um inibidor seletivo de *archaeas* metanogênicas (NING et al., 2012), permitindo a sobrevivência dos demais grupos de micro-organismos. Por outro lado, a riqueza de *archaeas*

nos tratamentos aplicados diminuiu substancialmente de valor em relação ao inóculo (Tabela 6.5), indicando que essa população foi reduzida consideravelmente, resultado da adição de clorofórmio ao meio, um composto inibidor seletivo às *archaeas* metanogênicas.

Tabela 6.5 – Organização funcional (Fo), índice de riqueza de Shannon (Rr) e diversidade da comunidade microbiana depois de 14 dias de fermentação de glicerol em experimentos em batelada com lodo granular proveniente de estação de tratamento de efluente de cervejaria (EC) como inóculo.

Tratamentos	<i>Bacteria</i>			<i>Archaea</i>		
	Rr	Fo	Diversidade	Rr	Fo	Diversidade
EC (inóculo)	16	40	2,2	10	40	2,0
EC+G	14	48	2,3	7	69	1,4
EC+G+Et ₁₀₀	32	37	2,6	5	45	1,2
EC+G+Et ₁₀₀ +Ca	6	46	1,7	5	35	2,0
EC+G+Et ₂₀₀ +Ca	9	38	2,0	5	37	1,8

EC: lodo de inóculo proveniente de estação de tratamento de efluente de cervejaria; +G: mais glicerol (5 g/L); +Et₁₀₀: mais etanol 100 mM; +Et₂₀₀: mais etanol 200 mM; +Ca: mais *C. acetobutylicum* ATCC 824 (10% v/v).

6.4 Conclusões

Neste trabalho, a fonte de inóculo, bioaugmentação e concentração de etanol foram utilizados como variáveis para estudar a produção de ácidos graxos de cadeia média a partir de glicerol residual. Os resultados obtidos indicaram que lodo granular proveniente de reator UASB tratando efluente de cervejaria bioaugmentado com *Clostridium acetobutylicum* 824 possui a maior capacidade de produzir ácidos n-caproico (C6) e n-caprílico (C8), desde que a concentração de glicerol residual e etanol sejam de 5 g/L e 100 mM, respectivamente. Nestas condições, foi possível produzir 3,8 g C6/L e 1,7 g C8/L. As comunidades bacterianas alcançaram estabilidade e uma boa funcionalidade em termos de composição de espécies, mostrando que a população de *Clostridium acetobutylicum* 824 se adaptou e dominou o meio.

Tabela 6.4 – Balanço de massa e seletividade de ácidos graxos de cadeia média (AGCM) a partir da DQO inicial e final, usando lodo granular tratando efluente de cervejaria (EC) como inóculo, com e sem bioaugmentação, com e sem adição de etanol (100 e 200 mM).

Tratamentos	Massa inicial de substrato (gCOD)	Massa de DQO convertida (gCOD)									DQO recuperada (gCOD)	Percentual de DQO recuperada (%)	Seletividade de AGCM *
		C2	C3	C4	C6	C8	1,3-PPD	Et	H ₂	CH ₄			
G+Et ₁₀₀	3,14	0,00	0,03	0,25	0,71	0,10	0,20	1,18	0,02	0,00	2,49	79%	26%
G+Et ₁₀₀ +Ca	3,14	0,00	0,12	0,18	1,68	0,83	0,67	0,97	0,02	0,00	4,47	143%	80%
G+Et ₂₀₀ +Ca	5,05	0,04	0,15	0,84	1,68	0,00	0,54	1,54	0,01	0,00	4,80	95%	33%

Notas:

G+Et₁₀₀: inóculo mais glicerol (5 g/L) mais etanol 100 mM

G+Et₁₀₀+Ca: inóculo mais glicerol (5 g/L) mais etanol 100 mM mais *C. acetobutylicum* ATCC 824 (10% v/v)

G+Et₂₀₀+Ca: inóculo mais glicerol (5 g/L) mais etanol 200 mM mais *C. acetobutylicum* ATCC 824 (10% v/v)

C2, C3, C4, C6 e C8: ácidos acético, propiônico, n-butírico, n-caproico e n-caprílico, respectivamente; 1,3-PPD: 1,3-propanodiol; Et: Etanol

* calculado a partir da seguinte equação: $\frac{m_{C6} + m_{C8}}{m_0} \times 100$, onde 'm_{C6}' e 'm_{C8}' são as massa dos ácidos n-caproico e n-caprílico, respectivamente; e 'm₀' é a massa inicial de substrato (glicerol e etanol); tudo em termos de DQO (g COD).

7 DISCUSSÃO FINAL

Os resultados alcançados no experimento do **Capítulo 3** mostrou a necessidade de se aplicar uma estratégia de inibição da metanogênese para potencializar o rendimento de H₂ a partir de glicerol residual. Logo, ao dar partida em um reator anaeróbio produtor de H₂ utilizando cultura mista como inóculo, recomenda-se aplicar clorofórmio a 0,05% (v/v) no afluente para inibir a atividade de *archaeas* metanogênicas consumidoras de H₂. Ainda de acordo com o **Capítulo 3**, dentre as culturas mistas mais apropriadas para inocular um reator produtor de H₂, destacam-se o lodo proveniente de estação de tratamento de esgoto sanitário e líquido ruminal extraído do organismo de caprinos.

No **Capítulo 4** foi avaliado o efeito da relação substrato/micro-organismo (S_0/X_0) na produção de H₂ a partir de glicerol residual. Os resultados desse experimento mostraram que existe um limite da concentração de substrato em relação à massa microbiana. Essa conclusão se baseia no fato de que o rendimento de H₂ aumentou à medida em que se utilizou maiores valores de S_0/X_0 , no entanto, acima de 10 kgDQO/kgSTV, o rendimento diminui.

O experimento de fluxo contínuo, relatado no **Capítulo 4**, mostrou que um sistema de duas fases (produção de H₂ e CH₄ em série) é capaz de gerar cerca de 30% a mais de energia que um sistema único de produção de CH₄, com base na mesma quantidade de glicerol residual gerada por uma indústria de biodiesel. Além disso, a primeira alternativa também é superior quando se deseja comparar o potencial energético por volume de reator. Enquanto um sistema de duas gera 233 MJ/m³_{reator.d}, um sistema produziria apenas 94 MJ/m³_{reator.d}. Apesar disso, os resultados encontrados no presente trabalho permitem afirmar que a produção de hidrogênio a partir de glicerol residual não é atrativa, pois os rendimentos de H₂ alcançados são considerados baixos em comparação com rendimentos alcançados a partir de outras fontes de matéria orgânica (glicose, por exemplo). Por outro lado, o glicerol residual se mostrou com bastante potencial em sintetizar outros produtos de valor agregado, dentre eles o ácido caproico. Isso foi comprovado através dos resultados expostos no **Capítulo 5** desta tese. Dentre os cenários testados, a maior produção de ácido caproico (C6), 3,8 g/L, aconteceu quando lodo granular proveniente de estação de tratamento de efluente de cervejaria foi bioaumentado com *Clostridium acetobutylicum* e alimentado com glicerol residual a 5 g/L e etanol a 100 mM. Nessas condições, também foi possível produzir 1,7 g ácido caprílico (C8)/L. Entretanto, ao elevar a concentração de etanol para 200 mM, não

houve produção de C8, mostrando que o alongamento de cadeia de C6→C8 ficou comprometido em concentrações acima de 100 mM de etanol.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGLER, M. T. et al. Waste to bioproduct conversion with undefined mixed cultures: The carboxylate platform. **Trends in Biotechnology**, v. 29, n. 2, p. 70–78, 2011.
- AGLER, M. T. et al. Chain elongation with reactor microbiomes: upgrading dilute ethanol to medium-chain carboxylates. **Energy & Environmental Science**, v. 5, n. 8, p. 8189, 2012.
- AMORIM, E. L. C.; SADER, L. T.; SILVA, E. L. Effect of substrate concentration on dark fermentation hydrogen production using an anaerobic fluidized bed reactor. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 166, n. 5, p. 1248–63, mar. 2012.
- ANDERSCH, W.; BAHL, H.; GOTTSCHALK, G. Level of enzymes involved in acetate, butyrate, acetone and butanol formation by *Clostridium acetobutylicum*. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 18, n. 6, p. 327–332, 1983.
- ANDREWS, J. F. A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizing inhibitory substrates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 10, n. 6, p. 707–723, nov. 1968.
- ANGELIDAKI, I.; ELLEGAARD, L.; AHRING, B. K. A mathematical model for dynamic simulation of anaerobic digestion of complex substrates: Focusing on ammonia inhibition. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 42, n. 2, p. 159–166, 1993.
- ANGENENT, L. T. et al. Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater. **Trends in Biotechnology**, v. 22, n. 9, p. 477–485, 2004.
- ANGENENT, L. T. et al. Chain elongation with reactor microbiomes: open-culture biotechnology to produce Biochemicals. **Environmental Science and Technology**, v. 50, n. 6, p. 2796–2810, 2016.
- APHA. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 21^a. ed. Washington: American Public Health Association, 2005.
- AQUINO, S. F. et al. Metodologias para determinação da atividade metanogênica específica (AME) em lodos anaeróbios. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 12, n. 2, p. 192–201, 2007.
- ARGUN, H. et al. Batch dark fermentation of powdered wheat starch to hydrogen gas: Effects of the initial substrate and biomass concentrations. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, n. 21, p. 6109–6115, 2008a.
- ARGUN, H. et al. Biohydrogen production by dark fermentation of wheat powder solution: Effects of C/N and C/P ratio on hydrogen yield and formation rate. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, n. 7, p. 1813–1819, abr. 2008b.
- AZBAR, N. et al. Continuous fermentative hydrogen production from cheese whey wastewater under thermophilic anaerobic conditions. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, n. 17, p. 7441–7447, set. 2009.
- BARBIRATO, F.; CHEDAILLE, D.; BORIES, A. Propionic acid fermentation from glycerol: comparison with conventional substrates. **Applied Microbiology**, v. 47, p. 441–446, 1997.

- BEKINS, B. A.; WARREN, E.; GODSY, E. M. A comparison of zero-order, first-order, and Monod biotransformation models. **Ground Water**, v. 36, n. 2, p. 261–268, 1998.
- BIEBL, H. et al. Glycerol conversion to 1,3-propanediol by newly isolated clostridia. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 36, p. 592–597, 1992.
- BIEBL, H. et al. Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol and 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 50, n. 1, p. 24–9, jul. 1998.
- BIEBL, H. et al. Microbial production of 1,3-propanediol. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 52, n. 3, p. 289–97, set. 1999.
- BIEBL, H. Fermentation of glycerol by *Clostridium pasteurianum* - batch and continuous culture studies. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 1, p. 18–26, jul. 2001.
- BISHOP, P. L. Biofilm structure and kinetics. **Water Science and Technology**, v. 36, n. 1, p. 287–294, 1997.
- BOND, S. W. et al. Emissions of anthropogenic hydrogen to the atmosphere during the potential transition to an increasingly H₂-intensive economy. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, n. 1, p. 1122–1135, jan. 2011.
- BOYEN, F. et al. Coated fatty acids alter virulence properties of *Salmonella Typhimurium* and decrease intestinal colonization of pigs. **Veterinary Microbiology**, v. 132, n. 3-4, p. 319–327, 2008.
- BRASIL. **LEI Nº 13.033, DE 24 DE SETEMBRO DE 2014**, 2014. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L7802.htm>
- BUDAVARI, S. **The Merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals**. 11th Editi ed. [s.l.] Merck, 1989.
- CAMMACK, R. et al. Nickel and iron-sulphur centres in *Desulfovibrio gigas* hydrogenase: ESR spectra, redox properties and interactions. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 912, n. 1987, p. 98–109, 1987.
- CAVALCANTI, P. F. F. **Integrated application of the UASB reactor and ponds for domestic sewage treatment in tropical regions**. [s.l.] Wageningen University, 2003.
- CHAGANTI, S. R.; KIM, D. H.; LALMAN, J. A. Dark fermentative hydrogen production by mixed anaerobic cultures: Effect of inoculum treatment methods on hydrogen yield. **Renewable Energy**, v. 48, n. July 2016, p. 117–121, 2012.
- CHAUDHRY, M. A. S.; BEG, S. B. A review on the mathematical modeling of biofilm processes: advances in fundamentals of biofilm modeling. **Chemical Engineering and Technology**, v. 21, n. 9, p. 701–710, 1998.
- CHEN, C.-C.; LIN, C.-Y.; LIN, M.-C. Acid -base enrichment enhances anaerobic hydrogen production process. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, n. 2, p. 224–228, 1 jan. 2002.
- CHEN, W. et al. Kinetic study of biological hydrogen production by anaerobic fermentation.

International Journal of Hydrogen Energy, v. 31, n. 15, p. 2170–2178, 2006a.

CHEN, X. et al. Stoichiometric analysis of biological hydrogen production by fermentative bacteria. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 31, n. 4, p. 539–549, mar. 2006b.

CHEONG, D.-Y.; HANSEN, C. L. Bacterial stress enrichment enhances anaerobic hydrogen production in cattle manure sludge. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 72, n. 4, p. 635–43, out. 2006.

CHERNICHARO, C. A. DE L. **Anaerobic Reactors**. London: IWA Publishing, 2007. v. 04

CHIDTHAISONG, A.; CONRAD, R. Specificity of chloroform, 2-bromoethanesulfonate and fluoroacetate to inhibit methanogenesis and other anaerobic processes in anoxic rice field soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 32, n. 7, p. 977–988, 2000.

CHONG, M.-L. et al. Biohydrogen production from biomass and industrial wastes by dark fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, n. 8, p. 3277–3287, maio 2009.

CHOOKAEW, T.; O-THONG, S.; PRASERTSAN, P. Fermentative production of hydrogen and soluble metabolites from crude glycerol of biodiesel plant by the newly isolated thermotolerant *Klebsiella pneumoniae* TR17. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 18, p. 13314–13322, set. 2012.

CHOU, C.-J. et al. Hydrogenesis in hyperthermophilic microorganisms: implications for biofuels. **Metabolic engineering**, v. 10, n. 6, p. 394–404, nov. 2008.

CIRIMINNA, R. et al. Understanding the glycerol market. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 116, n. 10, p. 1432–1439, 2014.

COHEN, A. et al. Influence of phase separation on the anaerobic digestion of glucose - I: Maximum COD-turnover rate during continuous operation. **Water Research**, v. 14, p. 1439–1448, 1980.

CONRAD, R. Control of hydrogen to methane production and control of hydrogen concentrations in methanogenic soils and sediments. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 28, p. 39–58, 1999.

DA SILVA, G. P.; MACK, M.; CONTIERO, J. Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. **Biotechnology advances**, v. 27, n. 1, p. 30–9, 2009.

DAMS, R. I. et al. Fermentation of residual glycerol by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 in pure and mixed cultures. **Environmental Technology**, v. 3330, n. May, p. 1–9, 2016.

DAS, D. et al. Role of Fe-hydrogenase in biological hydrogen production. **Current Science**, v. 90, n. 12, p. 1627–1637, 2006.

DATAR, R. et al. Hydrogen production from the fermentation of corn stover biomass pretreated with a steam-explosion process. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 32, n. 8, p. 932–939, jun. 2007.

DAVILA-VAZQUEZ, G. et al. Fermentative hydrogen production in batch experiments using lactose, cheese whey and glucose: Influence of initial substrate concentration and pH.

International Journal of Hydrogen Energy, v. 33, n. 19, p. 4989–4997, out. 2008.

DAVILA-VAZQUEZ, G. et al. Continuous biohydrogen production using cheese whey: Improving the hydrogen production rate. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, n. 10, p. 4296–4304, maio 2009.

DAVILA-VAZQUEZ, G. et al. The buffer composition impacts the hydrogen production and the microbial community composition in non-axenic cultures. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 7, p. 3174–3181, jul. 2011.

DE BAERE, L. A. et al. Influence of high NaCl and NH₄Cl salt levels on methanogenic associations. **Water Research**, v. 18, n. 5, p. 543–548, 1984.

DEJONGHE, W. et al. Bioaugmentation of soils by increasing microbial richness: Missing links. **Environmental Microbiology**, v. 3, n. 10, p. 649–657, 2001.

DEMIREL, B.; YENIGÜN, O. Two-phase anaerobic digestion processes: A review. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 77, n. 7, p. 743–755, 2002.

DEMIREL, B.; YENIGÜN, O. Changes in microbial ecology in an anaerobic reactor. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 10, p. 1201–1208, 2006.

DINAMARCA, C.; BAKKE, R. Process parameters affecting the sustainability of fermentative hydrogen production: A short-review. **International Journal of Energy and Environment**, v. 2, n. 6, p. 1067–1078, 2011.

DING, H. B.; TAN, G. Y. A.; WANG, J. Y. Caproate formation in mixed-culture fermentative hydrogen production. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 24, p. 9550–9559, 2010.

DOCUMENT_NOT_FOUND. **Document not found (Silva et al., 2009)**, [s.d.].

DOCUMENT_NOT_FOUND. **Document not found (Biebl et al., 1999)**, [s.d.].

DOUNAVIS, A. S. et al. Production of Bio-Based Hydrogen Enriched Methane from Waste Glycerol in a Two Stage Continuous System. **Waste and Biomass Valorization**, v. 37, n. 2, p. 1–13, 2016.

DOUNAVIS, A. S.; NTAIKOU, I.; LYBERATOS, G. Production of biohydrogen from crude glycerol in an upflow column bioreactor. **Bioresource Technology**, v. 198, p. 701–708, 2015.

ERIKSEN, N. T. et al. H₂ synthesis from pentoses and biomass in *Thermotoga* spp. **Biotechnology letters**, v. 33, n. 2, p. 293–300, fev. 2011.

ESTRELA, C. et al. Mechanism of action of calcium and hydroxyl ions of calcium hydroxide on tissue and bacteria. **Brazilian Dental Journal**, v. 6, n. 2, p. 85–90, 1995.

EZEJI, T.; BLASCHEK, H. P. Fermentation of dried distillers' grains and solubles (DDGS) hydrolysates to solvents and value-added products by solventogenic clostridia. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 12, p. 5232–5242, 2008.

FABIANO, B.; PEREGO, P. Thermodynamic study and optimization of hydrogen production by *Enterobacter aerogenes*. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 27, n. 2, p. 149–

156, fev. 2002.

FAN, K.-S.; CHEN, Y.-Y. H₂ production through anaerobic mixed culture: effect of batch S₀/X₀ and shock loading in CSTR. **Chemosphere**, v. 57, p. 1059–1068, 2004.

FANG, H. H. P.; LIU, H. Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture. **Bioresource Technology**, v. 82, n. 1, p. 87–93, mar. 2002.

FERNANDES, B. S. et al. Potential to produce biohydrogen from various wastewaters. **Energy for Sustainable Development**, v. 14, n. 2, p. 143–148, jun. 2010.

FORREST, A. K.; SIERRA, R.; HOLTZAPPLE, M. T. Effect of biodiesel glycerol type and fermentor configuration on mixed-acid fermentations. **Bioresource technology**, v. 101, p. 9185–9, dez. 2010.

FOUNTOULAKIS, M. S.; PETOUSHI, I.; MANIOS, T. Co-digestion of sewage sludge with glycerol to boost biogas production. **Waste Management**, 2010.

GAVALA, H. N.; ANGELIDAKI, I.; AHRING, B. K. Kinetics and modeling of anaerobic digestion process. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 81, p. 57–93, 2003.

GE, S. et al. Long-term n-caproic acid production from yeast-fermentation beer in an anaerobic bioreactor with continuous product extraction. **Environmental Science & Technology**, p. 150505102250009, 2015.

GENTHNER, B. R. S.; DAVIS, C. L.; BRYANT, M. P. Features of rumen and sewage sludge strains of *Eubacterium limosum*, a methanol- and H₂-CO₂-utilizing species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 42, n. 1, p. 12–19, 1981.

GEST, H. A serendipic legacy: Erwin Esmarch's isolation of the first photosynthetic bacterium in pure culture. **Photosynthesis Research**, v. 46, n. 3, p. 473–478, 1995.

GINKEL, S. V.; SUNG, S.; LAY, J. J. Biohydrogen production as a function of pH and substrate concentration. **Environmental Science and Technology**, v. 35, n. 24, p. 4726–30, 15 dez. 2001.

GIRBAL, L. et al. Regulation of metabolic shifts in *Clostridium acetobutylicum*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 17, p. 287–297, 1995.

GONZÁLEZ-CABALEIRO, R. et al. Linking thermodynamics and kinetics to assess pathway reversibility in anaerobic bioprocesses. **Energy & Environmental Science**, v. 6, p. 3780, 2013.

GOODWIN, S.; ZEIKUS, J. G. Physiological adaptations of anaerobic bacteria to low pH: metabolic control of proton motive force in *Sarcina ventriculi*. **American Society for Microbiology**, v. 169, n. 5, p. 2150–2157, 1987.

GROOTSCHOLTEN, T. I. M. et al. Promoting chain elongation in mixed culture acidification reactors by addition of ethanol. **Biomass and Bioenergy**, v. 48, p. 10–16, jan. 2013a.

GROOTSCHOLTEN, T. I. M. et al. Chain elongation of acetate and ethanol in an upflow

anaerobic filter for high rate MCFA production. **Bioresource technology**, v. 135, p. 440–5, maio 2013b.

GROOTSCHOLTEN, T. I. M. et al. Two-stage medium chain fatty acid (MCFA) production from municipal solid waste and ethanol. **Applied Energy**, v. 116, p. 223–229, 2014.

GUIOT, S. R.; PAUSS, A.; COSTERTON, J. W. A structured model of the anaerobic granule consortium. **Water Science and Technology**, v. 25, n. 7, p. 1–10, 1992.

HAFEZ, H. et al. Effect of organic loading on a novel hydrogen bioreactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, n. 1, p. 81–92, jan. 2010.

HALLENBECK, P. C. Fermentative hydrogen production: Principles, progress, and prognosis. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, n. 17, p. 7379–7389, set. 2009.

HALLENBECK, P. C.; BENEMANN, J. R. Biological hydrogen production ; fundamentals and limiting processes. v. 27, p. 1185–1193, 2002.

HARPER, S. R.; POHLAND, F. G. Recent developments in hydrogen management during anaerobic biological wastewater treatment. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 28, n. 4, p. 585–602, 1 abr. 1986.

HARTMANIS, M. G. N. Butyrate kinase from *Clostridium acetobutylicum*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 2, p. 617–621, 1987.

HARTMANIS, M. G. N.; GATENBECK, S. Intermediary metabolism in *Clostridium acetobutylicum* : levels of enzymes involved in the formation of acetate and butyrate. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 47, n. 6, p. 1277–1283, 1984.

HAWKES, F. et al. Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: Principles and progress. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 32, n. 2, p. 172–184, fev. 2007.

HAWKES, F. R. et al. Sustainable fermentative hydrogen production: Challenges for process optimisation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 27, n. 11-12, p. 1339–1347, 2002.

HICKEY, R. F.; VANDERWIELEN, J.; SWITZENBAUM, M. S. The effects of organic toxicants on methane production and hydrogen gas levels during the anaerobic digestion of waste activated sludge. **Water Research**, v. 21, n. 11, p. 1417–1427, 1987.

HU, B.; CHEN, S. Pretreatment of methanogenic granules for immobilized hydrogen fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 32, n. 15, p. 3266–3273, out. 2007.

HU, X. L.; DU, H.; XU, Y. Identification and quantification of the caproic acid-producing bacterium *Clostridium kluyveri* in the fermentation of pit mud used for Chinese strong-aroma type liquor production. **International Journal of Food Microbiology**, v. 214, p. 116–122, 2015.

HULSHOFF POL, L. W. et al. Anaerobic sludge granulation. **Water research**, v. 38, n. 6, p. 1376–89, mar. 2004.

- HUNG, C.-H.; CHANG, Y.-T.; CHANG, Y.-J. Roles of microorganisms other than Clostridium and Enterobacter in anaerobic fermentative biohydrogen production systems--a review. **Bioresource technology**, v. 102, n. 18, p. 8437–44, set. 2011.
- HUTŇAN, M. et al. Long-term monodigestion of crude glycerol in a UASB reactor. **Bioresource technology**, v. 130, p. 88–96, fev. 2013.
- ITO, T. et al. 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.
- JAIN, I. P. Hydrogen the fuel for 21st century. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, n. 17, p. 7368–7378, 2009.
- JENNEY, F. E. et al. Anaerobic microbes: oxygen detoxification without superoxide dismutase. **Science (New York, N.Y.)**, v. 286, n. 5438, p. 306–309, 1999.
- KALYUZHNYI, S. et al. The development of biological methods for utilisation and treatment of diluted manure streams. **Water Science and Technology**, v. 40, n. 1, p. 223–229, 1999.
- KARGI, F.; EREN, N. S.; OZMIHCI, S. Hydrogen gas production from cheese whey powder (CWP) solution by thermophilic dark fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 3, p. 2260–2266, fev. 2012.
- KE, S.; SHI, Z.; FANG, H. H. P. Applications of two-phase anaerobic degradation in industrial wastewater treatment Shuizhou Ke * and Zhou Shi. **int. J. Environment and Pollution**, v. 23, n. 1, p. 65–80, 2005.
- KENEALY, W. R.; CAO, Y.; WEIMER, P. J. Production of caproic acid by cocultures of ruminal cellulolytic bacteria and Clostridium kluyveri grown on cellulose and ethanol. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 44, p. 507–513, 1995.
- KENEALY, W. R.; WASELEFSKY, D. M. Studies on the substrate range of Clostridium kluyveri; the use of propanol and succinate. **Archives of Microbiology**, v. 141, p. 187–194, 1985.
- KENNEDY, K. J.; VAN DEN BERG, L. Stability and performance of anaerobic fixed film reactors during hydraulic overloading at 10–35°C. **Water Resource**, v. 16, p. 1391–1398, 1982.
- KHANAL, S. K. et al. Biological hydrogen production: effects of pH and intermediate products. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 29, p. 1123–1131, 31 dez. 2004.
- KIM, D. et al. Effect of gas sparging on continuous fermentative hydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 31, n. 15, p. 2158–2169, dez. 2006.
- KIM, D. H. et al. Start-up strategy for continuous fermentative hydrogen production: Early switchover from batch to continuous operation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, n. 5, p. 1532–1541, 2008.
- KIM, S.-H.; HAN, S.-K.; SHIN, H.-S. Effect of substrate concentration on hydrogen production and 16S rDNA-based analysis of the microbial community in a continuous fermenter. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 1, p. 199–207, jan. 2006.

- KOESNANDAR et al. Enzymatic reduction of cystine into cysteine by cell-free extract of *Clostridium thermoaceticum*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 72, n. 1, p. 11–14, 1991.
- KOLESÁROVÁ, N. et al. Anaerobic treatment of biodiesel by-products in a pilot scale reactor. **Chemical Papers**, v. 65, n. 4, p. 447–453, 2011.
- KOSKINEN, P. E. P.; KAKSONEN, A. H.; PUHAKKA, J. A. The relationship between instability of H₂ production and compositions of bacterial communities within a dark fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 97, n. 4, p. 742–758, 2007.
- KOSTER, I. W.; LETTINGA, G. Anaerobic digestion at extreme ammonia concentrations. **Biological Wastes**, v. 25, p. 51–59, 1988.
- KOTAY, S. M.; DAS, D. Biohydrogen as a renewable energy resource—Prospects and potentials. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, n. 1, p. 258–263, jan. 2008.
- KOTHARI, R.; BUDDHI, D.; SAWHNEY, R. L. Comparison of environmental and economic aspects of various hydrogen production methods. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 12, p. 553–563, 2008.
- KRAEMER, J. T.; BAGLEY, D. M. Improving the yield from fermentative hydrogen production. **Biotechnology letters**, v. 29, n. 5, p. 685–95, maio 2007.
- KUBIAK, P. et al. Physiological predisposition of various *Clostridium* species to synthesize 1,3-propanediol from glycerol. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 9, p. 1308–1319, set. 2012.
- LALMAN, J. A.; BAGLEY, D. M. Anaerobic degradation and methanogenic inhibitory effects of oleic and stearic acids. **Water research**, v. 35, n. 12, p. 2975–83, ago. 2001.
- LAY, J. et al. Factors Affecting Hydrogen Production from Food Wastes by *Clostridium* - Rich Composts. **Journal of Environmental Engineering**, v. 131, n. 4, p. 595–602, 2005.
- LEE, K. et al. Continuous hydrogen production by anaerobic mixed microflora using a hollow-fiber microfiltration membrane bioreactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 32, n. 8, p. 950–957, jun. 2007.
- LEE, K. et al. Exploring optimal environmental factors for fermentative hydrogen production from starch using mixed anaerobic microflora. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, n. 5, p. 1565–1572, mar. 2008.
- LEE, M.-J.; SONG, J.-H.; HWANG, S.-J. Effects of acid pre-treatment on bio-hydrogen production and microbial communities during dark fermentation. **Bioresource technology**, v. 100, n. 3, p. 1491–3, fev. 2009.
- LEHMANN, D.; LÜTKE-EVERSLOH, T. Switching *Clostridium acetobutylicum* to an ethanol producer by disruption of the butyrate/butanol fermentative pathway. **Metabolic Engineering**, v. 13, n. 5, p. 464–473, 2011.
- LEITÃO, R. C. et al. Anaerobic treatment of coconut husk liquor for biogas production. **Water science and technology**, v. 59, n. 9, p. 1841–6, jan. 2009.
- LETTINGA, G.; HULSHOF POL, L. W.; ZEEMAN, G. **Biological wastewater treatment.**

Part I: Anaerobic wastewater treatment. Lectures notes. Wageningen, The Netherlands: Wageningen University, 1999.

LI, Z. et al. A novel and environment-friendly bioprocess of 1,3-propanediol fermentation integrated with aqueous two-phase extraction by ethanol / sodium carbonate system. **Biochemical Engineering Journal**, v. 80, p. 68–75, 2013.

LIN, C.; CHANG, C.; HUNG, C. Fermentative hydrogen production from starch using natural mixed cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, n. 10, p. 2445–2453, 2008.

LIN, C.; LAY, C. H. Carbon/nitrogen-ratio effect on fermentative hydrogen production by mixed microflora. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 29, n. 1, p. 41–45, jan. 2004.

LIN, C.; WU, C.; HUNG, C. Temperature effects on fermentative hydrogen production from xylose using mixed anaerobic cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, n. 1, p. 43–50, jan. 2008.

LIN, C. Y.; LAY, C. H. A nutrient formulation for fermentative hydrogen production using anaerobic sewage sludge microflora. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 30, p. 285–292, 2005.

LIN, J. et al. Toxicants inhibiting anaerobic digestion : A review. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 8, p. 1523–1534, 2014.

LIU, C. Z.; CHENG, X. Y. Improved hydrogen production via thermophilic fermentation of corn stover by microwave-assisted acid pretreatment. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, n. 17, p. 8945–8952, 2010.

LIU, X.; ZHU, Y.; YANG, S.-T. Butyric acid and hydrogen production by *Clostridium tyrobutyricum* ATCC 25755 and mutants. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, n. 3-4, p. 521–528, fev. 2006.

LIU, Y. Bioenergetic interpretation on the S₀/X₀ ratio in substrate-sufficient batch culture. **Water Research**, v. 30, n. 11, p. 2766–2770, 1996.

LO, Y. C. et al. Dark fermentative hydrogen production with crude glycerol from biodiesel industry using indigenous hydrogen-producing bacteria. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 35, p. 15815–15822, 2013.

LOWE, S. E.; JAIN, M. K.; ZEIKUS, J. G. Biology, ecology, and biotechnological applications of anaerobic bacteria adapted to environmental stresses in temperature, pH, salinity, or substrates. **Microbiological Reviews**, v. 57, n. 2, p. 451–509, jun. 1993.

LUO, G. et al. Anaerobic treatment of cassava stillage for hydrogen and methane production in continuously stirred tank reactor (CSTR) under high organic loading rate (OLR). **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, n. 21, p. 11733–11737, 2010.

LUO, G. et al. Enhancement of bioenergy production from organic wastes by two-stage anaerobic hydrogen and methane production process. **Bioresource technology**, v. 102, n. 18, p. 8700–6, set. 2011.

MANGAYIL, R.; KARP, M.; SANTALA, V. Bioconversion of crude glycerol from biodiesel production to hydrogen. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 17, p. 12198–12204, set. 2012.

MARIAKAKIS, I. et al. Effect of organic loading rate and solids retention time on microbial population during bio-hydrogen production by dark fermentation in large lab-scale. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, n. 17, p. 10690–10700, 2011.

MARZORATI, M. et al. How to get more out of molecular fingerprints: Practical tools for microbial ecology. **Environmental Microbiology**, v. 10, n. 6, p. 1571–1581, 2008.

MATHEWS, J.; WANG, G. Metabolic pathway engineering for enhanced biohydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, n. 17, p. 7404–7416, set. 2009.

MCCARTY, P. L. Anaerobic Waste Treatment Fundamentals - Part One - Chemistry and Microbiology. **Public Works**, v. 95, p. 107–112, 1964a.

MCCARTY, P. L. Anaerobic Waste Treatment Fundamentals - Part Three - Toxic Materials and their Control. **Public Works**, v. 95, p. 91–99, 1964b.

MCGREGOR, W. G.; PHILLIPS, J.; SUELTER, C. H. Purification and kinetic characterization of a monovalent cation-activated glycerol dehydrogenase from *Aerobacter aerogenes*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 249, n. 10, p. 3132–3139, 1974.

MERLINO, G. et al. Microbial community structure and dynamics in two-stage vs single-stage thermophilic anaerobic digestion of mixed swine slurry and market bio-waste. **Water Research**, v. 47, n. 6, p. 1983–1995, 2013.

MESSERLIE, R. L.; STROTHER, J. R. **Integration of the Brayton and Rankine cycle to maximize gas turbine performance: a cogeneration option** ASME 1984 International Gas Turbine Conference and Exhibit. **Anais...** New York: American Society of Mechanical Engineers, 1984

METCALF & EDDY. **Wastewater Engineering: Treatment and Reuse**. [s.l.] Metcalf & Eddy Inc., 2003.

MINTON, N. P.; CLARKE, D. J. **Clostridia - Biotechnology Handbooks**. 1st. ed. New York: Springer Science+Business Media, 1989.

MITCHELL, P. Membrane Structure and Mechanisms of Biological Energy Transduction. In: AVERY, J. (Ed.). Boston, MA: Springer US, 1973. p. 265–293.

MIZUNO, O. et al. Enhancement of hydrogen production from glucose by nitrogen gas sparging. **Bioresource Technology**, v. 73, n. 1, p. 59–65, 2000.

MONOT, F.; ENGASSER, J.-M.; PETITDEMANGE, H. Influence of pH and undissociated butyric acid on the production of acetone and butanol in batch cultures of *Clostridium acetobutylicum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 6, p. 422–426, 1984.

MOON, C. et al. Optimization of medium compositions favoring butanol and 1,3-propanediol production from glycerol by *Clostridium pasteurianum*. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 22, p. 10561–10568, 2011.

MU, Y.; YU, H. Q.; WANG, G. Evaluation of three methods for enriching H₂-producing cultures from anaerobic sludge. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 4, p. 947–953, 2007.

MULDREW, K.; MCGANN, L. E. The osmotic rupture hypothesis of intracellular freezing injury. **Biophysical journal**, v. 66, n. 2 Pt 1, p. 532–41, 1994.

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

NAKASHIMADA, Y. et al. **Hydrogen production of Enterobacter aerogenes altered by extracellular and intracellular redox states** International Journal of Hydrogen Energy. **Anais...**2002

NASR, N. et al. Bio-hydrogen production from thin stillage using conventional and acclimatized anaerobic digester sludge. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, n. 20, p. 12761–12769, 2011.

NATH, K.; DAS, D. Improvement of fermentative hydrogen production: various approaches. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 65, n. 5, p. 520–9, out. 2004.

NGO, T. A.; KIM, M.-S.; SIM, S. J. High-yield biohydrogen production from biodiesel manufacturing waste by *Thermotoga neapolitana*. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, n. 10, p. 5836–5842, maio 2011.

NING, Y.-Y. et al. Evaluation of the stability of hydrogen production and microbial diversity by anaerobic sludge with chloroform treatment. **Renewable Energy**, v. 38, n. 1, p. 253–257, fev. 2012.

O-THONG, S.; MAMIMIN, C.; PRASERTSAN, P. Effect of temperature and initial pH on biohydrogen production from palm oil mill effluent: Long-term evaluation and microbial community analysis. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 5, p. 60–70, 2011.

OECD/FAO. Biofuels. In: **Agricultural outlook**. Paris: OECD Publishing, 2015. p. 144.

OH, B.-R. et al. Efficient production of ethanol from crude glycerol by a *Klebsiella pneumoniae* mutant strain. **Bioresource technology**, v. 102, n. 4, p. 3918–3922, 2011.

OH, S.-E.; VAN GINKEL, S.; LOGAN, B. E. The relative effectiveness of pH control and heat treatment for enhancing biohydrogen gas production. **Environmental science & technology**, v. 37, n. 22, p. 5186–90, 15 nov. 2003.

OREMLAND, R.; CAPONE, D. G. Use of “ specific ” inhibitors in biogeochemistry and microbial ecology . **Advances in Microbial Ecology**, v. 10, p. 285–382, 1988.

PAN, J. et al. Effect of food to microorganism ratio on biohydrogen production from food waste via anaerobic fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, n. 23, p. 6968–6975, dez. 2008.

PATTRA, S. et al. Performance and population analysis of hydrogen production from sugarcane juice by non-sterile continuous stirred tank reactor augmented with *Clostridium*

- butyricum. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, n. 14, p. 8697–8703, 2011.
- PENDYALA, B. et al. Pretreating mixed anaerobic communities from different sources: Correlating the hydrogen yield with hydrogenase activity and microbial diversity. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 17, p. 12175–12186, set. 2012.
- POSADA, J. A.; RINCÓN, L. E.; CARDONA, C. A. Design and analysis of biorefineries based on raw glycerol: Addressing the glycerol problem. **Bioresource Technology**, v. 111, p. 282–293, 2012.
- QURESHI, N. et al. Butanol production from corn fiber xylan using *Clostridium acetobutylicum*. **Biotechnology Progress**, v. 22, n. 3, p. 673–680, 2006.
- RAMPELOTTO, P. H. Resistance of Microorganisms to Extreme Environmental Conditions and Its Contribution to Astrobiology. **Sustainability**, v. 2, n. 6, p. 1602–1623, 4 jun. 2010.
- RATTI, R. P. et al. Production of H₂ from cellulose by rumen microorganisms: effects of inocula pre-treatment and enzymatic hydrolysis. **Biotechnology letters**, 27 out. 2013.
- REN, N. Q. et al. Effects of different pretreatment methods on fermentation types and dominant bacteria for hydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, n. 16, p. 4318–4324, 2008.
- RIPLEY, L. E.; BOYLE, W. C.; CONVERSE, J. C. Improved Alkalimetric Monitoring for Anaerobic Digestion of High-Strength Wastes. **Water Pollution Control Federation**, v. 58, n. 5, p. 406–411, 1986.
- RITTMANN, B. E.; MCCARTY, P. L. **Environmental biotechnology: principles and applications**. Boston, MA: McGraw-Hill, 2001.
- RODDICK, F. A.; BRITZ, M. L. Production of hexanoic acid by free and immobilised cells of *Megasphaera elsdenii*: Influence of in-situ product removal using ion exchange resin. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 69, n. 3, p. 383–391, 1997.
- ROSSI, D. M. et al. Comparison of different pretreatment methods for hydrogen production using environmental microbial consortia on residual glycerol from biodiesel. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, n. 8, p. 4814–4819, abr. 2011.
- SAADY, N. M. C. Homoacetogenesis during hydrogen production by mixed cultures dark fermentation: Unresolved challenge. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 30, p. 13172–13191, 2013.
- SAINT-AMANS, S. et al. High production of 1,3-propanediol from glycerol by *Clostridium butyricum* VPI 3266 in a simply controlled fed-batch system. **Biotechnology Letters**, v. 16, n. 8, p. 831–836, 1994.
- SARMA, S. J. et al. Microbial hydrogen production by bioconversion of crude glycerol: A review. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 8, p. 6473–6490, abr. 2012a.
- SARMA, S. J. et al. Microbial hydrogen production by bioconversion of crude glycerol: A review. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 8, p. 6473–6490, abr. 2012b.
- SCHOLTEN, J. C. M.; CONRAD, R.; STAMS, A. J. M. Effect of 2-bromo-ethane sulfonate,

molybdate and chloroform on acetate consumption by methanogenic and sulfate-reducing populations in freshwater sediment. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 32, n. 1, p. 35–42, 2000.

SCHUT, G. J.; ADAMS, M. W. W. The iron-hydrogenase of *Thermotoga maritima* utilizes ferredoxin and NADH synergistically: a new perspective on anaerobic hydrogen production. **Journal of bacteriology**, v. 191, n. 13, p. 4451–7, jul. 2009.

SEIFERT, K. et al. Hydrogen generation from glycerol in batch fermentation process. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, n. 9, p. 3671–3678, maio 2009.

SELEMBO, P. A et al. Enhanced hydrogen and 1,3-propanediol production from glycerol by fermentation using mixed cultures. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 104, n. 6, p. 1098–106, 15 dez. 2009.

SHEN, L.; BAGLEY, D. M.; LISS, S. N. Effect of organic loading rate on fermentative hydrogen production from continuous stirred tank and membrane bioreactors. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, n. 9, p. 3689–3696, maio 2009.

SILES LÓPEZ, J. A. et al. Anaerobic digestion of glycerol derived from biodiesel manufacturing. **Bioresource technology**, v. 100, n. 23, p. 5609–15, dez. 2009.

SITTIJUNDA, S.; REUNGSANG, A. Biohydrogen production from waste glycerol and sludge by anaerobic mixed cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 18, p. 13789–13796, set. 2012a.

SITTIJUNDA, S.; REUNGSANG, A. Media optimization for biohydrogen production from waste glycerol by anaerobic thermophilic mixed cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 20, p. 15473–15482, out. 2012b.

SIVAGURUNATHAN, P.; SEN, B.; LIN, C. Y. Overcoming propionic acid inhibition of hydrogen fermentation by temperature shift strategy. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 33, p. 19232–19241, 2014.

SÖHLING, B.; GOTTSCHALK, G. Molecular analysis of the anaerobic succinate degradation pathway in *Clostridium kluyveri*. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 3, p. 871–880, 1996.

SONG, Z.-X. et al. Effects of pretreatment method of natural bacteria source on microbial community and bio-hydrogen production by dark fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 7, p. 5631–5636, abr. 2012.

SOTO, M.; MENDEZ, R.; LEMA, J. M. Methanogenic and non-methanogenic activity tests: theoretical basis and experimental setup. **Water Research**, v. 27, n. 8, p. 1361–1376, 1993.

SOTO, M.; MÉNDEZ, R.; LEMA, J. M. Methanogenic and non-methanogenic activity tests. Theoretical basis and experimental set up. **Water Research**, v. 27, n. 8, p. 1361–1376, 1993.

SPIRITO, C. M. et al. Chain elongation in anaerobic reactor microbiomes to recover resources from waste. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 27, p. 115–22, jun. 2014.

STEINBUSCH, K. J. J. et al. Biological formation of caproate and caprylate from acetate: fuel and chemical production from low grade biomass. **Energy & Environmental Science**, v.

4, n. 1, p. 216, 2011.

STROM, P. F. Effect of temperature on bacterial species diversity in thermophilic solid-waste composting. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 899–905, 1985.

TAJIMA, K. et al. Rumen bacterial diversity as determined by sequence analysis of 16S rDNA libraries. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 29, p. 159–169, 1999.

TALE, V. P.; MAKI, J. S.; ZITOMER, D. H. Bioaugmentation of overloaded anaerobic digesters restores function and archaeal community. **Water Research**, v. 70, p. 138–147, 2015.

TAM, R. **Biodiesel fuel use in diesel engines**. Washington, D. C.: [s.n.].

TAPIA-VENEGAS, E. et al. Adaptation of acidogenic sludge to increasing glycerol concentrations for biohydrogen production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2015.

TEMUDO, M. F. et al. Glycerol fermentation by (open) mixed cultures: A chemostat study. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 100, n. 6, p. 1088–1098, 2008.

TEMUDO, M. F.; KLEEREBEZEM, R.; VAN LOOSDRECHT, M. Influence of the pH on (open) mixed culture fermentation of glucose: A chemostat study. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 98, n. 1, p. 69–79, 2007.

VAN GINKEL, S.; LOGAN, B. E. Inhibition of biohydrogen production by undissociated acetic and butyric acids. **Environmental science & technology**, v. 39, n. 23, p. 9351–6, 1 dez. 2005.

VAN VLAARDINGEN, P. L.; VAN BEELEN, P. Toxic effects of pollutants on the mineralization of acetate in methanogenic river sediment. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 52, n. 1, p. 46–53, 1994.

VARRONE, C. et al. Statistical optimization of biohydrogen and ethanol production from crude glycerol by microbial mixed culture. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 21, p. 16479–16488, nov. 2012.

VARRONE, C. et al. Enrichment of activated sludge for enhanced hydrogen production from crude glycerol. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 3, p. 1319–1331, fev. 2013.

VEEKEN, A.; HAMELERS, B. Effect of temperature on hydrolysis rates of selected biowaste components. **Bioresource Technology**, v. 69, n. 3, p. 249–254, 1999.

VENKATA MOHAN, S. Harnessing of biohydrogen from wastewater treatment using mixed fermentative consortia: Process evaluation towards optimization. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, n. 17, p. 7460–7474, set. 2009.

VENKATA MOHAN, S.; LALIT BABU, V.; SARMA, P. N. Effect of various pretreatment methods on anaerobic mixed microflora to enhance biohydrogen production utilizing dairy wastewater as substrate. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 1, p. 59–67, 2008.

VENKATA MOHAN, S.; VIJAYA BHASKAR, Y.; SARMA, P. N. Biohydrogen production

- from chemical wastewater treatment in biofilm configured reactor operated in periodic discontinuous batch mode by selectively enriched anaerobic mixed consortia. **Water Research**, v. 41, n. 12, p. 2652–2664, 2007.
- VIANA, M. B. **Produção de biogás a partir de glicerol oriundo de biodiesel**. [s.l.: s.n.].
- VIANA, M. B. et al. Anaerobic digestion of crude glycerol : a review. **Environmental Technology Reviews**, v. 1, n. 1, p. 81–92, 2012a.
- VIANA, M. B. et al. Biodegradability and methane production potential of glycerol generated by biodiesel industry. **Water Science and Technology**, v. 66, n. 10, p. 2217–22, jan. 2012b.
- VIANA, M. B. et al. **Hydrogen and methane production from crude glycerol using a two-stage anaerobic process**. 16th International Biotechnology Symposium and Exhibition. **Anais...Fortaleza**: 2014a
- VIANA, Q. M. et al. Fermentative H₂ production from residual glycerol: a review. **Biotechnology Letters**, v. 36, n. 7, p. 1381–90, jul. 2014b.
- VLASSIS, T. et al. Anaerobic treatment of glycerol for methane and hydrogen production. **Global NEST Journal**, v. 14, n. 2, p. 149–156, 2012.
- WALLACE, R. J. et al. *Eubacterium pyruvativorans* sp. nov., a novel non-saccharolytic anaerobe from the rumen that ferments pyruvate and amino acids, forms caproate and utilizes acetate and propionate. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, n. 4, p. 965–970, 2003.
- WANG, A. et al. Bioaugmented hydrogen production from microcrystalline cellulose using co-culture—*Clostridium acetobutylicum* X9X9 and *Ethanoigenens harbinense* B49B49. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, n. 2, p. 912–917, jan. 2008.
- WANG, J.; WAN, W. Comparison of different pretreatment methods for enriching hydrogen-producing bacteria from digested sludge. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, n. 12, p. 2934–2941, jun. 2008.
- WANG, Z. X. et al. Glycerol production by microbial fermentation: a review. **Biotechnology Advances**, v. 19, n. 3, p. 201–23, jun. 2001.
- WEIMER, P. J.; NERDAHL, M.; BRANDL, D. J. Production of medium-chain volatile fatty acids by mixed ruminal microorganisms is enhanced by ethanol in co-culture with *Clostridium kluyveri*. **Bioresource Technology**, v. 175, p. 97–101, 2015.
- WEIMER, P. J.; STEVENSON, D. M. Isolation, characterization, and quantification of *Clostridium kluyveri* from the bovine rumen. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 94, n. 2, p. 461–466, 2012.
- XING, D. et al. Monitoring of microbial community structure and succession in the biohydrogen production reactor by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). **Science in China Series C**, v. 48, n. 2, p. 155–162, 2005.
- 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. 13, jan. 2012.

- YAZDANI, S. S.; GONZALEZ, R. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, p. 213–219, 2007.
- YAZDANI, S. S.; GONZALEZ, R. Engineering *Escherichia coli* for the efficient conversion of glycerol to ethanol and co-products. **Metabolic Engineering**, v. 10, n. 6, p. 340–351, 2008.
- YERKES, D.; BOONYAKITSOMBUT, S.; SPEECE, R. Antagonism of sodium toxicity by the compatible solute betaine in anaerobic methanogenic systems. **Water Science and Technology**, v. 36, n. 6-7, p. 15–24, 1997.
- YI, X. H. et al. Characteristics and dominant microbial community structure of granular sludge under the simultaneous denitrification and methanogenesis process. **Biochemical Engineering Journal**, v. 107, n. x, p. 66–74, 2016.
- ZENG, A. et al. Pathway analysis of glycerol fermentation by *Klebsiella pneumoniae*: Regulation of reducing equivalent balance and product formation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 15, 1993.
- 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, B. et al. The influence of pH hydrolysis and acidogenesis of kitchen wastes in two-phase anaerobic digestion. **Environmental Technology**, v. 26, n. 3, p. 329–339, 2005.
- ZHANG, H.; BRUNS, M. A.; LOGAN, B. E. Biological hydrogen production by *Clostridium acetobutylicum* in an unsaturated flow reactor. **Water research**, v. 40, n. 4, p. 728–34, fev. 2006.
- ZHANG, J. et al. Physical and hydrodynamic properties of flocs produced during biological hydrogen production. **Biotechnology and bioengineering**, v. 88, n. 7, p. 854–60, 30 dez. 2004.
- ZHANG, M. L. et al. Enhanced biohydrogen production from cornstalk wastes with acidification pretreatment by mixed anaerobic cultures. **Biomass and Bioenergy**, v. 31, n. 4, p. 250–254, 2007.
- ZHU, H.; BELAND, M. Evaluation of alternative methods of preparing hydrogen producing seeds from digested wastewater sludge. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 31, n. 14, p. 1980–1988, nov. 2006.
- ZHU, H.; BÉLAND, M. Evaluation of alternative methods of preparing hydrogen producing seeds from digested wastewater sludge. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 31, n. 14, p. 1980–1988, 2006.
- ZWIETERING, M. H. et al. Modeling of the bacterial growth curve. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 6, p. 1875–1881, 1990.