



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE PESQUISAS HIDRÁULICAS



PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS HÍDRICOS E SANEAMENTO AMBIENTAL

**AVALIAÇÃO DO REGIME OPERACIONAL SEMI-CONTÍNUO EM
FERMENTADOR ANAERÓBIO PARA A PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO E
ÁCIDOS GRAXOS VOLÁTEIS UTILIZANDO GLICEROL COMO SUBTRATO**

TESE DE DOUTORADO

MARIA CRISTINA DE ALMEIDA SILVA

Porto Alegre, abril de 2017.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE PESQUISAS HIDRÁULICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS HÍDRICOS E SANEAMENTO AMBIENTAL

**AVALIAÇÃO DO REGIME OPERACIONAL SEMI-CONTÍNUO EM
FERMENTADOR ANAERÓBIO PARA A PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO E
ÁCIDOS GRAXOS VOLÁTEIS UTILIZANDO GLICEROL COMO SUBSTRATO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental.

Orientador:

Dr. Luiz Olinto Monteggia

Co-orientadora:

Dra. Gertrudes Corção

Doutoranda:

Maria Cristina de Almeida Silva

Porto Alegre

2017

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, prof. Luiz Monteggia, agradeço o incentivo, confiança e dedicação. Muito obrigada pela amizade e por todos os ensinamentos passados.

Ao meu grande amigo Júnior, por toda a ajuda na montagem e acompanhamento dos experimentos. Não tenho palavras para agradecer toda a sua disponibilidade e auxílio! Muito obrigada!

À Camille Granada, pela ajuda nos ensaios de biologia molecular. Obrigada pela disponibilidade, apoio e paciência!

Ao meu noivo Juliano, por toda a dedicação e apoio incondicional. Pelos finais de semana e feriados no IPH, sempre me acompanhando e incentivando, compreendendo minha ausência. Tens toda minha gratidão, amor, carinho e respeito;

Aos colegas e amigos da Univates, que apoiaram e incentivaram a conclusão desta etapa, em especial Rafael e Odorico;

Aos ex-alunos e atuais amigos, agradeço a descontração, risadas, companheirismo e a hospitalidade em Lajeado!

À equipe de Técnicos do LabSan do IPH, em especial Louidi e Cleinir. Obrigada por tudo!

À equipe do Laboratório de Biorreatores da Univates, em especial à Camila, e do Tecnovates. Obrigada pela disponibilidade, auxílio e empréstimo dos medidores de vazão de gás.

À equipe do Laboratório de Genética da Univates, agradeço a liberação de espaço para realização das análises de extração de DNA e PCR;

À Equipe do Centro de Excelência em Pesquisa e Inovação em Petróleo, Recursos Minerais e Armazenamento de Carbono (CEPAC) da PUC, agradeço a disponibilidade em realizar as análises de sequenciamento e a rapidez na liberação dos resultados;

Aos colegas e amigos do PPGRHSA, pelas conversas, estudos, auxílio, RU, risadas, churrascos e café (ou água quente). Obrigada pelo ótimo ambiente de trabalho proporcionado;

Ao meu pai Mário Sérgio. Obrigada pelo apoio e incentivo!

A todos que contribuíram direta e indiretamente com este trabalho.

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo principal a avaliação do regime operacional semi-contínuo para a produção de hidrogênio e ácidos graxos voláteis, utilizando glicerol como substrato e inóculo misto. Em um teste preliminar em batelada, foi avaliado o potencial de produção de hidrogênio deste substrato, comparando com sacarose, utilizando inóculo natural e direto. Foram verificados resultados satisfatórios, com parâmetros de desempenho semelhantes e até superiores aos obtidos com sacarose, quando utilizada a inoculação direta. Sendo assim, dois reatores semi-contínuos foram operados durante 132 dias, empregando biomassa suspensa, e glicerol nas concentrações de 10 e 50 g/L. O inóculo empregado foi oriundo de reator anaeróbio, submetido a tratamento térmico. Para comparação dos resultados dos reatores semi-contínuos, outros dois reatores foram operados de forma contínua, durante 62 dias, sob as mesmas condições já descritas, exceto pela presença de meio suporte para aderência da biomassa. O tempo de detenção hidráulico testado foi 1 d em ambos os regimes operacionais propostos, sendo e o tempo de detenção celular dos reatores semi-contínuos de 1,5 d. Os indicadores de desempenho avaliados foram eficiência de conversão do substrato, volume, produtividade e rendimento de hidrogênio, bem como distribuição mássica de ácidos graxos voláteis e grau de acidificação. Também foi verificada a diversidade microbiana nos reatores semi-contínuos e contínuos. Os principais ácidos graxos formados nos reatores semi-contínuos foram acético e butírico, e nos contínuos, propiônico. No início do experimento, foi verificada elevada produção de biogás e hidrogênio nos reatores semi-contínuos, com queda dos valores no decorrer do teste, sendo mais pronunciada no reator com maior concentração afluyente de glicerol. Já os reatores contínuos, desde o início do teste, apresentaram baixa produção de gás, o que conseqüentemente resultou em baixíssimos valores de rendimento e produtividade de hidrogênio. Os reatores semi-contínuos apresentaram satisfatória produtividade volumétrica quando a menor concentração de glicerol foi empregada, alcançando o valor máximo de 2928 mL H₂/L.d, e baixo rendimento, em torno de 0,1 mol H₂/mol glicerol. Foi possível associar a elevada produção hidrogênio e ácidos graxos voláteis nos reatores semi-contínuos com o gênero *Enterobacter*. Já a baixa produção foi vinculada ao gênero *Clostridium*. Nos reatores contínuos, foi verificada a influência da família *Veillonellaceae* (*Pectinatus*), que são produtores de ácido propiônico.

Palavras-chave: Reator semi-contínuo. Glicerol. Ácidos graxos voláteis. Hidrogênio.

ABSTRACT

*The purpose of the present work was to evaluate the semi-continuous operational regime for production of hydrogen and volatile fatty acids, using glycerol as substrate and mixed inoculum. The hydrogen production potential from glycerol was evaluated by a preliminary batch test using natural and direct inoculum, and the results were compared with sucrose. Satisfactory hydrogen production results from glycerol were observed when direct inoculation was used, with similar and even better values when compared to sucrose. Two semi-continuous reactors were operated, during 132 days, with suspended biomass and glycerol at concentrations of 10 and 50 g/L. The inoculum was from an anaerobic reactor, submitted to thermal treatment. Two other reactors were operated continuously for 62 days as a comparison for the results of the semi-continuous reactors. The same conditions were applied, except for the presence of support medium for biomass adherence. The hydraulic detention time tested was 1 d in both operating regimes, and the semi-continuous reactors cell detention time was 1.5 d. The evaluated performance indicators were substrate conversion efficiency, volume and hydrogen yield, as well as mass distribution of volatile fatty acids and acidification degree. Microbial diversity was also evaluated in semi-continuous and continuous reactors. The main fatty acids formed were acetic and butyric in the semi-continuous, and propionic in the continuous reactors. There was a high production of biogas and hydrogen in the semi-continuous reactors at the beginning of the experiment, with rates dropping during the test, mainly in the reactor with higher affluent glycerol concentration. The continuous reactors presented low gas production from the beginning of the test, which resulted in extremely low values of hydrogen yield. The semi-continuous reactors presented satisfactory volumetric productivity when the lowest concentration of glycerol was used, reaching a maximum value of 2928 mL H₂/L.d, and low yield, around 0.1 mol H₂ / mol glycerol. It was possible to associate the high production of hydrogen and volatile fatty acids in the semi-continuous reactors with the genus *Enterobacter*. The low hydrogen production was related to the genus *Clostridium*. The continuous reactors were influenced by the presence of *Veillonellaceae* (*Pectinatus*) family, which are propionic acid producers.*

Key-words: *Semi continuous reactor. Glycerol. Volatile fatty acids. Hydrogen.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Participação de energias renováveis na matriz energética brasileira.....	19
Figura 2: Rotas de produção e utilização do hidrogênio como vetor energético	21
Figura 3: Representação esquemática da decomposição de material orgânico por digestão anaeróbia.....	23
Figura 4: Representação da produção de biodiesel pelo processo de transesterificação.	26
Figura 5: Representação esquemática do metabolismo do glicerol durante a fermentação anaeróbia.....	28
Figura 6: Experimentos realizados no presente trabalho.	65
Figura 7: Sistema utilizado para a realização dos testes em batelada (a) Frasco de reação, manômetro e seringa para alívio de pressão e (b) caixa de acrílico para manutenção da temperatura e agitação constantes.	48
Figura 8: Fermentadores operados de forma semi-contínua. (a) Medidores de vazão de gás; (b) Bombas de alimentação; (c) Bombas de retirada de efluente; (d) Sistema de aquecimento dos reatores.....	49
Figura 9: Fermentadores em paralelo operados de forma contínua. (a) Medidores de vazão de gás; (b) Sistema de mistura mecanizada; (c) Tanques para alimentação; (d) Ponto de retirada do efluente; (e) Bombas dosadoras para alimentação dos reatores.	51
Figura 10: Reator utilizado nos testes com alimentação contínua. (a) Cesto metálico; (b) Septo para coleta do biogás, (c) Cinta de aquecimento, (d) Orifício para extravasamento natural do efluente, (e) Eixo central de agitação e (f) Válvula para esvaziamento e limpeza do reator.....	52
Figura 11: Anéis Pall utilizados na etapa 3.....	55
Figura 12: Rotas metabólicas, oxidativa e redutiva, de fermentação de glicerol.....	109

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Produtividade volumétrica de H ₂ por massa de matéria orgânica removida obtida utilizando glicerol e sacarose como substrato orgânico, com inoculação direta e natural, nas relações A/M propostas.	70
Gráfico 2: Produtividade volumétrica de H ₂ nas relações A/M propostas, com inoculação direta e natural, glicerol e sacarose como fonte carbonácea.....	72
Gráfico 3: Produtividade volumétrica específica nas relações A/M propostas, utilizando glicerol e sacarose como substrato.	74
Gráfico 4: Distribuição percentual mássica dos AGV produzidos, conforme cada relação A/M proposta, em função do tipo de inóculo e de substrato utilizados.	77
Gráfico 5: Grau de acidificação dos experimentos em batelada, utilizando glicerol e sacarose como substrato e inoculação direta e natural, em cada relação A/M proposta.....	79
Gráfico 6: Conversão de glicerol e remoção de DQO durante o período de realização do teste, nos reatores semi-contínuos 1 e 2.....	82
Gráfico 7: Conversão de glicerol nos reatores contínuos 1 e 2, no decorrer do período experimental.	82
Gráfico 8: <i>Boxplot</i> dos dados de conversão de glicerol (%) nos reatores semi-contínuos e contínuos 1 e 2.....	83
Gráfico 9: Concentração de SVT dos reatores semi-contínuos e contínuos no decorrer dos experimentos.....	86
Gráfico 10: Concentração de SVT dos reatores contínuos no meio líquido no decorrer do experimento e do meio suporte, no início e ao final do teste.	86
Gráfico 11: pH verificado durante a operação dos reatores semi-contínuos 1 e 2, durante período experimental.	88
Gráfico 12: pH medido nos reatores contínuos 1 e 2 no decorrer do teste.....	89
Gráfico 13: Distribuição mássica dos ácidos graxos voláteis durante o monitoramento do ...	92
Gráfico 14: Distribuição mássica dos ácidos graxos voláteis durante o monitoramento do reator semi-contínuo 2, relacionada com o pH.....	92

Gráfico 15: Distribuição mássica dos ácidos graxos voláteis durante o monitoramento do reator contínuo 1, relacionada com o pH.....	93
Gráfico 16: Distribuição mássica dos ácidos graxos voláteis durante o monitoramento do reator contínuo 2, relacionada com o pH.....	94
Gráfico 17: Grau de acidificação verificado durante o monitoramento dos reatores semi-contínuos 1 e 2.....	95
Gráfico 18: Grau de acidificação verificado durante o monitoramento dos reatores contínuos 1 e 2.	95
Gráfico 19: <i>Boxplot</i> dos dados de grau de acidificação dos reatores semi-contínuos e contínuos.....	96
Gráfico 20: Volume (L) máximo de H ₂ produzido diariamente durante a operação dos reatores semi-contínuos 1 e 2.	99
Gráfico 21: Produção de H ₂ diária durante a operação dos reatores contínuos 1 e 2.....	99
Gráfico 22: <i>Boxplot</i> dos resultados de volume de H ₂ obtidos durante a operação dos reatores semi-contínuos e contínuos.	100
Gráfico 23: Proporção de H ₂ no biogás durante a operação do fermentador semi-contínuo 1.	101
Gráfico 24: Proporção de H ₂ no biogás gerado durante a operação do fermentador semi-contínuo 2.	101
Gráfico 25: Proporção de H ₂ gerado no reator contínuo 1, durante o experimento.	102
Gráfico 26: Proporção de H ₂ gerado no reator contínuo 2, no decorrer do teste.	102
Gráfico 27: <i>Boxplot</i> dos valores de porcentagem de H ₂ no biogás dos reatores semi-contínuos e contínuos.....	103
Gráfico 28: Rendimento molar obtido durante a operação dos fermentadores operados de forma semi-contínua, nas concentrações de 10 e 50 g/L.....	105
Gráfico 29: Rendimento molar obtido durante a operação dos fermentadores operados de forma contínua, nas concentrações de glicerol de 10 e 50 g/L.....	106
Gráfico 30: <i>Boxplot</i> dos resultados obtidos de rendimento molar dos reatores operados de forma semi-contínua e contínua.	106

Gráfico 31: Produtividade volumétrica dos reatores semi-contínuos durante o experimento realizado.....	110
Gráfico 32: Produtividade volumétrica dos reatores contínuos no decorrer do teste.....	111
Gráfico 33: <i>Boxplot</i> da produtividade volumétrica dos reatores semi-contínuos e contínuos.	111
Gráfico 34: Produtividade volumétrica específica obtida nos reatores operados sob a forma semi-contínua.	114
Gráfico 35: Produtividade volumétrica específica dos reatores contínuos, durante o período operacional.....	115
Gráfico 36: <i>Boxplot</i> da produtividade volumétrica específica dos reatores operados de forma semi-contínua e contínua.	115
Gráfico 37: Agrupamento hierárquico clássico baseado na abundância relativa dos microrganismos presentes em cada reator.	117
Gráfico 38: Diversidade microbiana, baseada na abundância relativa dos microrganismos, encontrada no reator semi-contínuo 1, no início e no fim da operação.....	118
Gráfico 39: Diversidade microbiana, baseada na abundância relativa dos microrganismos, encontrada no reator semi-contínuo 2, no início e no fim da operação.....	119
Gráfico 40: Diversidade microbiana, baseada na abundância relativa dos microrganismos, encontrada durante a operação dos reatores contínuos 1 e 2.....	121
Gráfico 41: Análise de correlação canônica entre os microrganismos encontrados nos reatores, parâmetros físicos e químicos, volume de biogás e hidrogênio.....	124

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 - Produção de Biohidrogênio	27
Equação 2 - Conversão de glicerol a ácido acético e H ₂	28
Equação 3 - Conversão de glicerol a ácido butírico e H ₂	29
Equação 4 - Conversão de glicerol a butanol e H ₂	29
Equação 5 - Conversão de glicerol a etanol e H ₂	29
Equação 6 - Conversão de glicerol a 1,3-PD.....	29
Equação 7 - Conversão de glicerol a ácido propiônico	29
Equação 8 – Cálculo da vazão de descarte do lodo para manutenção de TDC.....	53
Equação 9 – Eficiência na conversão de substrato.....	62
Equação 10 – Cálculo da carga orgânica volumétrica.....	62
Equação 11 – Rendimento molar de H ₂	62
Equação 12 – Produtividade volumétrica de H ₂ por massa de DQO removida.....	63
Equação 13 – Produtividade volumétrica.....	63
Equação 14 – Produtividade molar específica	63
Equação 15 – Produtividade volumétrica específica.....	63
Equação 16 – Grau de acidificação	64
Equação 17 – Conversão de sacarose a H ₂ e ácido acético	78
Equação 18 – Conversão de sacarose a H ₂ e ácido butírico	78
Equação 19 – Conversão de sacarose a ácido propiônico	78
Equação 20 – Utilização de H ₂ pelas bactérias homoacetogênicas.....	121

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição média do glicerol bruto (percentual em massa) de plantas de biodiesel brasileiras.....	26
Tabela 2: Formulação de nutrientes para obtenção da maior produtividade de hidrogênio e taxa de produção de hidrogênio.....	41
Tabela 3: Revisão da literatura relacionada a utilização de glicerol como fonte de matéria orgânica, para produção de hidrogênio.....	43
Tabela 4: Formulação nutricional para produção de hidrogênio via fermentativa.....	55
Tabela 5: Periodicidade das amostragens realizadas nos experimentos propostos.....	56
Tabela 6: Metodologias empregadas para a realização das análises físicas e químicas.....	57
Tabela 7: Caracterização do glicerol e do inóculo utilizado nos experimentos.	68
Tabela 8: Eficiências de conversão de glicerol e sacarose e remoção de DQO, em cada relação A/M proposta na Etapa 1, empregando inoculação direta e natural.	69
Tabela 9: Concentração e carga orgânica volumétrica adicionada nos reatores 1 e 2, operados de forma semi-contínua e contínua.....	81
Tabela 10: Valores médios, máximos e mínimos de remoção de DQO encontrados durante a operação dos reatores semi-contínuos e contínuos.....	85
Tabela 11: Valores médios, máximos e mínimos de pH encontrados durante a operação dos reatores semi-contínuos e contínuos.....	89
Tabela 12: Comparação dos resultados encontrados na bibliografia utilizando glicerol (puro e bruto) como substrato em sistemas contínuos, com os dados obtidos neste trabalho.	132

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo Geral.....	17
2.2 Objetivos Específicos.....	17
3 REFERENCIAL TEÓRICO	18
3.1 Panorama energético atual	18
3.2 Energias renováveis, biocombustíveis e hidrogênio	20
3.3 Digestão Anaeróbia.....	22
3.4 Glicerol.....	25
3.5 Produção de hidrogênio utilizando glicerol como substrato orgânico.....	27
3.6 Fatores interferentes na produção de hidrogênio	29
3.6.1 Inóculo.....	29
3.6.2 Concentração de substrato.....	31
3.6.3 Tempo de detenção hidráulico	32
3.6.4 Tempo de detenção celular.....	33
3.6.5 Tipo de reator	35
3.6.6 pH.....	39
3.6.7 Temperatura.....	40
3.6.8 Nutrientes	40
3.7 Microrganismos responsáveis pela produção de Hidrogênio	44
3.8 Outras considerações.....	46
4 MATERIAIS E MÉTODOS	48
4.1 Equipamentos.....	48
4.1.1 Reatores em batelada.....	48

4.1.2	Reatores de mistura completa com biomassa suspensa e operados de forma semi-contínua	49
4.1.3	Reatores agitados, com biomassa aderida e operados em sistema de alimentação contínua.....	50
4.2	Procedimento experimental.....	52
4.2.1	Temperatura e pH inicial	52
4.2.2	Água residuária.....	53
4.2.3	Tempo de detenção hidráulico	53
4.2.4	Tempo de detenção celular.....	53
4.2.5	Inóculo, material suporte e procedimento de imobilização.....	54
4.2.6	Meio Nutricional	55
	Fonte: Lin & Lay (2005).	55
4.2.7	Análises para monitoramento dos reatores.....	56
4.2.8	Avaliação da diversidade microbiana.....	59
4.2.9	Fundamentos teóricos.....	62
4.2.10	Descrição dos experimentos.....	64
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	68
5.1	Etapa 1: Reatores em batelada	68
5.1.1	Conversão de substrato e matéria orgânica	69
5.1.2	Produção de hidrogênio.....	70
5.1.3	Produção de ácidos graxos voláteis.....	76
5.2	Etapa 2 e 3: Reatores semi-contínuos e contínuos	80
5.2.1	Parâmetros físicos e químicos	81
5.2.2	Volume de H ₂	98
5.2.3	Rendimento molar	105
5.2.4	Produtividade volumétrica	110
5.2.5	Produtividade volumétrica específica	114

5.2.6. Diversidade microbiana.....	116
5.2.7. Reator semi-contínuo vs. contínuo.....	125
5.3 Considerações finais	129
6 CONCLUSÃO.....	134
7 RECOMENDAÇÕES.....	136
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	137

1 INTRODUÇÃO

A energia é essencial para o desenvolvimento econômico e social. Entretanto, grande parte da energia é atualmente consumida e produzida sob formas que não poderiam ser sustentadas em longo prazo (MOHR et al, 2015; REN, 2016).

Diversas fontes de geração de biocombustíveis têm sido amplamente pesquisadas, e entre as quais a tecnologia envolvendo a utilização de biohidrogênio parece vantajosa (WANG & WAN, 2009; HALLENBECK, 2009; ROSSI et al, 2011; MAINTINGUER, HATANAKA & OLIVEIRA, 2015; ARIMI et al, 2015, SARMA et al, 2015).

O hidrogênio (H_2) gera somente água quando utilizado em uma célula a combustível. Isso ocorre porque a molécula de H_2 não é quimicamente ligada a átomos de carbono, e por isso, não contribui para as emissões de dióxido de carbono (CO_2) na atmosfera. Além disso, pode ser produzido biologicamente a partir de fontes renováveis, como biomassa e efluentes de águas residuárias industriais (DEMIREL et al, 2010; LIN et al, 2012; SARMA et al, 2015).

A produção biológica de H_2 é uma alternativa viável para os métodos atuais de produção do gás hidrogênio, caracterizados por demandarem elevados insumos energéticos (DAS & VEZIROGLU, 2001). Dentre os processos descritos, a fermentação é a mais atraente (DAS & VEZIROGLU, 2001; LEE et al, 2010) e promissora (DEMIRBAS, 2009). Conforme Wang & Wan (2009) e Saratale, Saratale & Chang (2013), também é viável para utilização em larga escala, pois produz H_2 continuamente, mesmo sem requerimento de iluminação, e grande variedade de fontes de carbono podem ser utilizadas como substrato, como efluentes e resíduos. Além disso, também produz metabólitos valiosos, como os ácidos graxos voláteis e 1,3-propanodiol (LEE et al, 2001; SELEMBO et al, 2009; BOSIO, 2014; NAZARETH, 2015; ROSSI et al, 2015).

A produção de H_2 via fermentação pode ser influenciada por vários fatores como inóculo, concentração de substrato, tipo de reator, temperatura, pH, nutrientes (WANG & WAN, 2009), tempo de detenção hidráulico (ARIMI et al, 2015) e celular (LEE, LI & NOIKE, 2010). Além de otimizar o projeto do reator, é necessário conhecimento da comunidade microbiana responsável pela produção de hidrogênio, a fim de revelar os fatores que influenciam a eficiência e a estabilidade operacional. A partir deste conhecimento é possível o desenvolvimento de estratégias para a melhoria do desempenho de operação de reatores (HUNG et al, 2007).

Os principais critérios para a seleção do substrato para produção de H₂ são disponibilidade, custo e biodegradabilidade (KAPDAN & KARGI, 2006). O efluente caracterizado como glicerol tem origem na produção de biodiesel, biocombustível que tem apresentado demandas de consumo crescente. Entretanto, sua produção industrial acarreta elevado acúmulo de rejeitos ricos em glicerol, estimado em 10% do volume total de biodiesel produzido (FRANCO, 2011). Sendo assim, os grandes excedentes de glicerol que são gerados requerem novas utilizações a serem identificadas (MAINTINGUER, HATANAKA E OLIVEIRA, 2015). O emprego da fermentação anaeróbia, para a conversão desta substância em produtos de maior valor, pode representar uma rota promissora para alcançar a viabilidade econômica na indústria de biocombustíveis (VARRONE et al, 2013).

A presente pesquisa buscou avaliar a operação semi-contínua de reatores para a produção de H₂, utilizando o glicerol bruto oriundo da produção de biodiesel. O regime operacional semi-contínuo foi pouco descrito para esta finalidade, e nenhum trabalho foi relatado pela literatura utilizando glicerol como substrato e inóculo misto. Além deste modelo, reatores contínuos também foram operados, a fim de realizar uma comparação dos resultados de ambos os regimes operacionais. Sendo assim, foi possível verificar a relação destes modelos operacionais com a diversidade microbiana, formação de ácidos graxos voláteis e, principalmente, produção de hidrogênio.

O presente trabalho está disposto em 6 capítulos. O Capítulo 2 aborda o objetivo geral e os específicos. O Capítulo 3 apresenta o referencial teórico acerca das questões pertinentes ao tema proposto. No Capítulo 4 estão descritas as metodologias aplicadas na realização do estudo. No Capítulo 5 estão apresentados os resultados e a discussão. No Capítulo 6 é apresentada a conclusão, com os resultados mais significativos da presente pesquisa. Por fim, no Capítulo 7, algumas recomendações para trabalhos futuros são propostas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a produção de hidrogênio por fermentação anaeróbia empregando o regime operacional semi-contínuo, utilizando glicerol bruto como substrato orgânico e inóculo misto de microrganismos.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o potencial de produção de hidrogênio e ácidos graxos voláteis a partir da utilização de glicerol bruto e sacarose como substratos orgânicos, inoculação direta e natural em ensaios em batelada e comparar os resultados obtidos;

- Comparar o efeito dos regimes operacionais semi-contínuo, com biomassa suspensa, e contínuo, com biomassa aderida, de reatores anaeróbios, bem como as suas interferências na estabilidade de produção de hidrogênio e ácidos graxos voláteis;

- Identificar a influência da concentração inicial de glicerol, de 10 e 50 g/L, na operação semi-contínua e contínua de reatores, para a produção de hidrogênio e ácidos graxos voláteis;

- Avaliar a diversidade microbiana nos reatores semi-contínuos e contínuos, e associar os gêneros dos microrganismos com a produção de hidrogênio e de ácidos graxos voláteis.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Panorama energético atual

A energia é um dos bens de consumo fundamentais para garantir a qualidade de vida das sociedades modernas. É utilizada para gerar iluminação, movimentar máquinas e equipamentos, promover a comunicação. Da energia também dependem a produção industrial, locomoção, segurança, conforto e vários outros fatores associados à qualidade de vida da população.

Depois da revolução industrial, no final do século XVIII, e especialmente durante o século XX, o impacto da atividade humana sobre o meio ambiente tornou-se muito significativo. O aumento da população e do consumo pessoal, principalmente nos países desenvolvidos, originou problemas ambientais, sendo grande parte destes relacionados com a exploração e utilização da energia. A solução deste impasse é o grande desafio deste início de século para pesquisadores, ambientalistas, governos, organizações não-governamentais e comunidades de todo o mundo.

De acordo com a Rede Mundial de Políticas de Energia Renováveis (REN, 2016) e Mohr et al (2015), no ano de 2015, mais de 80% da produção de energia global foi baseada em fontes não renováveis. Estas, em sua grande maioria, são oriundas da queima de combustíveis fósseis, como carvão e petróleo. Além da possibilidade de esgotamento destes recursos minerais, destaca-se também a problemática ambiental causada pela combustão destes elementos, principalmente quando relacionada às mudanças climáticas. Desta reação são formados gases, como óxidos de carbono (CO_x), de nitrogênio (NO_x), de enxofre (SO_x), e hidrocarbonetos (C_xH_x) (DAS & VEZIROGLU, 2001; CHEN, 2006; MAINTINGUER, HATANAKA & OLIVEIRA, 2015). Poluição, chuva ácida, efeito estufa e destruição da fauna e flora são algumas das conseqüências da utilização de combustíveis fósseis.

Conforme a Agência Internacional de Energia (IEA, 2016), haverá um aumento de 30% na demanda mundial por energia no ano de 2040, e estima-se que centenas de milhões de pessoas não contarão com os serviços básicos de energia. Desta forma, o aumento da procura mundial por energia, a diminuição dos depósitos, bem como os impactos ambientais oriundos da utilização de combustíveis fósseis, exige a busca por fontes de energia alternativas (ARIMI et al, 2015, MOHR et al, 2015).

Conforme o Balanço Energético Nacional (BEN) de 2016, que tem o ano de 2015 como ano base, realizado pela Empresa de Pesquisa Energética (EPE) em parceria com o Ministério de Minas e Energia (MME), as energias renováveis correspondem a 41,2% da matriz nacional brasileira, como pode ser visualizado na Figura 1. Estes valores estão muito acima da média mundial, que em 2013 era de 13%, bem como dos países membros da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE), com apenas 9,4%.

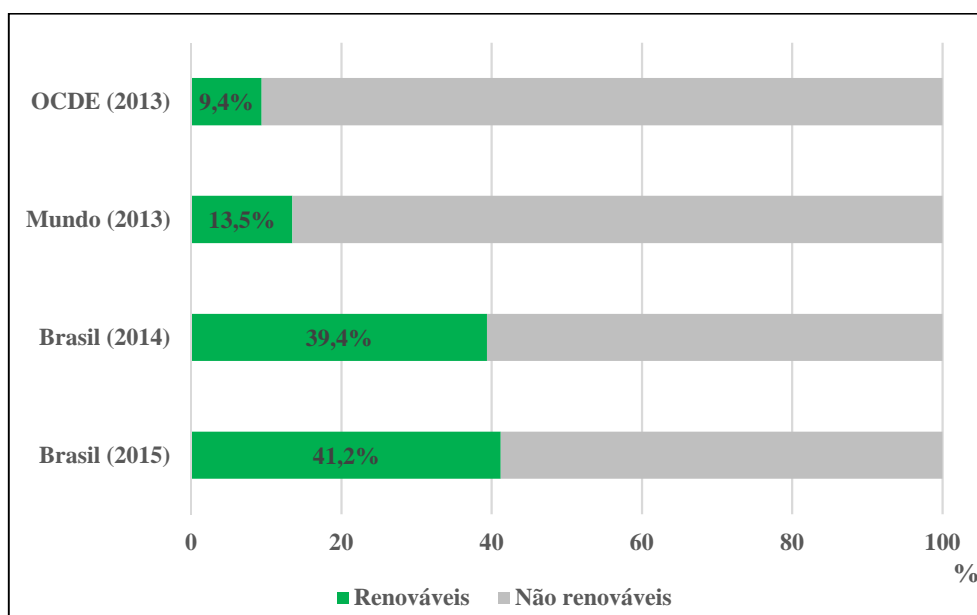


Figura 1: Participação de energias renováveis na matriz energética brasileira.

Fonte: Adaptado de BEN (2016)

Ainda de acordo com BEN (2016), entre as energias renováveis estão a biomassa de cana (16,9%), hidráulica (11,4%), lenha e carvão vegetal (8,2%), lixívia e outras fontes renováveis (4,7%). Já entre as não renováveis, a maior parcela corresponde ao petróleo e derivados (37,3%), gás natural (13,7%), carvão mineral (5,9%), urânio (1,3%) e outras fontes não renováveis (0,6%).

Segundo o Plano Decenal de Expansão de Energia (PDE), no ano de 2024, a matriz energética renovável do Brasil aumentará consideravelmente, devido à diversidade e à disponibilidade dos recursos naturais, que podem ser convertidos em combustíveis ou empregados na geração de energia. Em relação aos biocombustíveis, ressalta-se o biodiesel, com um aumento de 4,3 bilhões de litros em 2015 para 5,6 bilhões de litros em 2024 (MME, 2015).

3.2 Energias renováveis, biocombustíveis e hidrogênio

As fontes de energia renováveis são aquelas em que os recursos naturais utilizados são capazes de se regenerar, ou seja, são consideradas inesgotáveis e não prejudicam a natureza. Exemplos de fontes renováveis incluem a energia solar, a energia eólica, a energia hídrica, as células a combustível e os biocombustíveis (SANTOS & MOTHE, 2008).

Nos últimos anos, esforços têm sido dedicados à maximização da produção de biocombustíveis, economicamente competitivos com os combustíveis fósseis (HALLENBECK & GHOSH, 2009; WILLQUIST et al, 2010, RODRIGUES, 2011). Biocombustíveis são produzidos a partir de fontes renováveis, como biomassa e produtos agrícolas como cana-de-açúcar e plantas oleaginosas e gordura animal (PETROBRÁS, 2016). A utilização destes diminui a dependência do petróleo, melhora a qualidade ambiental e reduz a quantidade de emissões produzidas pelas atividades humanas (MOHAMMADSHIRAZI et al, 2014).

Nessa busca, a escolha da matéria-prima é de central preocupação. Os biocombustíveis de primeira geração são produzidos a partir de substratos ricos em carboidratos. A utilização destes substratos tem gerado discussão, a respeito da possibilidade de competição da produção de energia com o consumo humano, e por isso, acarretar preços elevados destes substratos. Sendo assim, as pesquisas têm sido desenvolvidas para produção de biocombustíveis de segunda geração, assim denominados por utilizarem substratos não-comestíveis como matéria-prima e, como exemplos, pode-se citar os resíduos e efluentes domésticos e industriais (WILLQUIST et al, 2010; RODRIGUES, 2011, ARIMI et al, 2015).

Uma variedade de biocombustíveis tem sido amplamente pesquisada, e a tecnologia envolvendo a utilização de biohidrogênio parece vantajosa (WANG & WAN, 2009; HALLENBECK, 2009; ROSSI et al, 2011; MAINTINGUER, HATANAKA & OLIVEIRA, 2015; ARIMI et al, 2015, SARMA et al, 2015). O biohidrogênio gera somente água durante sua combustão. Isso ocorre porque a molécula de hidrogênio não é quimicamente ligada a átomos de carbono, e por isso, não contribui para as emissões de dióxido de carbono (CO₂) na atmosfera. Além disso, pode ser produzido biologicamente a partir de fontes renováveis, como biomassa e efluentes de águas residuárias industriais (DEMIREL et al, 2010; LIN et al, 2012; SARMA et al, 2015).

O conteúdo energético do hidrogênio também justifica a sua utilização. Possui rendimento superior a qualquer hidrocarboneto, cerca de 122 kJ/g, ou seja, hidrogênio possui conteúdo de energia 2,75 vezes superior (KAPDAN & KARGI, 2006; HAFEZ et al, 2009, ROSSI et al, 2011, ARIMI et al, 2015). Assim, o hidrogênio é considerado uma promissora fonte de energia limpa com alto conteúdo energético.

No entanto, o hidrogênio não é um combustível primário, pois não são encontradas na natureza fontes com quantidades expressivas desse gás em estado puro. Está quase sempre associado a outros elementos químicos, e para utilizá-lo, é necessário extraí-lo de sua fonte de origem, que normalmente implica no gasto de certa quantidade de energia (MME, 2005; CGEE, 2010; DINCER & ACAR, 2015).

Na Figura 2 são mostradas as fontes primárias de energia, processos de produção e usos do hidrogênio. Os métodos convencionais de produção do gás hidrogênio são reforma do vapor de metano e de outros hidrocarbonetos, oxidação parcial não-catalítica de combustíveis fósseis. Esses métodos com processos intensivos de energia requerem altas temperaturas, superiores a 850°C (KAPDAN & KARGI, 2006). De acordo com Dincer & Acar (2015), cerca de 50% da demanda global de hidrogênio é atendida pelo gás natural, 30% é proveniente da reforma do petróleo, 18% da gaseificação do carvão, 3,9% por eletrólise de água e 0,1% de outras fontes.

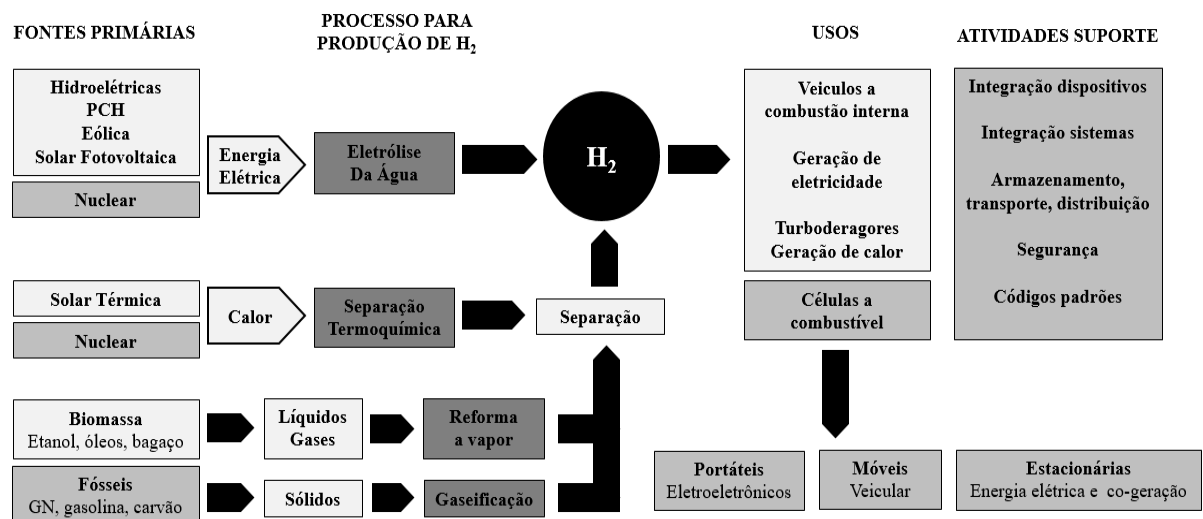


Figura 2: Rotas de produção e utilização do hidrogênio como vetor energético

Fonte: Adaptado de Centro de Gestão e Estudos Estratégicos (CGEE, 2010).

A produção biológica de hidrogênio é uma alternativa viável para os métodos acima citados, pois em sua maior parte é operada em temperatura e pressão ambiente, requerendo menor consumo de energia. Estes processos não só consomem menos energia como também abrem uma nova oportunidade para a utilização de energia renovável, cuja fonte é inesgotável (DAS & VEZIROGLU, 2001).

Assim, surge o termo biohidrogênio, que se refere ao hidrogênio produzido biologicamente, utilizando materiais orgânicos não fossilizados e biodegradáveis como substrato (DEMIRBAS, 2009). Entre os processos biológicos de produção de hidrogênio, pode-se citar a biofotólise direta e indireta, fotofermentação e fermentação (DAS & VEZIROGLU, 2001; LEVIN et al, 2004; DEMIRBAS, 2009; WILLQUIST et al, 2010, ARIMI et al, 2015).

Dentre os processos descritos, a fermentação é a mais atraente (DAS & VEZIROGLU, 2001; LEE et al, 2010) e promissora (DEMIRBAS, 2009). Conforme Wang & Wan (2009) e Saratale, Saratale & Chang (2013), também é viável para utilização em larga escala, pois produz hidrogênio continuamente, mesmo sem iluminação e grande variedade de fontes de carbono podem ser utilizadas como substrato, como efluentes e resíduos. Além disso, também produz metabólitos valiosos, como os ácidos graxos voláteis e 1,3-propanodiol (LEE et al, 2001; SELEMBO et al, 2009; BOSIO, 2014; NAZARETH, 2015; ROSSI et al, 2012).

3.3 Digestão Anaeróbia

A digestão anaeróbia é considerada um ecossistema no qual diversos grupos de microrganismos atuam de forma interativa na conversão da matéria orgânica complexa até produtos finais, como metano (CH_4), CO_2 , sulfeto de hidrogênio (H_2S), H_2 , água e amônia, além de novas células bacterianas. É subdividida em várias rotas metabólicas, com a participação de vários grupos microbianos, cada qual com diferentes comportamentos fisiológicos, como mostrado na Figura 3 e descrição a seguir (LETTINGA et al, 1996).

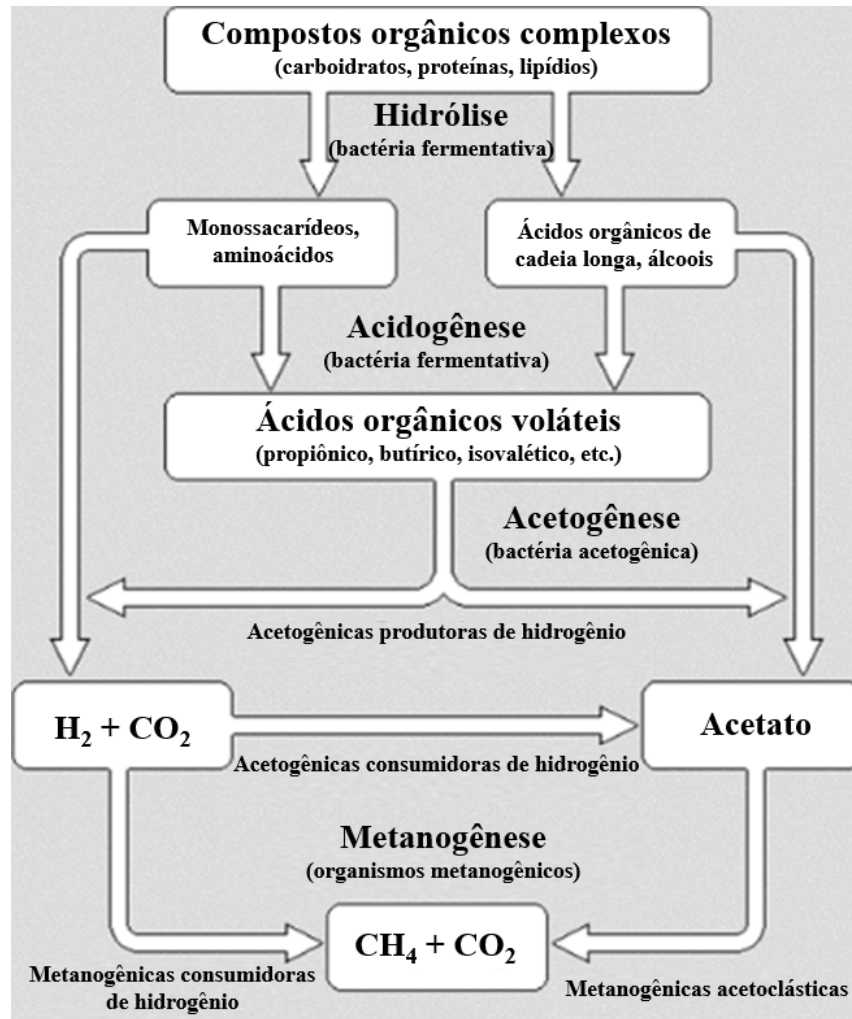


Figura 3: Representação esquemática da decomposição de material orgânico por digestão anaeróbia.

Fonte: adaptado de Lettinga et al. (1996).

Etapa 1: Hidrólise. A primeira fase da digestão anaeróbia consiste na hidrólise do material particulado complexo a material dissolvido, sendo assim capazes de penetrar as membranas celulares de bactérias fermentativas. Esta conversão é realizada graças à ação de exoenzimas excretadas por bactérias hidrolíticas;

Etapa 2: Acidogênese. Os produtos da hidrólise são novamente convertidos em produtos solúveis em água, principalmente pequenas cadeias de ácidos graxos voláteis (AGV), alcoóis, CO_2 e H_2 . É realizada por um grande e diverso grupo de bactérias fermentativas. Usualmente, são do grupo clostridia, que compreende organismos anaeróbios que foram esporos, capazes de sobreviver em condições ambientais adversas.

Etapa 3: Acetogênese. Esta etapa é a ligação entre a degradação de compostos solúveis em água e formação de metano. Os produtos finais do metabolismo microbiano são convertidos em cadeias pequenas de ácidos graxos voláteis, acetato, H_2 e CO_2 . Esta conversão só ocorre em baixas concentrações de H_2 , que é produzido durante a acetogênese como subproduto. Por isso as bactérias acetogênicas vivem em simbiose com as bactérias metanogênicas, que utilizam o H_2 para a formação de metano. O acetato e o CO_2 formados são os principais elementos para as bactérias formadoras de metano;

Etapa 4: Metanogênese. A formação de metano é a última etapa no processo de digestão anaeróbia. As bactérias metanogênicas (*Archeas*) pertencem ao grupo de organismos mais antigos conhecidos. São anaeróbias estritas.

Além do hidrogênio produzido pela etapa acidogênica da digestão anaeróbia, os seus subprodutos, AGV, podem ser utilizados como fonte de carbono para processos de remoção biológica de nutrientes devido a sua fácil biodegradabilidade (UCISIK & HENZE, 2008). Bactérias heterotróficas responsáveis pela remoção de nutrientes utilizam a fonte de carbono disponível presente no meio reacional. Em relação a nitrogênio, o substrato nitrificado é deficiente em carbono orgânico, o que pode limitar o processo de desnitrificação biológica. Assim, fontes de carbono devem ser adicionadas ao meio para promover a desnitrificação. Em relação a fósforo, uma fonte de carbono facilmente biodegradável é necessária para a realização da etapa de armazenamento de fósforo no interior das células (OBAJA et al, 2005).

Wang et al (2008) citam que o acetato é a fonte de carbono utilizada para aprimorar a remoção biológica de fósforo, promovendo desempenho robusto e estável. Van Loosdrecht et al (1997) citam que as bactérias atuantes na absorção de fósforo podem utilizar AGV, e realizar o seu armazenamento intracelular, como poli-hidroxi-butiratos. Oehmen et al (2007) comentam que sistemas de lodo ativado envolvem uma diversa gama de outros substratos, além de acetato, como propionato, butirato, valerato e outros AGV, que podem estar presentes em efluentes reais. A vantagem desta operação consiste principalmente na redução do custo operacional relacionado à necessidade de aquisição de fontes de carbono exógenas (OBAJA et al, 2005). Fontes exógenas de carbono, como o metanol, podem contribuir com até 70% do custo total de operação e manutenção de uma Estação de Tratamento de Efluentes (ETE).

3.4 Glicerol

Os principais critérios para a seleção do substrato são disponibilidade, custo e biodegradabilidade (KAPDAN & KARGI, 2006). Além de sua composição, para atender os requisitos de sustentabilidade, a matéria orgânica deve ser produzida a partir de recursos renováveis, possuir concentração suficiente para que ocorra a conversão da mesma por fermentação, requeira um pré-tratamento mínimo e tenha baixo custo (HAWKES et al, 2002). Glicose e sacarose são os substratos mais utilizados em pesquisas para produção de hidrogênio (WANG & WAN, 2009). Sendo assim, estudos empregando outros substratos orgânicos precisam ser desenvolvidos.

O Brasil foi um dos primeiros países da América Latina a produzir biocombustíveis, como etanol e biodiesel. Em 2005 foi aprovada a exigência da utilização de combustível composto por uma combinação de diesel e biodiesel, este último em proporções de 2, 5 e 20% a serem aplicados em 2007, 2013 e 2020, respectivamente (MONCAYO BRAVO et al, 2015).

Sendo assim, o Brasil é um dos maiores produtores e consumidores de biodiesel no mundo (MAINTINGUER, HATANAKA & OLIVEIRA, 2015; RODRIGUES, 2016). No País, há 50 plantas autorizadas pela Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), para produção de biodiesel, correspondendo a uma capacidade total autorizada de 20480 m³/dia. Além das citadas, existem ainda 5 plantas de biodiesel a serem construídas ou em fase de aumento de produção. Quando as mesmas entrarem em operação, a capacidade total de produção de biodiesel autorizada aumentará 2972 m³/dia, o que representa um acréscimo de mais de 14% na capacidade atual (ANP, 2016).

No processo de transesterificação para obtenção do biodiesel (Figura 4) são utilizados óleos vegetais, ou gorduras animais, álcoois, como etanol ou metanol, e um catalisador alcalino, como o hidróxido de sódio. Nesta reação, o principal subproduto resultante é glicerol, estimado em 10% do volume total de biodiesel produzido (SARMA et al, 2012; VASCONCELOS, 2012, SELEMBO et al, 2009, ROSSI et al, 2012, PEITER et al, 2016). O glicerol oriundo da reação contém inúmeras impurezas tais como quantidade variada de água, resíduos de catalisadores, metanol, entre outras (SEQUINEL, 2013).

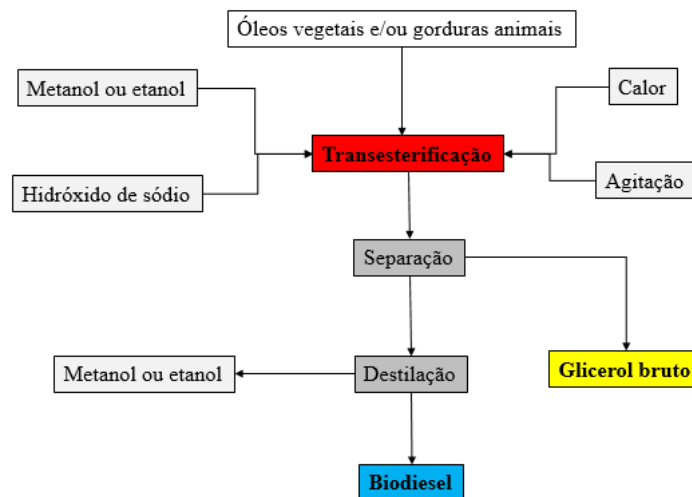


Figura 4: Representação da produção de biodiesel pelo processo de transesterificação.

Fonte: adaptado de Sarma et al (2012).

O glicerol puro pode ser utilizado em indústrias têxteis, químicas, farmacêutica e alimentícia (VASCONCELOS, 2012; ROSSI et al, 2012). Contudo, o uso comercial da glicerina está condicionado ao seu grau de pureza, igual ou maior do que 95%. Para alcançar estes valores, o glicerol bruto, cuja composição média está mostrada na Tabela 1, precisa ser submetido a processos de purificação, o que acarretaria custos demasiadamente elevados. Sendo assim, os grandes excedentes de glicerol que são gerados requerem novas utilizações a serem identificadas (MAINTINGUER, HATANAKA & OLIVEIRA, 2015). O emprego da fermentação anaeróbia, para a conversão desta substância em produtos de maior valor, pode representar uma rota promissora para alcançar a viabilidade econômica na indústria de biocombustíveis (VARRONE et al, 2013).

Tabela 1: Composição média do glicerol bruto (percentual em massa) de plantas de biodiesel brasileiras

Composição	Percentual em massa (%)
Glicerol	80,0 (mín)
Água	10,0 (máx)
Metanol	1,0 (máx)
Cloreto de sódio	10,0 (máx)

Fonte: Adaptado de Luque & Melero (2012).

O glicerol pode ser consumido por microrganismos em processos anaeróbios fermentativos para geração de subprodutos como etanol (ITO et al, 2005; SAKAI & YAGISHITA, 2007, ROSSI et al, 2012), 1,3-propanediol (SELEMBO et al, 2009; ROSSI et al, 2012), ácidos orgânicos (NAZARETH, 2015) e H₂ (TEMUDO et al, 2008; REIS, 2010; MANGAYIL, KARP & SANTALA, 2012; MARU et al, 2013; SARMA et al, 2013; SEIFERT et al, 2009; MONCAYO BRAVO et al, 2015; LO et al, 2013; SARMA et al, 2015; VARRONE et al, 2013; ZAHEDI et al, 2016; DE OLIVEIRA FABER & FERREIRA-LEITÃO, 2016; RODRIGUES, 2016). O 1,3-propanediol pode ser utilizado em aplicações industriais como polímeros, cosméticos, alimentos, solventes e produtos farmacêuticos (ROSSI et al, 2012). O etanol tem sido utilizado na indústria farmacêutica, produtos de limpeza e de higiene (MAINTINGUER, HATANAKA & OLIVEIRA, 2015).

3.5 Produção de hidrogênio utilizando glicerol como substrato orgânico

O processo de produção de biohidrogênio pode ser representado pela simples reação química (DEMIRBAS, 2009):



As bactérias fermentativas produtoras de hidrogênio podem ser selecionadas de fontes naturais, como solo ou lodo anaeróbio. A produção de hidrogênio por fermentação é realizada por um grande grupo de bactérias fermentativas (DEMIRBAS, 2009).

De acordo com Rossi et al (2012), as reações metabólicas propostas para a fermentação de glicerol podem seguir duas possibilidades (Figura 5). A primeira, rota oxidativa, o glicerol é convertido a dihidroxiacetona pela enzima glicerol desidrogenase (dhaD), e subsequentemente fosforilada pela adenosina trifosfato (ATP), na presença de dihidroxiacetona quinase (dhaK). A dihidroxiacetona-P é submetida à glicólise para formar piruvato. Drodzdzynska, Leja & Czaczyk (2011) citam que o piruvato formado pode ser convertido em diferentes produtos, como ácidos orgânicos láctico, acético, butírico, CO₂ e H₂.

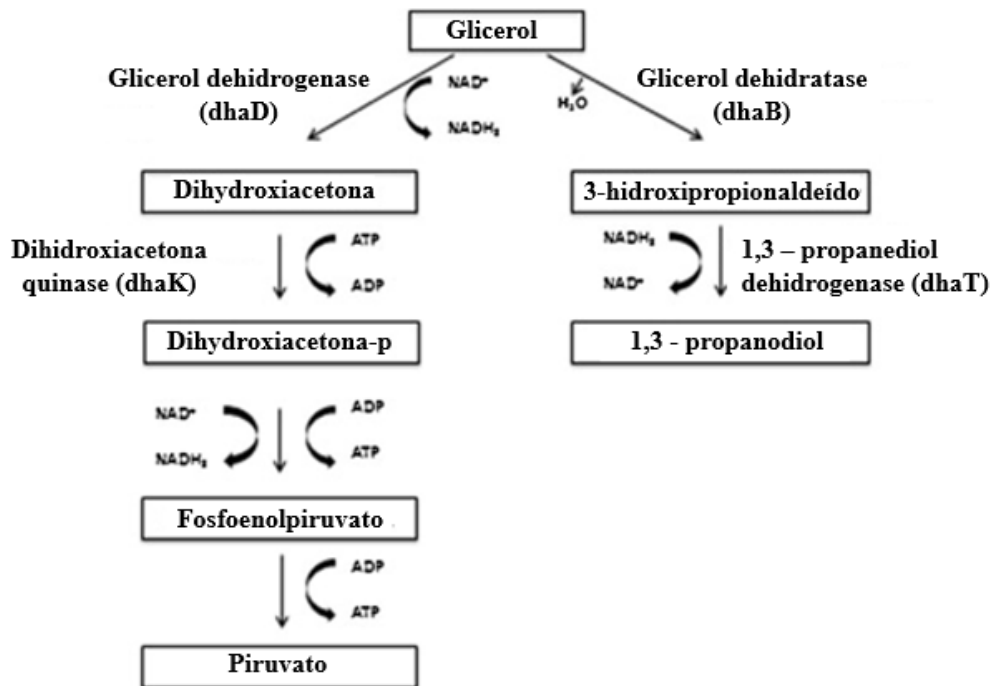
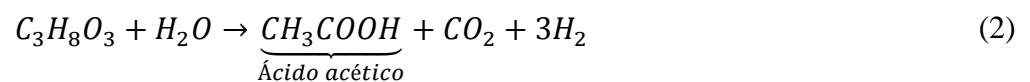


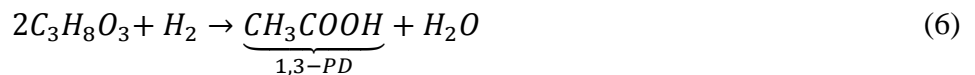
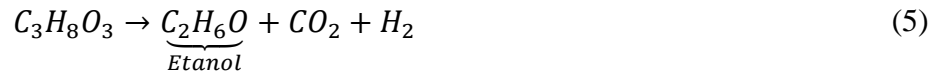
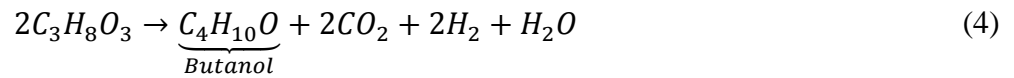
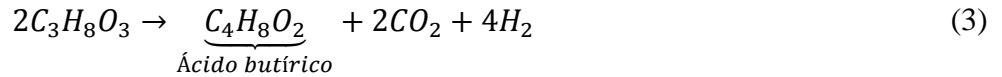
Figura 5: Representação esquemática do metabolismo do glicerol durante a fermentação anaeróbia

Fonte: adaptado de Drodzdzynska, Leja & Czaczyk (2011) e Sarma et al (2012).

Na segunda rota, o glicerol é reduzido à 3-hidroxi-propionaldeído pela enzima glicerol desidratase (dhaB), sendo posteriormente convertido por uma enzima agrupada à NADH₂ à 1,3-propanediol (1,3-PD) e excretado das células. A função fisiológica da transformação de glicerol em 1,3-PD é provavelmente devido à necessidade de oxidação das formas reduzidas equivalentes, NAD⁺, para ser utilizada em rotas produtoras de energia oriundas da degradação do glicerol (ROSSI et al, 2012).

Segundo Sarma et al (2012), o glicerol pode ser convertido em H₂ quando ocorre a formação de ácidos acético (Equação 2) e butírico (Equação 3), butanol (Equação 4) e etanol (Equação 5). Contudo, o seu rendimento depende da composição dos produtos finais. Conforme Nazareth (2015), a produção de 1,3-PD (Equação 6) consome 1 mol de H₂ e quando o ácido propiônico (Equação 7) é produzido, o H₂ não é formado.





A geração de H_2 pela fermentação é acompanhada pela formação de ácidos orgânicos. Quando os subprodutos formados são os ácidos acético e butírico, há uma alta produção de hidrogênio, o que não é visualizado quando a reação é dirigida para a formação de álcoois e 1,3-PD, que diminuem a produção de hidrogênio. Entretanto, conforme Srikanth et al (2009), a aculação de ácidos diminui o pH do sistema e inibem a produção de H_2 .

De acordo com Yu & Fang (2001), o grau de acidificação relaciona a DQO dos AGV produzidos durante a fermentação com a DQO do substrato inserido. Ainda conforme os autores, este parâmetro permite avaliar a eficiência de um reator acidogênico.

3.6 Fatores interferentes na produção de hidrogênio

A produção de H_2 via fermentação é um processo complexo, influenciado por vários fatores como inóculo, concentração de substrato, tipo de reator, temperatura, pH, nutrientes (WANG & WAN, 2009), tempo de detenção hidráulico (ARIMI et al, 2015) e celular (LEE, LI & NOIKE, 2010).

3.6.1 Inóculo

A biomassa produtora de hidrogênio pode ser pura ou mista. As culturas puras crescem em substratos definidos, para melhor examinar os fatores limitantes e efeitos de manipulações genéticas (WILLQUIST et al, 2010; ZHANG et al, 2006). Utilizando culturas

puras, os produtos de fermentação podem ser controlados pela escolha do microrganismo específico. Entretanto, se utilizadas culturas mistas, as rotas metabólicas são controladas através de parâmetros do bioprocesso (HALLENBECK, 2009).

A comunidade mista é menos suscetível às alterações ambientais devido a maior complexidade de suas atividades hidrolíticas (HALLENBECK & GOSH, 2009). Além disso, do ponto de vista da engenharia, a produção de hidrogênio por culturas mistas é a mais adequada, pois oferece baixo custo, fácil controle, e possibilidade de utilização de subprodutos orgânicos como substrato, por não necessitar de ambiente estéril (FANG et al, 2006; ROSSI et al, 2011).

A maioria dos estudos utilizando culturas puras para produção de hidrogênio por fermentação, utilizando glicerol como substrato orgânico, é operada em batelada (NGO, KIM & SIM, 2011; SAKAI & YAGISHITA, 2007; KIVISTÖ, SANTALA & KARP, 2010; BERNAL et al, 2013). Assim, é desejável a utilização de resíduos ou efluentes, domésticos e industriais, e também, se possível, operação contínua, pois se torna adequada e viável para utilização em larga escala. Cumpridos os requisitos citados, poder-se-ia aliar a minimização da problemática da geração de resíduos e efluentes com a produção de energia (HALLENBECK & GOSH, 2009; WANG & WAN, 2009).

Para garantir a produção de H_2 quando são utilizadas culturas mistas, é necessária etapa prévia de tratamento da biomassa antes da fermentação propriamente dita (LIN et al, 2012). De acordo com Lettinga et al (1996), na digestão anaeróbia, durante a formação de ácidos acético e propiônico, há grande quantidade de H_2 , causando a diminuição do pH do meio. Entretanto, o H_2 pode ser consumido pelos organismos metanogênicos, que utilizam o H_2 e CO_2 para produzir CH_4 .

No pré-tratamento da biomassa, as bactérias formadoras de esporos, como a espécie *Clostridium*, que é identificada como a principal espécie produtora de hidrogênio durante a fermentação (HUNG et al, 2007), permanece viável, já as consumidoras de hidrogênio, como as arqueas metanogênicas, são suprimidas. Estes tratamentos podem ser térmico (KAWAGOSHI et al, 2005; HAWKES et al, 2002; ANGENENT et al, 2004), ácido, alcalino ou químico (CHEONG & HANSEN, 2006; KOSKINEN et al, 2006; WANG & WAN, 2009).

Rossi et al (2011) testaram 5 métodos de pré-tratamento (ácido, base, choque térmico, calor seco e dessecação, congelamento e descongelamento) de lodo anaeróbio, proveniente de reator UASB, a fim de avaliar a sua aplicabilidade para seleção de bactérias produtoras de

hidrogênio, utilizando glicerol como substrato orgânico. Os resultados mostraram que as taxas de degradação do substrato eram maiores, em torno de 65%, nos lodos pré-tratados com calor seco e dessecação, bem como com choque térmico, comparados com a amostra controle. A percentagem máxima de H₂ no biogás foi de 34,19%, na biomassa tratada com calor seco e dessecação.

De Sá (2011) também testou os tratamentos térmico, alcalino e ácido para impulsionar a produção de H₂. Conforme a autora, o tratamento térmico foi o mais promissor para a produção de H₂, em virtude do maior rendimento obtido. Sendo assim, os resultados da autora corroboram os encontrados no trabalho citado anteriormente.

3.6.2 Concentração de substrato

Elevadas concentrações de substrato podem favorecer a eficiência de produção de hidrogênio. Entretanto, o próprio substrato ou os produtos formados podem ter efeito inibitório, quando ultrapassado o limite ideal de carga orgânica volumétrica (WANG & WAN, 2009; SIVAGURUNATHAN et al, 2016).

É comum expressar a concentração de substrato utilizada sob a forma de carga orgânica volumétrica (COV), que relaciona a quantidade matéria orgânica por unidade de volume do reator, em dado período de tempo. Os valores ótimos de COV dependem de vários fatores, como pH, tipo e concentração do substrato e do inóculo, temperatura e tipo de reator (ARIMI et al, 2015). Desta forma, não há um valor ótimo universal de COV para a produção de hidrogênio (SIVAGURUNATHAN et al, 2016).

Seifert et al (2009) verificaram que o aumento da concentração inicial de glicerol de 5 a 10 g/L (base DQO) pode acarretar duplicação da evolução de hidrogênio, de 0,345 a 0,636 L H₂/L, enquanto que numa concentração de 30 g/L a estabilização da produção é de 0,715 L H₂/L. A comparação dos resultados obtidos mostra que o aumento da concentração de glicerol acima de 30 g/L não afeta o sistema, se considerado o total de hidrogênio produzido. Como exemplo, os autores citam que o consumo de glicerol em um meio contendo 30 ou 60 g/L é o mesmo e igual a 17 g/L, o que indica que a concentração inicial de glicerol não é fator limitante para a produção de H₂.

Sarma et al (2013) testaram diferentes concentrações de glicerol bruto (2,5; 5; 10; 15 e 20 g/L), a fim de determinar o máximo potencial de produção de hidrogênio, na ausência de nutrientes, utilizando como inóculo cepa de *Enterobacter aerogenes* NRRL B-407. Os ensaios

foram realizados em pequenos reatores, operados em batelada. Como resultado, foi observado que, na maior concentração inicial de glicerol adicionada, aproximadamente 40% do glicerol não foi utilizado pelos microrganismos. A produção máxima de 2022,5 mL H₂/L foi encontrada quando utilizada a concentração de 10 g/L. Sendo assim, os autores consideraram a concentração ótima de 10 g/L de glicerol bruto em seu estudo.

Costa et al (2011) investigaram o potencial de produção de hidrogênio, em batelada, utilizando glicerol bruto como substrato e *Klebsiella pneumoniae* BLb01 como inóculo. A máxima produção, de 45% de H₂ no biogás e 98% de degradação de glicerol, foi alcançada utilizando meio nutricional otimizado, com 30 g/L glicerol, temperatura de 39°C e pH 9.

Reungsang, Sittijunda & O-Thong (2013) operaram um reator UASB, empregando como inóculo *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 imobilizado e glicerol bruto como substrato orgânico para avaliação da produção de hidrogênio. Foram testadas as cargas orgânicas de 25; 37,5; 50; 62,5 e 75 g/L.d, com TDH de 24 h. A maior porcentagem encontrada de H₂ no biogás, de 24,2%, e a maior produtividade, de 6,2 mmol H₂/L.h, foram obtidas utilizando a concentração de glicerol de 50 g/L.

3.6.3 Tempo de detenção hidráulico

O tempo de detenção hidráulico (TDH) descreve o tempo médio para uma molécula de substrato passar por todos os estágios do reator, de volume conhecido, antes de ser descarregado. Este é o período de tempo durante o qual uma unidade de substrato interage com os microrganismos presentes no bioreator para conseguir a conversão necessária. O TDH é influenciado por vários fatores, como a velocidade de reação, que depende do tipo e concentração do substrato, concentração e composição de biomassa ativa, bem como da temperatura (ARIMI et al, 2015).

O TDH é um dos principais fatores que afetam o desempenho de fermentação em operação contínua. Os menores TDH modificam o padrão da fermentação, pois inibem a ação das bactérias metanogênicas que requerem mais tempo para crescer, em comparação com as bactérias acidogênicas. Além da vantagem de maximizar a etapa acidogênica, o menor TDH também auxilia a reduzir os custos de investimento e operação. Em contrapartida, como desvantagem, se associa o menor TDH à redução da utilização do substrato pelas bactérias, fato que afeta a eficiência global do processo (MUHAMAD et al, 2011)

Gallardo et al (2014) testaram TDH de 24, 20, 12, 6 e 3 h, para avaliar a produção de 1,3-PDO em reator anaeróbio de leito de lodo granular expandido, inoculado com lodo anaeróbio de ETE, utilizando glicerol bruto como substrato orgânico. O máximo rendimento de 1,3-PDO (0,52 mol/mol) e produtividade (57 g/L.d) foram alcançados nos TDH de 12 e 3 h, respectivamente. Contudo, o H₂ foi detectado somente no TDH igual a 24 h. Os autores ressaltam que a produção de 1,3-PDO e H₂ possuem rotas competitivas.

Já no trabalho de Ferreira (2014) foi operado um reator anaeróbio de leito fluidizado, utilizando concentração fixa de glicerol bruto como fonte carbonácea de 5 g/L, temperatura de 55°C, variando o TDH entre 14 a 1 h e lodo de ETE como inóculo, para avaliação da produção de hidrogênio. Os resultados mostraram que o rendimento de hidrogênio foi semelhante entre os TDH de 14 a 2 h (1,2 e 1,4 mol H₂/mol glicerol), apresentando maior valor no TDH de 1 h, alcançando o valor de 3 mol H₂/mol glicerol. Já a produção volumétrica de H₂ aumentou com a diminuição do TDH, tendo seu valor máximo de 1508,7 mL/h.L no menor TDH aplicado.

Existe uma discordância em relação ao TDH ótimo para fermentação, inclusive para o mesmo tipo de reator. A possível causa pode ser relacionada ao inóculo e ao substrato empregados (WANG & WAN, 2009). Sendo assim, não há um consenso na literatura sobre o melhor TDH para produção de hidrogênio utilizando glicerol como substrato orgânico. A produção biológica de hidrogênio a partir de glicerol, empregando operação semi-contínua com biomassa mista ainda não foi estudada. Por isso, nos experimentos realizados no presente trabalho, optou-se por fixar o TDH de 24 h.

3.6.4 Tempo de detenção celular

Conforme Metcalf & Eddy (2014), o tempo de detenção celular (TDC), ou idade do lodo, é o período de tempo em que a biomassa permanece em um processo de tratamento de efluentes com crescimento em suspensão. Em geral, devido à complexidade de remoção da biomassa de material suporte, este parâmetro não é controlado em um sistema de crescimento aderido.

O TDC determina a eficiência de utilização do substrato, população microbiana e rotas metabólicas. Na produção de hidrogênio via fermentativa, geralmente se assume que elevados TDC acarretam crescimento de microrganismos consumidores de H₂, incluindo bactérias metanogênicas, e competidores pelo substrato, como as bactérias acidogênicas não produtoras

de H_2 (KIM, HAN & SHIN, 2008; XIONG et al, 2012; LEE et al, 2010). Mesmo sendo um parâmetro importante, há na literatura poucos trabalhos que relatam o seu controle para produção de H_2 .

No estudo de Lin & Jo (2003), em que foi utilizado reator operado em bateladas sequenciais e sacarose como substrato orgânico para a produção de hidrogênio, o controle do TDC não foi empregado. De acordo com os autores, a biomassa, presente na forma suspensa, foi removida durante a operação do sistema somente através da perda de sólidos, não decantáveis, na sedimentação. O principal parâmetro de controle foi o TDH, que variou de 4 a 12 h.

Segundo Chen (2006), os elevados TDC mantidos em reator operado em bateladas sequenciais, para manutenção de elevadas concentrações de biomassa, podem favorecer o desenvolvimento de microrganismos consumidores de hidrogênio, como as bactérias metanogênicas.

Lee, Li & Noike (2010) verificaram em seu trabalho que o rendimento de H_2 é afetado significativamente por elevados TDC. Foi avaliado um biorreator operado de forma contínua, em que foram testadas as idades de lodo de 2; 4; 12,5 e 90 d, com glicose como substrato orgânico e condição mesofílica, de $35^\circ\text{C} \pm 0.5$. O melhor rendimento de H_2 , igual a 1,19 mol H_2 /mol glicose, foi observado na idade do lodo igual a 2 d, e a maior taxa de produção, de 5,8 L H_2 /L.d, foi obtido com TDC igual a 12,5 d. Além disso, o decaimento no rendimento de H_2 observado em elevados TDC, devido à baixa relação de sólidos suspensos voláteis/sólidos suspensos totais (SSV/SST), bem como pelas elevadas concentrações de substâncias poliméricas extracelulares. Ainda conforme os autores, elevados TDC fazem com que se tenha pouco substrato disponível por concentração microbiana, favorecendo a concorrência entre os microrganismos, incluindo bactérias produtoras e não produtoras de H_2 . O emprego da idade do lodo adequada aumenta a produção de H_2 e a degradação do substrato, superando as restrições operacionais que envolvem o carreamento de células.

Trevisan (2010), empregando efluente da suinocultura como substrato, avaliou os TDC de 2,5; 1,7 e 1,4 d, com TDH de 24 h, na produção de H_2 . Como resultado, verificou-se que a maior concentração de hidrogênio e a menor concentração de metano foram obtidas quando o TDC foi de 1,4 d. Contudo, neste TDC, a remoção global de DQO e SVT foi prejudicada. Conforme a autora, a utilização do TDC elevado, de 2,5 d, propiciou o desenvolvimento de microrganismos consumidores de hidrogênio, como os metanogênicos.

3.6.5 Tipo de reator

As condições intrínsecas de cada tipo de reator utilizado interferem na formação de produtos finais de processos fermentativos. Como exemplo, pode-se citar variação de transferência de massa e de calor, que possui relação direta com o crescimento e desenvolvimento de microrganismos (REIS, 2010; NAZARETH, 2015)

A maioria dos estudos de produção de hidrogênio via fermentativa é conduzida em batelada, devido a sua simplicidade de operação e controle. Fermentação conduzida por operação em batelada tem se mostrado mais adequada para estudos iniciais de otimização de reações (HALLENBECK & GOSH, 2009). Contudo, operações em larga escala requerem outras formas de operação (WANG & WAN, 2009). Para processos industriais serem viáveis, precisam operar em modo contínuo, ou pelo menos, semi-contínuo (HALLENBECK & GOSH, 2009). Reatores de alta taxa têm sido utilizados para a produção de hidrogênio, que se diferenciam pelo crescimento e sustentação da biomassa, podendo ser de crescimento suspenso, aderido ou imobilizado (REIS, 2010), que podem ser operados de forma contínua ou semi-contínua.

Em sistemas contínuos, procura-se estabelecer um fluxo contínuo de líquido, tanto de alimentação como de saída, através do reator. Já na operação semi-contínua, a alimentação e a saída do material fermentado ocorre de forma intermitente (BORZANI, 2001).

3.6.5.1 Reatores contínuos

Processos contínuos para produção fermentativa de hidrogênio podem ser divididos em dois grupos, em função da técnica de controle da biomassa ativa nos reatores, denominados suspensos ou imobilizados. Em processos de crescimento suspenso, os microrganismos são mantidos em suspensão líquida por métodos de mistura apropriados (METCALF & EDDY, 2015). Nesta categoria, destaca-se o reator contínuo de mistura completa. Sistemas com biomassa suspensa permitem melhor transferência de massa entre os microrganismos e substrato. Entretanto, tem dificuldade em manter uma quantidade suficiente de bactérias produtoras de hidrogênio no bioreator sob elevadas vazões ou baixos tempos de detenção hidráulico, resultando no carreamento das células para fora do sistema (LIN et al, 2006).

Já no crescimento aderido, o biofilme constituído de microrganismos, material particulado e polímeros extracelulares se adere e cobre o material suporte de enchimento, que pode ser plástico, pedra ou outro material (METCALF & EDDY, 2015). A imobilização da

biomassa permite a manutenção de elevadas concentrações de células, acarretando maiores taxas de produção de H₂. Entretanto, a retenção e consequente acúmulo de biogás são os principais problemas destes sistemas (KUMAR & DAS, 2001; KIM et al, 2006).

O reator contínuo de mistura completa – *continuous stirred tank reactor* (CSTR), é bastante utilizado para produção de hidrogênio (ZHANG et al, 2007; CHEN & LIN, 2003; LEE et al, 2007; HAWKES et al, 2007; DAVILA-VAZQUEZ et al, 2009; LUO et al, 2010; SEENGENYOUNG, O-THONG, PRASERTSAN, 2014; ALGAPANI et al, 2016). Possui fácil operação e fornece bom contato entre o substrato e biomassa, através de uma mistura vigorosa (SEENGENYOUNG, O-THONG, PRASERTSAN, 2014).

Em um CSTR convencional, a biomassa é suspensa no meio líquido reacional, que é constantemente agitado, possuindo a mesma composição que o efluente (WANG & WAN, 2009). Se o TDC é igual ao TDH, ocorre o arraste de biomassa em TDH baixo. Devido à sua estrutura intrínseca, este modelo de reator é incapaz de manter altos níveis de biomassa fermentativa para a produção de hidrogênio (YU et al, 2002; ARIMI et al, 2015). Sendo assim, a utilização de células imobilizadas é uma alternativa para o CSTR convencional, pois além de permitir a manutenção de elevada concentração de biomassa, também possibilita a operação com TDH baixo sem o arraste de biomassa (WANG & WAN, 2009). Kim, Han & Shin (2008) citam que a retenção de biomassa nos reatores tornou o TDC independente do TDH, o que contribuiu para uma elevada produção de H₂ em CSTR.

Temudo et al (2008) buscaram comparar os produtos oriundos da fermentação de glicerol e glicose, utilizando dois CSTR operados em paralelo, sob as mesmas condições, utilizando cultura mista e pH 8. Os reatores foram mantidos a temperatura de $30 \pm 1^\circ\text{C}$ e alimentados com uma taxa de diluição de $0,12\text{ h}^{-1}$. Foram testadas diferentes concentrações afluente de ambos os substratos de 4, 10, 15, 20 e 24 g/L. Como resultado, foi verificado que o glicerol pode ser convertido por microrganismos, obtendo certa estabilidade em relação aos produtos finais, sem o requerimento de ambiente estéril. Os rendimentos máximos de hidrogênio encontrados foram de 0,17 e 0,05 mol H₂/mol, para glicose e glicerol, respectivamente, na menor concentração de substrato testada.

Lo et al (2013) testaram glicerol bruto para a produção de hidrogênio utilizando as cepas bacterianas *Clostridium butyricum*, *Clostridium pasteurianum* e *Klebsiella* sp., em CSTR. Entre as cepas testadas, *C. pasteurianum* mostrou a maior eficiência na produção de hidrogênio, sob as condições ótimas de temperatura de 35°C , pH 7,0 e concentração de

glicerol de 10 g/L. A taxa de produção volumétrica e o rendimento de hidrogênio foram $166,0 \pm 8,7$ mL/L.h e $0,77 \pm 0,05$ mol H₂/mol glicerol, respectivamente.

3.6.5.2 Reator semi-contínuo

O processo fermentativo recebe a denominação de semi-contínuo quando, uma vez colocados no reator o meio de fermentação e o inóculo, as operações que se seguem obedecem à seguinte ordem (BORZANI, 2001):

- Operação 1: Aguarda-se o tempo decorrido entre a alimentação e o término da fermentação;
- Operação 2: Retirada de uma fração do conteúdo do reator, mantendo-se o restante de mosto fermentado;
- Operação 3: Adição do volume de alimento ao reator igual ao que foi removido na etapa 2.

Conforme Borzani (2001), o alimento adicionado na operação 3 encontra no reator as células microbianas existentes no meio fermentado que nele foi mantido. Em outras palavras, o meio fermentado não retirado do fermentador na operação 2 serve de inóculo ao meio de fermentação adicionado na operação 3. Reinicia-se, desse modo, a sequência de operações acima descrita, que será repetida enquanto não houver queda da produtividade no processo.

Sendo assim, o processo operado sob a forma semi-contínua ocorre em sucessivos ciclos, que compreendem 3 etapas essenciais: alimentação, reação e esvaziamento. Ou seja, decorrido o tempo de reação pré-determinado, uma alíquota do líquido fermentado é retirado do reator (30 a 60%, por exemplo), que é alimentado novamente com o mesmo volume removido. Esta é uma técnica distinta, na qual está embutida a ideia da operação por choques de carga de substrato, o que pode ser interessante em determinadas situações (BORZANI, 2001). Além disso, conforme Sarma et al (2015), o processo semi-contínuo é proposto no intuito de aumentar a produção cumulativa de H₂ por volume de substrato inserido.

Nos reatores anaeróbios de bateladas sequenciais - *Anaerobic Sequencing Batch Reactor* (AnSBR), é acrescentada uma etapa adicional de sedimentação, quando utilizada biomassa suspensa, antes do esvaziamento, com o intuito de aumentar a concentração da biomassa. Sendo assim, as etapas subsequentes são alimentação, reação, decantação e esvaziamento (WU et al, 2009; LIN & JO, 2003; LAING, 2016).

De acordo com Chen (2006), em AnSBR, apenas a biomassa suspensa presente no sobrenadante, que não foi passível de sedimentação é descartada. Sendo assim, o TDC é

sempre maior do que o TDH, o que pode favorecer o desenvolvimento de microrganismos consumidores de H₂ em condições neutras.

Manssouri et al (2013) e Moncayo Bravo et al (2015) utilizaram em seus estudos reatores operados em bateladas sequenciais com biofilme para produção de hidrogênio. Como a biomassa foi aderida a um meio suporte, os autores não empregaram a etapa de decantação, prevista quando utilizado biomassa suspensa. O sistema foi denominado reator anaeróbico de bateladas sequenciais com biofilme - *Anaerobic Sequencing Batch Biofilm Reactor* (AnSBBR). Conforme Bezerra et al (2011), a utilização de um material suporte inerte em AnSBBR aumenta a retenção da biomassa e elimina a etapa de sedimentação.

Desta forma, fica claro que o conceito de bateladas sequenciais, conforme descrito na literatura, tem por objetivo a concentração de biomassa nos reatores, seja por meio da decantação ou pela adesão da mesma em meio suporte. Sendo assim, neste trabalho, se optou por utilizar o termo Reator Semi-Contínuo (RSC) para se distinguir da operação de AnSBR. Os testes foram realizados empregando alimentação e esvaziamento intermitente, como em reatores sequenciais. Contudo, foi utilizada biomassa suspensa e descarte do meio fermentado sem a etapa prévia de decantação.

Poucos trabalhos foram realizados empregando a operação original de RSC para produção de hidrogênio. Segundo Hawkes et al (2002), a forma de alimentação semi-contínua foi utilizada por apenas alguns pesquisadores em escala laboratorial e forneceram resultados não satisfatórios, porém os motivos não foram mostrados. Já Valdez-Vazquez et al (2005) encontraram rendimentos de hidrogênio considerados de moderados a elevados utilizando RSC, em comparação com sistemas em batelada, não corroborando a citação anterior. Os autores testaram fração orgânica de resíduos orgânicos domésticos, em escala laboratorial, encontrando rendimento máximo de 360 mL H₂/g STV.

Hamilton et al (2010) empregaram um biorreator de 2,3 L operado de forma semi-contínua para avaliar a taxa de diluição (h⁻¹) (quociente da relação entre vazão e volume) na produção de hidrogênio, utilizando glicose como substrato, e a cepa *Citrobacter freundii* CWBI952 como inóculo. Ótimos resultados de taxa de produção de hidrogênio foram encontrados, com valor máximo de 33,2 mL H₂/L.h, e rendimento de 0,83 mol H₂/mol glicose, quando operado de forma semi-contínua, com uma taxa de diluição de 0.012 h⁻¹.

Sarma et al (2015) tiveram como objetivo desenvolver um sistema de baixo custo para produção de hidrogênio. Como inóculo, foi utilizada cultura pura de *Enterobacter aerogenes*

NRRL B-407, e o sistema foi operado de forma semi-contínua, apenas com glicerol bruto e água, sem a inserção dos nutrientes. Estes são normalmente utilizados em estudos de produção de hidrogênio, mas segundo os autores, possuem custo elevado. Ácido e base foram utilizados para controle do pH em 6, e TDH de 120 h. Como resultados, os autores demonstraram que o glicerol bruto, diluído em água destilada, pode ser utilizado como único componente para ser utilizado em um sistema de baixo custo. Os melhores resultados encontrados foram 5,18 L H₂/L, sendo equivalente à 210 mmol H₂/L, quando utilizada a concentração de alimentação de 30 g/L.

3.6.6 pH

O pH também pode estimular os microrganismos a alcançarem a produção máxima de hidrogênio. Alguns grupos específicos de bactérias em pH específico, ajudam a manter o reator nas condições adequadas de produção de hidrogênio durante a operação. A faixa de pH ótima para bactérias metanogênicas é entre 6,0 e 7,5, enquanto que, para bactérias acetogênicas, o pH ideal é abaixo de 6,0. Assim, a faixa de pH entre 5,5 e 6,0 é ideal para evitar o crescimento de bactérias metanogênicas, conhecidas por serem consumidoras do hidrogênio produzido no sistema (MOHAN, 2008).

Na literatura são encontradas algumas divergências em relação à melhor faixa de pH, na tentativa de maximizar a produção de hidrogênio. Autores mostram que a máxima produção de biohidrogênio é alcançada em condição neutra, pH 7,0 (DAVILA-VAZQUEZ et al, 2008; LIU & SHEN, 2004; LEE et al, 2006; ROSSI et al, 2011). Lin et al (2006) atingiram relativa estabilidade por 250 dias em reatores de operação contínua com agitação, em pH 6,8, sem detecção de metano. Já Costa et al (2011) relatam que a condição ótima para produção de H₂ é em pH 9. Entretanto, outros estudos mostram máxima produção entre pH 5,0 e 6,0 (BABU, MOHAN & SARMA, 2009; VAN GINKEL & SUNG, 2001), com a vantagem de que pH moderadamente ácido pode inibir a metanogênese, última etapa da digestão anaeróbia, aumentando, assim a produção de H₂.

Fang et al (2006) testaram pH iniciais entre 4,0 e 7,0 para encontrar a melhor condição de produção de hidrogênio, em sistemas em batelada. O pH ótimo foi de 4,5, sendo o mesmo valor de pH obtido ao final de cada reação em batelada, independente do pH inicial. A acidificação do meio reacional ocorre devido à produção de ácidos orgânicos, que diminuem a capacidade tamponante do meio.

Mangayil, Karp & Santala (2012) testaram os pH 5; 6; 6,5; 7,5 e 8 e temperaturas de 25 a 46°C para avaliar a melhor condição de produção de hidrogênio, empregando glicerol como substrato orgânico e reatores operados em batelada. As condições ótimas de cultivo encontradas em pH 6,5, a 40 °C, alcançando valores máximos de $1,1 \pm 0,1$ mol H₂/mol glicerol.

3.6.7 Temperatura

As reações de fermentação podem operar em condições mesofílicas (25-40°C), termofílica (40-65°C), termofílica extrema (65-80°C), ou hipertermofílica (>80°C) (DAVILA-VAZQUEZ et al, 2008).

Valdez-Vazquez et al (2005) estudaram a produção de hidrogênio em reatores semi-contínuos, testando condições mesofílicas e termofílicas. Encontraram que a produção volumétrica de hidrogênio foi 60% maior em condição termofílica do que mesofílica. Os autores sugerem que a maior produção de hidrogênio pode ser associada à temperatura ótima da enzima hidrogenase presente em *Clostridia termofílica*.

Lee et al (2006) citam que o efeito da temperatura sobre o desempenho de fermentação de hidrogênio pode apresentar duas divergências. A elevação da temperatura auxilia no aumento das taxas de reação, tais como a atividade de produção de hidrogênio, de acordo com os princípios da cinética da reação. No entanto, algumas enzimas e proteínas essenciais associadas ao crescimento celular ou produção de hidrogênio podem ser inativadas ou desnaturadas quando a temperatura é muito elevada (ARIMI et al, 2015). Além disso, Davila Vazquez et al (2008) acrescentam que outra desvantagem da utilização do processo termofílico é o aumento dos custos de energia. Por isto, neste trabalho, os experimentos foram realizados na faixa mesofílica.

3.6.8 Nutrientes

A produção de biohidrogênio requer uma determinada quantidade de micronutrientes essenciais para o metabolismo bacteriano (LIN & LAY, 2005). Dentre todos os micronutrientes, o ferro se destaca por possuir grande importância na reação, já que a enzima hidrogenase, principal responsável pela produção de hidrogênio e presente nos organismos anaeróbios, oxida a ferredoxina reduzida para produzir hidrogênio molecular. Desta maneira, a adição externa de ferro é requerida para a produção de hidrogênio (KAPDAN & KARGI,

2006), já que limitação de ferro pode resultar em baixa atividade desta enzima (HAWKES et al, 2002).

Lin & Lay (2005) examinaram o efeito de nutrientes a níveis de concentração diferentes na produção de hidrogênio, a partir de análises de produtividade e taxa de produção de hidrogênio. Magnésio, sódio, zinco e ferro são elementos traços necessários para a síntese de vários microrganismos anaeróbios. Eles são relacionados com cofator enzimático das bactérias, processos de transporte de dehidrogenases. O estudo mostrou que o magnésio foi o metal traço que rapidamente afetou a produção de hidrogênio, a partir de sua variação nas reações. Assim, além do magnésio, os autores sugerem que o controle da concentração de ferro em suplementos nutricionais também é importante para a eficiência da produção de hidrogênio. A partir dos ensaios, as concentrações obtidas que resultaram na maior produtividade e taxa de produção de hidrogênio estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2: Formulação de nutrientes para obtenção da maior produtividade de hidrogênio e taxa de produção de hidrogênio.

Nutrientes	Concentração para maior rendimento (mg/L)	Concentração para maior produtividade (mg/L)
Cloreto de magnésio hexahidratado (MgCl₂.6H₂O)	40	40
Cloreto de cobalto hexahidratado (CoCl₂.6H₂O)	0,1	0,5
Cloreto de cálcio bihidratado (CaCl₂.2H₂O)	10	1000
Cloreto de níquel Hexahidratado (NiCl₂.6H₂O)	2,5	0,1
Cloreto de manganês hexahidratado (MnCl₂.6H₂O)	2,5	2,5
Iodeto de potássio (KI)	12,5	0,5
Cloreto de amônio (NH₄Cl)	50	50
Cloreto de sódio (NaCl)	1000	10
Cloreto de zinco (ZnCl₂)	0,1	0,5
Sulfato ferroso heptahidratado (FeSO₄.7H₂O)	1	5
Sulfato de manganês tetrahidratado (MnSO₄.4H₂O)	2,5	0,5

Sulfato de cobre pentahidratado (CuSO₄.5H₂O)	5	5
Molibdato de sódio bihidratado (Na₂MoO₄.2H₂O)	0,1	0,1

Fonte: Lin & Lay (2005).

Na Tabela 3 estão mostrados alguns trabalhos que tiveram como objetivo a produção de H₂, condições operacionais empregadas, bem como resultados encontrados.

Tabela 3: Revisão da literatura relacionada a utilização de glicerol como fonte de matéria orgânica, para produção de hidrogênio

(1) Reator anaeróbio de leito fluidizado

Autores	Inóculo	Tipo de Reator	TDH	Melhor concentração de glicerol ou COV	Maior produção de H₂	Maior rendimento molar
Moncayo Bravo et al (2015)	Lodo anaeróbio	AnSBBR	3 e 4 h	3, 4 e 5 g/L	1512 mL H ₂ /L.d	21,1 mols H ₂ /kg DQO
Mangayil, Karp & Santala (2012)	Lodo ativado	Batelada	72h	0,5, 1, 2,5, 3,5 e 5 g/L		1,1 mol H ₂ /mol
Ngo, Kim & Sim (2011)	<i>Thermotoga neapolitana</i> DSM 4359	Batelada	56 h	5 g/L		1,28 mol H ₂ /mol
Selembo et al (2009)	Mistura de solos	Batelada		3 g/L		0,31 mol H ₂ /mol
Sakai & Yagishita (2007)	<i>Enterobacter aerogenes</i>	Batelada	Até 60 h	9,9 e 14,8 g/L		0,77 mol H ₂ /mol
Seifert et al (2009)	Lodo anaeróbio	Batelada		10 g/L		0,41 mol H ₂ /mol
Kivistö, Santala & Karp (2010)	<i>Halanaerobium saccharolyticum</i>	Batelada		2.5 g/l		1,21 mol H ₂ /mol
Liu et al (2013)	Solos	Batelada		7 g/L		0,65 mol H ₂ /mol
Temudo et al (2008)	Cultura anaeróbia mista	CSTR	10 h			0,05 mol H ₂ /mol
Rodrigues (2016)	Lodo anaeróbio ETE	Batelada		20 g/L		2,21 mols H ₂ /mol
Nazareth (2015)	Lodo anaeróbio	RALF ⁽¹⁾	8 a 0,5 h	5 g/L	316,3 mL/L d.	
De Sá (2011)	Lodo anaeróbio de ETE	Batelada		10 g/L		0,80 mol H ₂ / mol
Bernal et al (2013)	<i>Clostridium</i> spp	Batelada	72 horas	50 g/L		0,19 mol H ₂ /mol
Varrone et al (2013)	Lodo ativado enriquecido	Batelada		15 g/L	2960 mL H ₂ /L.d	0,66 mol H ₂ /mol
Seifert et al (2009)	Cultura mista	CSTR	6	10 g/L		0,41 mol H ₂ /mol

3.7 Microrganismos responsáveis pela produção de Hidrogênio

As bactérias capazes de produzir hidrogênio estão presentes em ambientes naturais, como solo e lodo de processos de tratamento de efluentes (FANG et al, 2006; WANG & WAN, 2009), ou através da fermentação natural do substrato orgânico a ser utilizado (LEITE et al, 2008; PEIXOTO et al, 2011). Sendo assim, estes materiais podem ser utilizados como inóculo

Os microrganismos envolvidos na produção de hidrogênio podem ser classificados em 4 grupos: anaeróbios estritos, anaeróbios facultativos, aeróbios e fototróficos. Como exemplos, algas verdes, cianobactérias, bactérias fototróficas e fermentativas (DEMIRBAS, 2009; HALLENBECK, 2009; MAINTINGUER, HATANAKA & OLIVEIRA, 2015). Bactérias dos gêneros *Enterobacter*, *Lactobacillus*, *Clostridium* (LEVIN, PITT & LOVE, 2004; ROSSI et al, 2012), *Klebsiella* e *Citrobacter* são capazes de fermentar glicerol (ROSSI et al, 2012).

Os principais organismos envolvidos na conversão microbiológica do glicerol a 1,3-PD são *Klebsiella pneumoniae* (HOMANN et al,1990; SOLOMON et al, 1994; ROSSI et al, 2012), *Citrobacter freundii* (HOMANN et al,1990; BOENIGK, BOWIEN & GOTTSCHALK, 1993; DROŹDŹYŃSKA et al, 2014), *Clostridium butyricum* (ABBAD-ANDALOUSSI et al, 1996; FORSBERG, 1987) e *Enterobacter agglomerans* (BARBIRATO et al, 1995). Alguns dos organismos citados também são conhecidos devido à capacidade de produção de H₂.

De acordo com Solomon et al (1994) e Sakai & Yagoshita (2007), em condições anaeróbias, *Klebsiella pneumoniae* é capaz de converter glicerol. Além do 1,3-PD, também é possível obter como produtos os ácidos acético, succínico, lático e fórmico, CO₂ e H₂. Chookaew, O-Thong & Prasertsan (2014) testaram a cepa *K. pneumoniae* TR17 para avaliação da produção de H₂. Verificou-se que a mesma produz H₂ em uma faixa ampla de temperatura (30 – 50 °C), pH inicial (4,0 – 9,0) e concentração de glicerol bruto (20 – 100 g/L). As condições ótimas encontradas foram em temperatura de 40°C, pH inicial de 8,0 e concentração de glicerol de 20 g/L. A produção máxima cumulativa de H₂ foi 27,7 mmol H₂/L, e rendimento de 0,25 mol H₂/mol glicerol.

Segundo Sarma et al (2012), o microrganismo mais testado para produção de hidrogênio utilizando glicerol bruto como substrato é *Enterobacter aerogenes*. Este possui habilidade em produzir H₂ (ITO et al, 2005; SAKAI & YAGISHITA, 2007; SARMA et al, 2013). Além do H₂, este organismo também pode produzir etanol, acetato, 2,3-butanediol, 1,3-PD, lactato, e succinato, quando utilizados diversos carboidratos como substratos orgânicos. A partir do

glicerol, produz predominantemente H₂, CO₂ e etanol (RACHMAN et al 1997; SAKAI & YAGISHITA, 2007). Ito et al. (2005) investigaram a produção de hidrogênio a partir de glicerol, utilizando *E. aerogenes* HU-101 como inóculo. Foi encontrado rendimento máximo de 80 mmol/L.h.

Espécies de *Clostridium* são conhecidas pela sua habilidade em produzir ácidos orgânicos, como butírico e acético, bem como H₂ (ITO et al, 2005). Dentre essas, destacam-se as espécies *Clostridium pasteurianum*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium acetobutylicum* e *Clostridium beijerinckii*, conhecidas por serem as maiores produtoras de hidrogênio, relacionadas à maior produção de acetato e butirato. Já a espécie *Clostridium propionicum* é um produtor fraco, relacionado à maior produção de propionato em meios reacionais (LEVIN, PITT & LOVE, 2004). Bernal et al (2013) isolaram 13 cepas nativas de *Clostridium spp.* de solos da Colômbia para avaliação do potencial de produção de H₂ a partir de glicerol, na concentração de 50 g/L. Os autores verificaram que é possível a produção de H₂ utilizando cepas naturais de *Clostridium*, destacando a *Clostridium sp* IBUN 18S, que obteve a maior produção, alcançando o valor máximo de 11,59 mmol H₂/L após 18h de fermentação, utilizando reator em batelada.

Mangayil, Karp & Santala (2012) avaliaram o potencial da conversão de glicerol bruto em H₂, empregando lodo ativado em testes operados em batelada. A produção de H₂ foi associada com a fermentação via ácido acético e butírico, formando etanol como um dos produtos finais. A análise da comunidade microbiana revelou que o consórcio enriquecido é composto, predominantemente, de espécies de *Clostridium* (*Clostridium sporogenes*, *Clostridium subterminale* e *Clostridium sp.*).

Pachapur et al (2015) testaram a possibilidade de realização de uma co-cultura para produção de H₂ a partir de glicerol bruto, utilizando *Enterobacter aerogenes* NRRL B-407 e *Clostridium butyricum* NRRL B-41122. Foi verificado que a co-cultura resultou em incremento da produção de H₂, alcançando o valor máximo de 19.46 ± 0.95 mmol H₂/L. Nas monoculturas, os valores encontrados foram de 15.64 ± 0.47 mmol H₂/L, para *E. aerogenes* e 17.44 ± 0.38 mmol H₂/L para *C. butyricum*.

Métodos de análise microbianos tais como a reação em cadeia da polimerase – *Polymerase Chain Reaction* (PCR) e eletroforese em gel com gradiente de desnaturação – *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* (DGGE) têm sido utilizados para determinar a estrutura das comunidades de culturas mistas (WANG & WAN, 2009). O sequenciamento de genes do rRNA16S de bactérias e *Arqueas* extraídas diretamente das amostras tem se mostrado

como eficiente ferramenta para caracterizar uma amostra (OLIVEIRA, 2013). Desta forma, é possível determinar as espécies dominantes durante a produção de hidrogênio fermentativo (PATTRA et al, 2011). Estas análises também podem ser utilizadas para detectar mudanças na estrutura da comunidade de culturas mistas (WANG & WAN, 2009), podendo ser devida a modificações de condições operacionais (LIN et al, 2006) ou características do substrato orgânico utilizado (DÍAZ et al, 2006).

Os bioreatores e outros sistemas projetados oferecem a possibilidade de controle, em termos de estudo de processos, acompanhando ecossistemas em larga escala. No entanto, a estabilidade destes sistemas é baseada quase inteiramente em termos de processos e funções, não considerando, em muitas vezes, a comunidade microbiana (BRIONES & RASKIN, 2003). Os digestores anaeróbios são operados como “caixas-pretas”, geralmente não considerando os processos que ocorrem em nível de microrganismos. Assim, os reatores são projetados utilizando-se critérios empíricos para seu projeto, o que pode acarretar subdimensionamentos ou instabilidade operacional (O’FLAHERTY et al, 2006).

Por isso, fazem-se necessárias abordagens em engenharia de reatores para identificação dos microrganismos em fermentadores. Desta maneira é possível determinar como a diversidade comunidades microbianas contribui para a estabilidade dos processos fermentativos, principalmente relacionada à produção de H₂ (BRIONES & RASKIN, 2003).

Assim, além de otimizar o projeto do reator, é necessário o conhecimento da comunidade microbiana existente, responsável pela produção de H₂, a fim de revelar os fatores que influenciam a eficiência e a estabilidade operacional. A partir deste conhecimento, é possível o desenvolvimento de estratégias para a melhoria do desempenho (HUNG et al, 2007).

3.8 Outras considerações

Conforme mostrado pela literatura, o glicerol bruto pode conter diversas impurezas que podem acarretar a inibição de processos biológicos. Sendo assim, no presente trabalho, se optou por realizar um teste preliminar em batelada, para avaliação da produção de H₂ e ácidos graxos voláteis utilizando este substrato. Para comparação, as mesmas condições também foram testadas empregando sacarose como fonte de carbono.

Verificou-se que a temperatura, pH, TDH, TDC, concentração de substrato, nutrientes, configuração de reatores e pré-tratamento da biomassa podem interferir na produção de H_2 via fermentativa. Sendo assim, buscou-se selecionar as melhores condições encontradas, na tentativa de aprimorar a produção de H_2 . Na presente pesquisa, foram utilizadas duas diferentes configurações operacionais de fermentadores, como descrito a seguir:

- Reatores com operação semi-contínua: dois reatores agitados, empregando biomassa suspensa;
- Reatores com alimentação contínua: dois reatores agitados, empregando biomassa aderida;

Há poucos trabalhos na literatura relatando operação semi-contínua de reatores anaeróbios para a produção de H_2 . Sendo assim, como já foram realizados diversos trabalhos empregando os tipos clássicos de reatores, este trabalho tem como objetivo a avaliação de um modelo distinto para produção de hidrogênio. O regime operacional contínuo também foi avaliado, e a comparação dos resultados de ambas as condições foi realizada.

Por não haver demais trabalhos empregando o modelo operacional semi-contínuo para produção de H_2 a partir de glicerol bruto e inóculo misto, o TDH foi fixado em 24h, para ambos os modelos operacionais. Já o TDC utilizado para controle dos reatores semi-contínuos foi de 1,5 d, próximo do ideal encontrado por Trevisan (2010), de 1,4 d.

Não há um consenso na literatura em relação às ótimas concentrações de glicerol bruto para a produção de H_2 e ácidos graxos voláteis. Sendo assim, optou-se por utilizar as melhores concentrações descritas por Sarma et al (2013) e Reungsang, Sittijunda & O-Thong (2013), de 10 e 50 g/L, respectivamente.

A produção de H_2 e ácidos graxos voláteis também pode ser avaliada através da diversidade microbiana. Desta forma, foi possível relacionar as modificações na estrutura da comunidade microbiana em cada configuração proposta com os demais parâmetros de desempenho, definindo-se, assim, a melhor condição operacional.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A presente pesquisa foi realizada no Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico (LADETEC) do Instituto de Pesquisas Hidráulicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (PH/UFRGS). Foram utilizados os equipamentos e procedimentos experimentais descritos a seguir.

4.1 Equipamentos

4.1.1 Reatores em batelada

Para a realização dos testes em batelada foram utilizados frascos de reação, com agitação constante e temperatura controlada. O sistema está mostrado na Figura 6.



Figura 6: Sistema utilizado para a realização dos testes em batelada (a) Frasco de reação, manômetro e seringa para alívio de pressão e (b) caixa de acrílico para manutenção da temperatura e agitação constantes.

Fonte: a autora

Conforme Figura 6a, cada reator consistiu de frasco de reação (volume total de 500 mL e volume útil de 450 mL), manômetro, para identificação da ocorrência da produção de gás

pelo deslocamento da coluna d'água, e seringa graduada para a retirada diária do biogás produzido com conseqüente alívio da pressão no interior do manômetro. Portanto, a quantificação do volume de biogás gerado nos reatores foi realizada manualmente.

O equipamento utilizado, com capacidade para até 8 frascos de reação, consiste em uma caixa de acrílico, com termostato para manutenção de temperatura constante, e sistema de agitação, como mostrado na Figura 6b. Os reatores possuem um septo de silicone, o que permitiu a coleta de biogás gerado no decorrer do teste.

4.1.2 Reatores de mistura completa com biomassa suspensa e operados de forma semi-contínua

Para a realização deste experimento, utilizou-se dois fermentadores (New Brunswick Fermenter, BioFlo 110), cada um com volume total de 7,5 L e volume útil de 5 L, conforme a Figura 7.

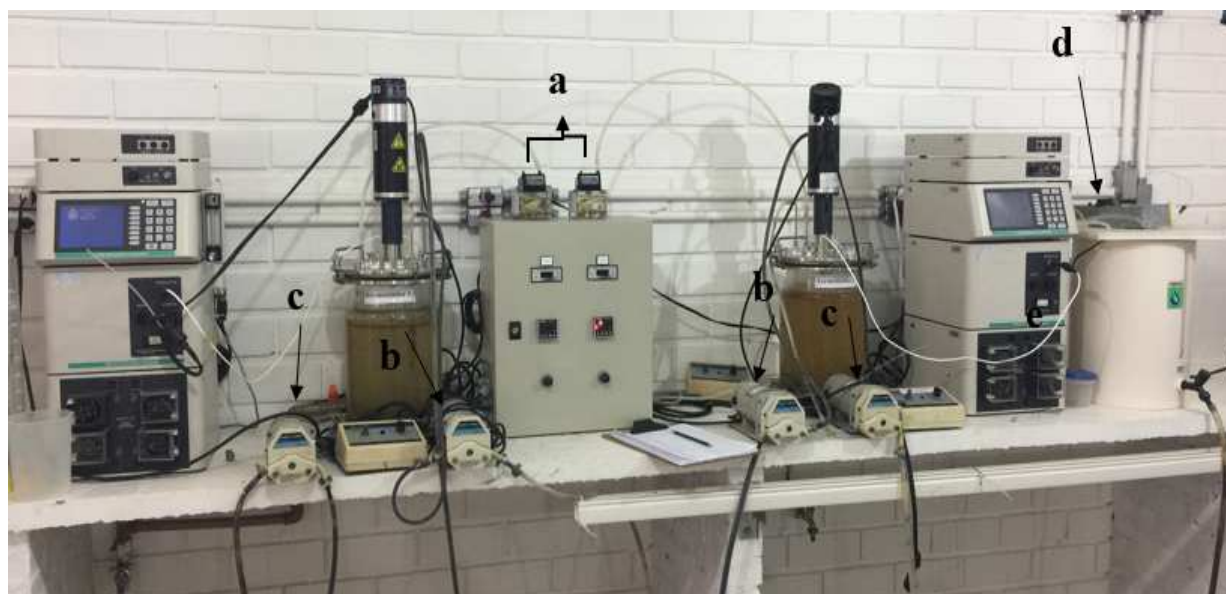


Figura 7: Fermentadores operados de forma semi-contínua. (a) Medidores de vazão de gás; (b) Bombas de alimentação; (c) Bombas de retirada de efluente; (d) Sistema de aquecimento dos reatores.

Fonte: a autora

A mistura dos reatores foi mantida constante na velocidade de 250 rpm, e a medição da vazão de gás produzido foi realizada pelos medidores de gás MilliGascounter®, da marca

Ritter, modelo MGC-1. O biogás foi coletado através do septo existente na parte superior do reator, utilizando-se uma seringa.

A inserção de alimento e retirada do efluente foi realizada através de bombas Masterflex® Easy Load modelo 7518-10. A alimentação e descarte do líquido dos reatores se deu na vazão máxima das bombas.

Para o aquecimento dos reatores e a manutenção da temperatura escolhida para trabalho, foi utilizado um barrilhete em PVC, com volume de 20 L. Dentro do mesmo, foram inseridos uma serpentina para aquecimento da água, um dispositivo automático para controle da temperatura e uma bomba de recirculação. O barrilhete foi completamente preenchido com água e a serpentina foi acionada até alcançar a faixa de temperatura escolhida. A água foi encaminhada para as camisas de aquecimento dos reatores, sendo recirculada para manutenção da temperatura.

4.1.3 Reatores agitados, com biomassa aderida e operados em sistema de alimentação contínua

Para execução deste experimento, utilizou-se dois reatores de aço inox, cada um com volume total de 28,3 L e volume útil de 20,0 L, conforme Figura 8. Além dos reatores, também é possível observar na Figura abaixo os acessórios utilizados para realização do experimento, como tanques de estocagem de substrato, medidores de vazão de gás, bombas dosadoras para inserção de alimento e sistema de agitação mecanizado.

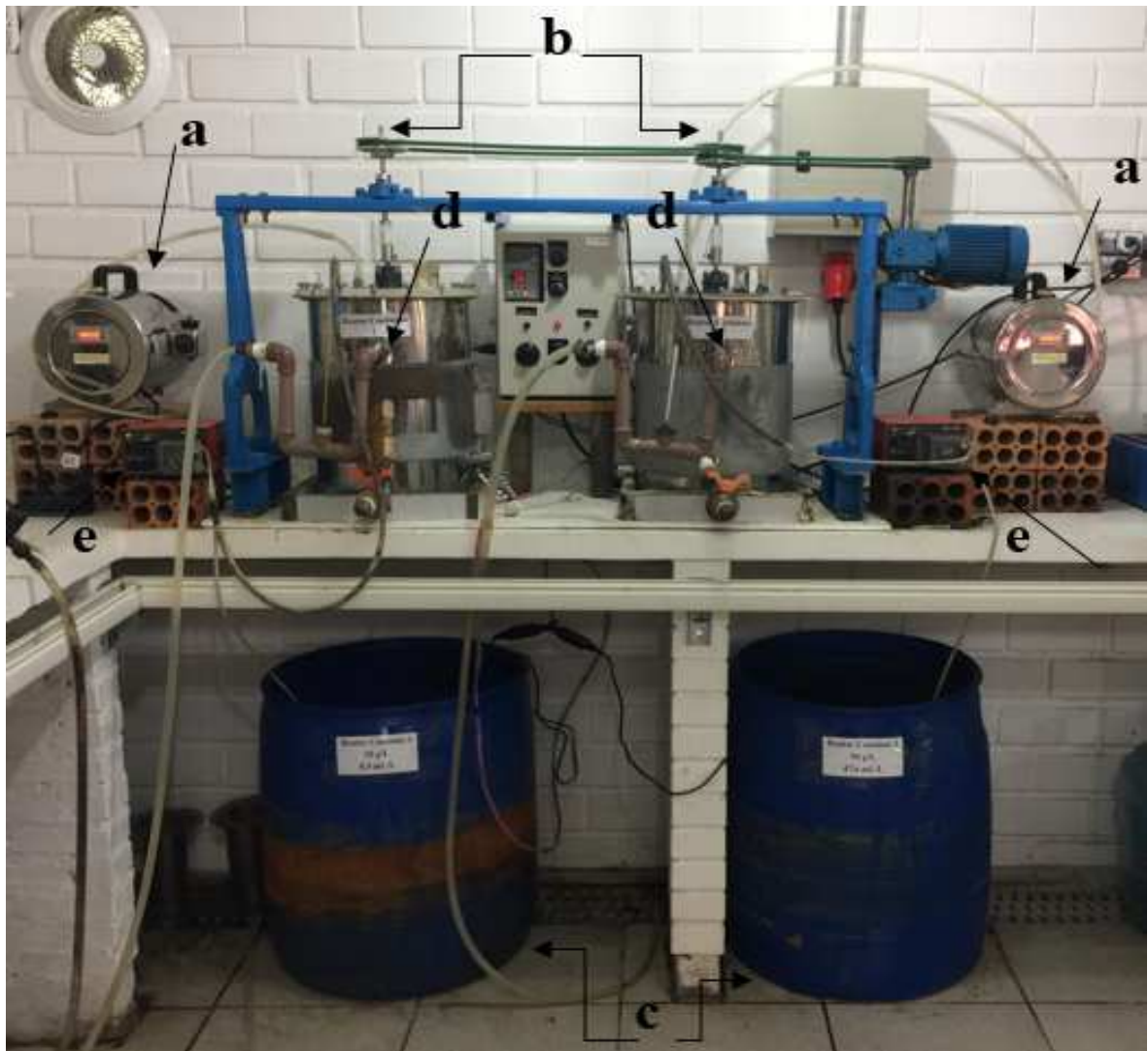


Figura 8: Fermentadores em paralelo operados de forma contínua. (a) Medidores de vazão de gás; (b) Sistema de mistura mecanizada; (c) Tanques para alimentação; (d) Ponto de retirada do efluente; (e) Bombas dosadoras para alimentação dos reatores.

Fonte: a autora

A agitação dos reatores foi mantida constante na velocidade de 250 rpm. A medição da vazão de gás produzido foi realizada pelo medidor de gases Hemon® HM 02.

Para a operação do sistema contínuo, empregou-se biomassa aderida. Os detalhes internos dos reatores podem ser visualizados na Figura 9.

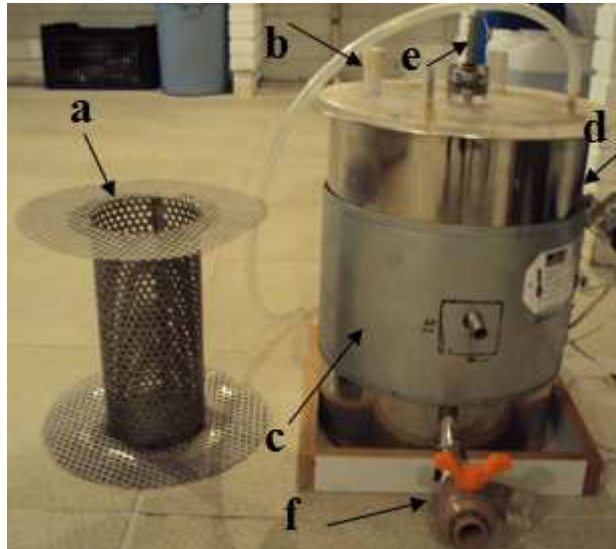


Figura 9: Reator utilizado nos testes com alimentação contínua. (a) Cesto metálico; (b) Septo para coleta do biogás, (c) Cinta de aquecimento, (d) Orifício para extravasamento natural do efluente, (e) Eixo central de agitação e (f) Válvula para esvaziamento e limpeza do reator.

Fonte: a autora

A temperatura foi mantida através da utilização de cintas de aquecimento, conforme Figura 9(c), e dispositivo de controle automático. A cinta era acionada até atingir a temperatura escolhida para trabalho, sendo posteriormente desligada.

Foi utilizado um cesto metálico interno, como pode ser visualizado na Figura 9(a), para a separação física do meio suporte e do eixo de agitação. Desta forma, evitou-se o contato do sistema de mistura mecânica com o material suporte, para evitar desprendimento dos microrganismos aderidos.

O biogás foi coletado no septo existente na parte superior do reator, utilizando-se uma seringa.

4.2 Procedimento experimental

4.2.1 Temperatura e pH inicial

A temperatura de todos os testes foi mantida na faixa mesofílica, em $35 \pm 2^\circ\text{C}$.

O pH inicial foi mantido em torno de 5,5-6,0, de acordo com Mohan (2008), para evitar o crescimento de bactérias metanogênicas. Não foi realizado o ajuste de pH durante a fermentação, em todas os experimentos realizados, conforme Lo et al (2013).

4.2.2 Água residuária

O glicerol empregado nos experimentos deste trabalho foi oriundo da indústria de biodiesel Oleoplan S/A, localizada no município de Veranópolis.

A sacarose utilizada nos experimentos em batelada foi o açúcar cristal (comercial).

Nos testes em batelada, foram testadas as concentrações de 1,5; 3; 4,5 e 6 g/L, de ambos os substratos. Já na operação dos sistemas semi-contínuos e contínuos, foram utilizados apenas glicerol nas concentrações de 10 e 50 g/L, conforme melhores resultados encontrados nos trabalhos de Sarma et al (2013) e Reungsand, Sittijunda & O-Thong (2013).

4.2.3 Tempo de detenção hidráulico

O TDH nos ensaios em batelada, realizados nos testes em batelada, variou de 10 a 25 h, em função do tempo requerido para consumo do substrato pela biomassa empregada.

Já nos experimentos empregando os reatores semi-contínuos e contínuos, o TDH foi fixado em 1 d. Nos reatores semi-contínuos, considerou-se o TDH o tempo transcorrido entre cada alimentação.

4.2.4 Tempo de detenção celular

Este parâmetro foi controlado somente nos reatores semi-contínuos. Foi definido o TDC de 1,5 d, valor próximo do ideal proposto no trabalho de Trevisan (2010), igual a 1,4 d. De acordo com Metcalf & Eddy (2015), a vazão de descarte pode ser calculada conforme Equação 8.

$$Q_{descarte} = \frac{V}{TDC} \quad (8)$$

Em que:

V: volume do reator

Q_{descarte} : vazão de descarte.

Desta forma, foi estabelecida a remoção de 3,3 L do meio reacional dos reatores semi-contínuos (66%). Os 1,7 L (34%) restantes do conteúdo do reator foram mantidos para garantir a inoculação.

4.2.5 Inóculo, material suporte e procedimento de imobilização

Nos testes em batelada, foram testadas as inoculações natural e direta. A inoculação natural foi realizada conforme descrito por Leite et al (2008) e Peixoto et al (2011), para cada substrato orgânico utilizado, em dois recipientes distintos. Foram utilizados dois recipientes de 10 L, e em um foi acrescentado sacarose e no outro glicerol, ambos com concentração de 10 g/L, sem a adição de nutrientes. Os recipientes foram colocados em banho termostatizado a 30°C e mantidos em repouso durante sete dias, favorecendo a fermentação natural.

A inoculação direta, por sua vez, baseou-se na utilização de biomassa proveniente de lodo granular de reator UASB de estação de tratamento de efluentes de empresa de processamento de soja. Antes de ser utilizado nos experimentos, os microrganismos foram submetidos à etapa de tratamento térmico, descrita por Rossi et al (2011). O lodo foi aquecido a 100°C durante 15 min em chapa aquecedora e a temperatura foi verificada utilizando-se termômetro.

Nas operações semi-contínua e contínua foram empregadas a inoculação direta, com a biomassa suspensa e aderida em anéis *Pall*, respectivamente.

O material suporte utilizado para imobilização da biomassa na etapa 3, de operação contínua, foram anéis *Pall* de polipropileno. Cada unidade possui dimensões de 1,5 cm x 1,5 cm e índice de vazios de 95% (Figura 10).



Figura 6: Anéis *Pall* utilizados na etapa 3

Fonte: a autora

A inoculação dos anéis foi realizada conforme metodologia adaptada descrita por Zaiat et al (1994), Flores (2009) e El Manssouri (2012). Os anéis foram imersos por 2 h em 2 L de inóculo previamente tratado. O excedente de lodo foi retirado e o material suporte com biomassa foi introduzido no reator dentro do cesto metálico, descrito no item 4.2.3.

4.2.6 Meio Nutricional

O meio nutricional utilizado foi baseado em estudos realizados por Lin & Lay (2005). A composição de cada nutriente está descrita na Tabela 4.

Tabela 4: Formulação nutricional para produção de hidrogênio via fermentativa.

Nutrientes (mg/L)	
MgCl₂.6H₂O	40
CoCl₂.6H₂O	0,5
CaCl₂.2H₂O	1000
NiCl₂.6H₂O	0,1
MnCl₂.6H₂O	2,5
KI	0,5
NH₄Cl	50
NaCl	10
ZnCl₂	0,5
FeSO₄.7H₂O	5
MnSO₄.4H₂O	0,5
CuSO₄.5H₂O	5
Na₂MoO₄.2H₂O	0,1

Fonte: Lin & Lay (2005).

Além dos nutrientes descritos na tabela acima, foi acrescentada fonte de fósforo, fosfato dipotássio (K_2HPO_4) na concentração de 125 mg/L, conforme descrito pelos mesmos autores.

Em todas as etapas foi utilizada a solução nutricional descrita acima.

4.2.7 Análises para monitoramento dos reatores

A periodicidade das amostragens e realização das análises nas 3 etapas experimentais podem ser visualizadas na Tabela 5.

Tabela 5: Periodicidade das amostragens realizadas nos experimentos propostos.

Análise	Etapa 1 Reatores em batelada	Etapa 2 Reatores semi-contínuos	Etapa 3 Reatores contínuos
<i>Cromatografia gasosa</i>	intervalos de 2h	diariamente	diariamente
<i>Medição vazão do biogás</i>	intervalos de 5-30 min	diariamente	diariamente
<i>Sólidos totais voláteis</i>	ao final do teste	semanalmente	Semanalmente
<i>Sólidos totais voláteis do material suporte</i>	-	-	ao início e ao final do teste
<i>DQO</i>	ao início e ao final do teste	3 vezes por semana	3 vezes por semana
<i>Glicerol residual</i>	ao final do teste	3 vezes por semana	3 vezes por semana
<i>Sacarose residual</i>	ao final do teste	-	-
<i>pH</i>	ao início e ao final do teste	3 vezes por semana	3 vezes por semana
<i>Coleta para análise da diversidade microbiana</i>	-	quinzenalmente	quinzenalmente
<i>AGV</i>	ao final do teste	3 vezes por semana	3 vezes por semana

Fonte: a autora

4.2.7.1 Análise da qualidade do biogás produzido

A qualidade do biogás gerado foi verificada utilizando-se cromatógrafo gasoso Dani GC 1000 com detector de condutividade térmica (TCD) e coluna Molecular Sieve 80/100. As condições cromatográficas descritas por Morimoto et al (2004) são: temperatura do injetor 50°C; temperatura do detector 50°C; temperatura da coluna 40°C; gás Hélio para arraste, com fluxo de 25 mL/min e amostra injetada com volume de 1 mL.

4.2.7.2 Análise dos Ácidos Graxos Voláteis

A análise das concentrações dos ácidos graxos voláteis foi realizada por cromatografia gasosa, utilizando cromatógrafo gasoso Dani GC 1000, com detector de ionização de chama (FID) e coluna capilar Nukol™ Supelco® (30m × 0.25mm × 0.25µm). O método empregado foi adaptado de Cuetos et al (2010): temperatura de injetor e detector de 220°C e 250°C, respectivamente. A temperatura do forno foi de 60 a 180°C, empregando duas rampas: 60°C até 170°C, a 10°C/min; 170°C a 180°C, a 50°C/min.

O gás de arraste utilizado foi hélio, com fluxo de 1mL/min e o volume da amostra injetada de 1µL. As amostras submetidas à cromatografia foram filtradas em filtro de fibra de vidro, de porosidade 0,45µm, e armazenadas sob refrigeração, utilizando-se ácido fórmico para preservação.

4.2.7.3 Análises físicas e químicas

A fim de caracterizar o afluente e efluente dos fermentadores, foram realizadas as seguintes análises físicas e químicas, tanto do afluente como do efluente dos reatores: demanda química de oxigênio (DQO), pH e sólidos voláteis totais (SVT).

As análises descritas acima foram realizadas de acordo com o *Standard Methods for the Examination of Wastewater* (APHA, 2012), conforme metodologias descritas na Tabela 6.

Tabela 6: Metodologias empregadas para a realização das análises físicas e químicas.

Parâmetro	Método conforme APHA (2012)
SVT	Método gravimétrico 2540-E
DQO	Método titulométrico de refluxo fechado 5220 C
pH	Método eletrométrico 4500-H ⁺ B

Fonte: a autora

Para a caracterização inicial do glicerol, além da análise de DQO, também foi realizado o teor de cinzas, conforme descrito por Lopes et al (2014), e a proporção de glicerol. A primeira análise é baseada na calcinação da amostra, à 550°C, e determinação do índice por gravimetria. Já a segunda foi gentilmente realizada no Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA/UFRGS), utilizando cromatógrafo HPLC Shimadzu (Shimadzu Corp.,

Japan), com detector *refractive index* RID-10A. As fases estacionária e móvel foram coluna Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm) (Bio-Rad, USA) e solução 0,005 mol/L H₂SO₄ a 0,8 mL/min, respectivamente. A temperatura da coluna foi controlada à 65°C.

Nos reatores contínuos (etapa 3) foi realizada a análise de SVT do líquido reacional, semanalmente, e do meio suporte, no início e ao final do experimento, para acompanhamento do desenvolvimento da biomassa. No início foi utilizado material suporte logo após a inoculação. No fim, primeiro drenou-se o líquido do reator para que 1,0 L deste material fosse coletado. As amostras do início e do fim foram submetidas à lavagem, utilizando água deionizada, seguidas de agitação manual vigorosa em tubo falcon para desprendimento da biomassa. Esta mistura (água deionizada e biomassa) foi encaminhada às etapas subsequentes da análise de SVT, conforme metodologia já descrita.

Já as análises de glicerol e sacarose residual foram baseadas nas metodologias descritas por Englis & Wollerman (1952) e Dubois et al (1956), adaptada por Chow & Landhäuser (2004), respectivamente.

As amostras submetidas a todos os ensaios descritos foram filtradas em filtro de fibra de vidro, de porosidade 0,45 µm, e imediatamente processadas.

4.2.7.4 Análise de glicerol residual

A técnica é baseada na detecção da modificação da cor, causada pela oxidação de compostos de cromo (dicromato de potássio – K₂Cr₂O₇), devido à presença de glicerol, por método espectrofotométrico (ENGLIS & WOLLERMAN, 1952).

Em um frasco com tampa, foi acrescentado 3,2 mL da amostra, 12 mL de solução de K₂Cr₂O₇ e 10 mL de ácido sulfúrico concentrado (H₂SO₄). Depois de tampar, o recipiente foi encaminhado ao banho-maria, com água fervente por 20 min. Transcorrido o tempo, retirou-se o frasco do banho e deixou-se esfriar até alcançar temperatura ambiente.

Após, o líquido foi transferido para um balão volumétrico e avolumado a 100 mL. A leitura em espectrofotômetro foi realizada em comprimento de onda de 587 nm. Neste trabalho, foi utilizado Espectrofotômetro UV/VIS UV-1600 Pró-Tools.

4.2.7.5 Análise de sacarose residual

De acordo com Dubois et al (1956), a presença de açúcares acarreta coloração alaranjada ou amarelada em fenol e H₂SO₄ concentrado. Sendo assim, o método fenol-ácido sulfúrico é utilizado para determinar a concentração de açúcares presentes em amostras.

O método empregado é de Dubois et al (1956) adaptado por Chow & Landhäuser (2004). Em frasco com tampa, foi inserido 0,5 mL de amostra e 1 mL de solução fenol 2%. O H₂SO₄ concentrado, no volume de 2,5 mL, foi rapidamente inserido para promover a coloração. O frasco foi encaminhado ao banho-maria a 30°C por 30 min.

A leitura em espectrofotômetro foi realizada no comprimento de onda de 490 nm, utilizando o mesmo equipamento de espectrofotometria descrito no item anterior.

4.2.8 Avaliação da diversidade microbiana

A verificação dos organismos dominantes foi realizada nas etapas 2 e 3, para que uma análise comparativa fosse realizada. As amostras coletadas para esta finalidade foram colocadas em frascos falcon de 50 mL, previamente esterilizados em autoclave. Na etapa 2, foi coletada uma parcela do líquido removido dos reatores e na etapa 3, líquido e anéis, estes últimos sendo removidos nas etapas subsequentes de processamento. Após a coleta, os tubos foram colocados em freezer a -20°C.

De todas as amostras disponíveis que foram coletadas quinzenalmente nos reatores semi-contínuos, optou-se por sequenciar duas de cada reator: uma com a melhor e outra com o pior resultado na produção de H₂, tanto pelo volume produzido, como pela porcentagem encontrada no biogás. Sendo assim, deste modo operacional foram sequenciadas 4 amostras, 2 correspondentes ao RSC1 e 2 ao RSC2. Já nos contínuos, apenas 2 amostras foram sequenciadas para análise, uma do RC1 outra do RC2.

A avaliação da diversidade microbiana presente nos reatores foi realizada em parceria com o Laboratório de Genética do Centro Universitário UNIVATES e o Centro de Excelência em Pesquisa e Inovação em Petróleo, Recursos Minerais e Armazenamento de Carbono (CEPAC), localizado na Pontifícia Universidade Católica (PUC), em Porto Alegre.

4.2.8.1 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada conforme metodologia descrita por Krsek e Wellington (1999), com as modificações propostas por Soares et al (2006), que recomenda a limpeza do DNA com sucessivas lavagens com fenol e clorofórmio.

O líquido contido nos tubos falcon foi transferido a eppendorf de 3 mL, para centrifugação a 10.000 rpm por 10 min. O processo foi repetido (10 vezes) para obtenção de considerável quantidade de pellet.

O pellet obtido foi ressuspensionado em 8 mL de solução de Crombach, sendo adicionado 0,1 g de lisozima. Esta mistura foi incubada por 37°C por 3 h, e decorrido este período, foi adicionado 1650 µL de acetato de potássio 8M (CH₃COOK) e incubado a temperatura ambiente por 10 min.

Após, a mistura foi centrifugada a 10000 rpm por 20 min, e o sobrenadante foi coletado, e adicionado 4950 µL de solução PEG 50% NaCl 1 M, sendo incubado no gelo por 1 h. Após, foi novamente centrifugado a 10.000 rpm por 20 min, e o sobrenadante foi descartado.

O pellet foi ressuspensionado em 750 µL de TE2 e transferido para microtubo de 1,5 mL, em que foi adicionado 1 volume de fenol:clorofórmio e agitado vigorosamente. O líquido foi centrifugado a 5000 rpm por 5 min, sendo posteriormente retirada a fase aquosa, transferido para outro microtubo estéril. Estas duas últimas etapas foram repetidas 2 vezes, utilizando clorofórmio.

O DNA foi precipitado com 0,6 volume de isopropanol gelado, e mantido no freezer *over night*. Transcorrido o tempo requerido, centrifugou-se a 12000 rpm por 20 min e o sobrenadante foi descartado.

O pellet foi lavado com 500 µL de etanol 70% e centrifugado a 12000 rpm por 5 min. Após, o etanol foi descartado e o pellet foi seco por 1 h a 35°C, que foi posteriormente ressuspensionado em 30 µL de TE2. A fim de avaliar a eficiência da extração de DNA, 2 µL da solução foi verificada em gel de agarose 0,8%

4.2.8.2 Reação em cadeia da polimerase

Para caracterizar as comunidades microbianas presente nas amostras, fragmentos do gene ribossomal 16S foram amplificados utilizando os oligonucleotídeos iniciadores F515 (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') e R806 (5'-GGACTACVSGGGTATCTAAT-3'), conforme metodologia descrita por Bates et al (2011).

O PCR foi realizado em reações de 25µL, cada qual contendo 2 µL (concentração de 15µM) dos oligonucleotídeos iniciadores, 10 µL de *5Prime Hot MasterMix* (Eppendorf-5Prime Inc.) e 1µL de DNA de comunidade genômica como molde. Os parâmetros dos 35 ciclos subsequentes foram 95°C por 30 s, 50°C por 1 min, 72°C por 1 min, depois de uma desnaturação inicial de 95°C por 3 min.

4.2.8.3 Sequenciamento

Os fragmentos gerados por PCR foram submetidos ao sequenciamento de alto desempenho utilizando-se um sequenciador PGM *Ion Torrent* (Life Technologies). A construção das bibliotecas foi realizada com o *kit Ion Plus Fragment Library*, utilizado para amplicons curtos (≤ 350 pb), a partir de uma quantidade de 100 ng de produto de PCR de cada amplificação. O sequenciamento foi realizado em um chip 316, utilizando-se o *kit Ion PGM Sequencing 200 v2*, seguindo as recomendações do fabricante.

Para a comparação global de diferenças significativas entre as comunidades avaliadas, as sequências foram agrupadas em unidades taxonômicas operacionais (OTUs), utilizando o programa UPARSE (EDGAR, 2013). As sequências representativas (a mais longa sequência de cada grupo com similaridade superior a 95%) foram selecionadas e editadas manualmente utilizando o programa Mega 5.1 (KUMAR, TAMURA & NEI, 2004). O mesmo programa também foi empregado para obtenção de sequências referências no GenBank, e as análises filogenéticas serão realizadas utilizando uma abordagem baseada em distância, utilizando o programa Mega 5.1, e também análises de inferência Bayesiana, pelo programa BEAST 1.7.5 (DRUMMOND & RAMBAUT, 2007).

A classificação taxonômica das sequências obtidas foi avaliada por diferentes ferramentas de bioinformática. Após eliminar sequências curtas e de má qualidade com auxílio do software *Prinseq* (SCHMIEDER & EDWARDS, 2011), os metagenomas foram analisados na ferramenta MG-RAST (MEYER et al, 2008), em que foi possível classificar taxonomicamente a comunidade. Os níveis de identidade das sequências geradas em relação aos bancos de dados foram de 80% para os níveis de domínio e filo, 90% para o nível de classe, ordem e família, 95% para gênero e 99% para espécies (HONG et al, 2006).

4.2.8.4 Análise dos resultados de diversidade microbiana

Os resultados foram submetidos ao teste SIMPER, realizado para os 4 diferentes níveis taxonômicos (filó, classe, família e gênero) que determinou as famílias que mais contribuíram na variabilidade genética das amostras.

Após o teste SIMPER, realizou-se o Agrupamento Hierárquico, que permitiu avaliar a variabilidade genética entre as amostras. Os resultados também foram relacionados com os parâmetros AGV (ácidos acético, propiônico e butírico), produção de biogás e H₂ na Análise de Correlação Canônica (CCA), realizado no programa Past3.

4.2.9 Fundamentos teóricos

Neste item são apresentadas as fórmulas utilizadas para avaliação do desempenho dos reatores utilizados nos experimentos realizados nas 3 etapas propostas, conforme Li & Fang (2007), Flores (2009), El Manssouri (2012).

4.2.9.1 Eficiência de conversão de substrato

A eficiência de remoção de substrato afluente e efluente, sob a forma glicerol e sacarose residual, bem como remoção de DQO, permite a determinação do quanto do substrato inicial foi convertido a outros subprodutos. A mesma é calculada conforme a Equação 9.

$$Eficiência(\%) = \frac{Substrato_{afluente} - Substrato_{efluente}}{Substrato_{afluente}} \cdot 100 \quad (9)$$

4.2.9.2 Carga orgânica volumétrica

A carga orgânica volumétrica (COV) é a carga de matéria orgânica, calculada pelo produto da DQO_{afluente} e a vazão (Q), pelo volume do útil (V) do reator (gDQO/L.d ou gDQO/L.h), podendo ser calculada utilizando a Equação 10.

$$COV = \frac{DQO_{afluente} \cdot Q}{V} \quad (10)$$

4.2.9.3 Rendimento

O rendimento molar é a relação do número de mols de H₂ produzidos pelo número de mols de substrato removido (mol H₂/mol substrato_{removido}). Este cálculo permite determinar o quanto do substrato inserido foi convertido a H₂, na forma de mol, conforme descrito na Equação 11.

$$Rendimento\ molar = \frac{mol\ H_2\ produzidos}{mol\ substrato_{removido}} \quad (11)$$

4.2.9.4 Produtividade

A produtividade volumétrica de H₂ por massa de matéria orgânica removida (Equação 12) relaciona o volume de H₂ (V_{H₂}) pela massa de matéria orgânica removida, em um dado período do tempo (mL H₂/gDQO_{remov}.d ou mL H₂/gDQO_{remov}.h), em que V representa o volume do reator. A partir de sua determinação, pode-se estimar o volume de H₂ produzido pela quantidade de substrato removido, na forma de DQO, em um dado volume de reator.

$$\text{Produtividade volumétrica de H}_2 \text{ por massa de DQO}_{\text{removida}} = \frac{V_{H_2}}{DQO_{\text{remov}} \cdot V} \quad (12)$$

A produtividade volumétrica é o volume de H₂ produzido por volume de reator em um dado período de tempo (t), expresso em mL H₂/L.d ou mL H₂/L.h, mostrada na Equação 13. A produtividade volumétrica relaciona o volume de H₂ produzido em um dado tempo de reação, conforme o volume do reator.

$$\text{Produtividade volumétrica} = \frac{V_{H_2}}{V \cdot t} \quad (13)$$

A produtividade molar específica é o quociente do número de mols de H₂ produzidos pela biomassa do reator, medida sob a forma de SVT, em um dado período (mol H₂/g SVT.h ou mol H₂/gSVT.d), de acordo com a Equação 14. A partir do seu cálculo, determina-se a produção de H₂, em mol, pela biomassa existente no reator, em relação ao tempo de reação.

$$\text{Produtividade molar específica} = \frac{n_{H_2}}{\left(\frac{g \text{ SVT}}{L} \cdot V\right) \cdot t} \quad (14)$$

A produtividade volumétrica específica é a relação entre o volume de H₂ produzidos pela massa de SVT, em um dado período (mL H₂/g SVT.h ou mL H₂/g SVT.d), como mostra a Equação 15. Bem como no item anterior, a produtividade volumétrica específica também relaciona a atividade da biomassa na produção de H₂, esta determinada em volume.

$$\text{Produtividade volumétrica específica} = \frac{V_{H_2}}{\left(\frac{g \text{ SVT}}{L} \cdot V\right) \cdot t} \quad (15)$$

4.2.9.5 Grau de Acidificação

De acordo com Bengtsson et al (2008), o grau de acidificação (GA) relaciona o quanto do substrato inicial inserido foi convertido em AGV. Sob a forma g DQO/g DQO, o mesmo é calculado convertendo individualmente cada AGV a unidades de DQO, obtendo-se a DQO de AGV (DQO_{AGV}). Destes, é feito um somatório, que é dividido pela DQO afluente, conforme Equação 16.

$$GA = \frac{\sum DQO_{AGV}}{DQO_{afluente}} \quad (16)$$

Os cálculos dos indicadores de desempenho dos reatores, bem como elaboração dos gráficos de *Boxplot*, e demais dados estatísticos foram realizados utilizando-se o programa Excel®.

Os parâmetros de avaliação de desempenho calculados no presente trabalho foram escolhidos de acordo com os apresentados nas referências bibliográficas, em cada condição metodológica proposta. Foi considerada a disponibilidade e a quantidade de dados apresentados na literatura, para que a posterior comparação fosse possível de ser realizada. Contudo, alguns valores mostrados pela literatura foram convertidos, para que os mesmos fossem confrontados com os resultados encontrados.

4.2.10 Descrição dos experimentos

As unidades experimentais utilizadas foram divididas em 3 etapas, como mostra a Figura 11. A etapa 1 consistiu na realização de testes empregando reatores de mistura completa e de biomassa suspensa operados em batelada. Na etapa 2 foram operados os reatores semi-contínuos, com mistura completa com biomassa suspensa, e na etapa 3 os reatores contínuos, com mistura completa e biomassa aderida.

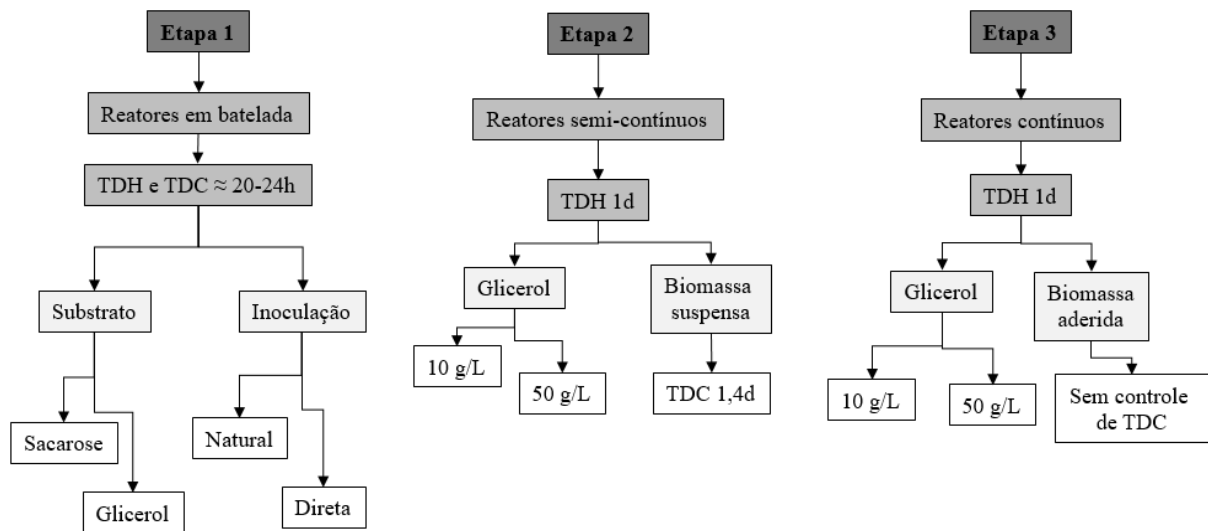


Figura 11: Experimentos realizados no presente trabalho.

Fonte: a autora

4.2.10.1 Etapa 1: Reatores em batelada

Nos experimentos referentes à Etapa 1, foram testados a sacarose e o glicerol como substratos orgânicos, e inoculação natural e direta, TDC e TDH entre 20 a 24h. Como o objetivo do teste foi a verificação da possibilidade de utilização do glicerol como substrato orgânico, e comparar os resultados obtidos com sacarose, fez-se apenas um teste para cada condição proposta.

A montagem dos experimentos da etapa 1 se deu através da inserção de biomassa, substrato e meio nutricional em cada frasco de reação, conforme proporções pré-determinadas. As concentrações de inóculo empregadas, direto e natural, foram medidas sob a forma de SVT, de 1; 2 e 3 g/L. Já as concentrações de substrato foram 1,5; 3,0; 4,5 e 6,0 g/L (base DQO). A partir da combinação entre biomassa e matéria orgânica, 10 relações de alimento e microrganismos (A/M) foram avaliadas: 0,5; 0,75; 1,0; 1,125; 1,5; 2,0; 2,25; 3,0; 4,5 e 6,0; forma sob a qual os resultados foram expressos, conforme a Tabela 7.

Tabela 7: Relações A/M obtidas a partir das concentrações de substrato e inóculo utilizados.

		Relações A/M		
		SVT (g/L)		
		1	2	3
DQO (g/L)	1,5	1,5	0,75	0,5
	3	3	1,5	1
	4,5	4,5	2,25	1,5
	6	6	3	2

Fonte: a autora

A primeira coleta do gás para análise do teor de H_2 foi realizada decorridas 2 horas do início de cada teste, sendo obedecido o mesmo intervalo de tempo para o monitoramento subsequente. O término do experimento se deu quando foi verificada a diminuição no volume de biogás produzido.

4.2.10.2 Etapa 2: Reatores semi-contínuos

Para operação dos reatores semi-contínuos, denominados RSC1 e RSC2, foram mantidas as mesmas características operacionais relacionadas ao inóculo, manutenção da biomassa suspensa, TDH, TDC, pH e temperatura. A variação entre os mesmos se deu pela concentração de glicerol adicionada, de 10 e 50 g/L, em RSC1 e RSC2, respectivamente.

A operação semi-contínua seguiu a seguinte ordem, como descrito por Borzani (2001):

- 1) O TDH de operação dos reatores foi de 1 d. Após este período, foi removido o volume de 3,3 L, com agitação acionada;
- 2) Inserção de alimento, composto de glicerol e meio nutricional, no mesmo volume removido;
- 3) Fermentação, obedecendo o TDH pré-estabelecido (1 d).

No início da operação, os fermentadores foram inoculados a partir da inserção da biomassa pré-tratada (item 4.3.5). Transcorrido o TDH de 1 d, a mangueira do medidor de vazão era desconectada, e 3,3 L do meio fermentado era removido, sem desligar o sistema de agitação, através das bombas coetadas aos fermentadores. Foram mantidos 1,7 L de meio fermentado, e desta forma, foi possível manter o TDC proposto de 1,5 d. Em seguida, 3,3 L da

mistura de meio nutricional e glicerol, na concentração pré-definida, foi inserida no reator, também utilizando as bombas já descritas, acoplando-se novamente o medidor de vazão.

A alimentação e descarte do líquido dos reatores se deu na vazão máxima das bombas, contabilizando um período total de cerca de 10 minutos para ambos os processos. Os reatores semi-contínuos foram operados durante 132 dias.

4.2.10.3 Etapa 3: Reatores contínuos

Como descrito no item anterior, nos reatores contínuos 1 e 2 (RC1 e RC2) também foram mantidos os mesmos parâmetros operacionais pré-definidos, relacionados ao inóculo direto, manutenção da biomassa aderida, TDH de 1 d, pH e temperatura. A variação entre os mesmos se deu pela concentração de glicerol adicionada, de 10 e 50 g/L, em RC1 e RC2, respectivamente. Devido à utilização de inoculação aderida, não foi realizado o controle do TDC.

A alimentação dos reatores foi realizada por bombas dosadoras (Watson Marlow, modelo 101U), com a vazão ajustada para atender o TDH estabelecido. A saída do efluente ocorreu por extravasamento natural, na altura correspondente ao volume útil máximo utilizado no reator.

Nesta etapa, optou-se por utilizar biomassa aderida para não ter arraste da mesma, conforme descrito por Wang & Wan (2009). A metodologia empregada para a inserção do material suporte seguiu a descrita por El Manssouri (2012), a partir da utilização de cesto metálico, conforme mostrado na Figura 9. Foi inserido aproximadamente 8 L de material suporte dentro do cesto metálico de cada reator. Cabe ressaltar que o material suporte utilizado continha 95% de índice de vazios, indicando que sua presença pouco interferiu no conteúdo de líquido efetivo no interior do reator.

Os reatores contínuos foram operados durante 62 dias.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A caracterização física e química do glicerol, baseada na avaliação da DQO, pH, porcentagem de glicerol e do teor de cinzas foi realizada como atividade inicial dos estudos experimentais, em que também foi avaliada a concentração de SVT do inóculo. Os valores dos parâmetros de caracterização do glicerol e do lodo anaeróbio podem ser visualizados na Tabela 8.

Tabela 8: Caracterização do glicerol e do inóculo utilizado nos experimentos.

Lodo Anaeróbio	
Sólidos totais (mg/L)	58.206
Sólidos voláteis totais (mg/L)	15.872
Sólidos fixos totais (mg/L)	42.333
Glicerol	
DQO (g/L)	1.057
% Teor de cinzas	3,2
% Glicerol	80,1
pH	6,1

Fonte: a autora.

5.1 Etapa 1: Reatores em batelada

Os testes em batelada foram realizados a fim de verificar o potencial de produção de H₂ e AGV com o glicerol bruto disponível para a realização dos testes. Para isso, também foi utilizada a sacarose como substrato para comparação, bem como a inoculação direta e natural.

5.1.1 Conversão de substrato e matéria orgânica

Na Tabela 9 podem ser visualizados os valores de eficiência de conversão (%) de glicerol e sacarose, bem como a remoção de DQO (%) nos testes com inoculação direta e natural, conforme cada relação A/M proposta:

Tabela 9: Eficiências de conversão de glicerol e sacarose e remoção de DQO, em cada relação A/M proposta na Etapa 1, empregando inoculação direta e natural.

A/M	Conversão de substrato (%)				Conversão matéria orgânica (DQO) (%)			
	Inoculação direta		Inoculação natural		Inoculação direta		Inoculação natural	
	<i>Glicerol</i>	<i>Sacarose</i>	<i>Glicerol</i>	<i>Sacarose</i>	<i>Glicerol</i>	<i>Sacarose</i>	<i>Glicerol</i>	<i>Sacarose</i>
0,5	100,0	100,0	100,0	78,1	20,2	25,4	12,1	10,2
0,75	100,0	100,0	96,7	69,1	25,1	22,6	13,6	22,0
1,0	100,0	100,0	69,1	67,1	15,0	21,2	14,8	12,3
1,125	100,0	100,0	66,9	59,2	22,4	22,4	12,3	14,5
1,5	100,0	100,0	63,0	61,1	22,1	25,6	15,9	11,3
2,0	100,0	95,5	55,3	44,9	16,2	30,2	18,9	9,6
2,25	77,5	100,0	56,4	31,2	30,3	28,6	21,6	9,8
3,0	69,7	100,0	44,9	28,5	32,3	32,0	14,1	10,2
4,5	46,0	100,0	42,3	22,0	26,2	37,2	16,3	11,4
6,0	28,2	100,0	22,7	10,0	31,1	36,6	10,2	9,2

Fonte: a autora.

Verificam-se diferentes valores de conversão, tanto em relação aos substratos utilizados, bem como quanto à forma de inoculação. Na inoculação direta, a sacarose foi consumida quase em sua totalidade, com valores acima de 95%. Já o glicerol apresentou conversão completa até a relação A/M= 2, e valores acima deste, acarretaram perda de eficiência, alcançando o valor mais baixo de 28,2% em A/M= 6,0. A sacarose é comumente utilizada como modelo de reação, devido à sua fácil degradabilidade (DAS & VEZIROGLU, 2008, WANG & WAN, 2009).

Na inoculação natural, o glicerol apresentou maior consumo do que a sacarose, com valores que variaram de 100 a 22,7%, e 78 a 10%, respectivamente.

Em relação à remoção de DQO, verifica-se que os valores para inoculação direta são maiores do que na inoculação natural. Na primeira, os valores são entre 15 e 21,2%, e na última, entre 9,2 e 22%. Espera-se que os valores de remoção de DQO sejam baixos, pois os mesmos representam somente a fração da matéria orgânica afluyente que é captada para

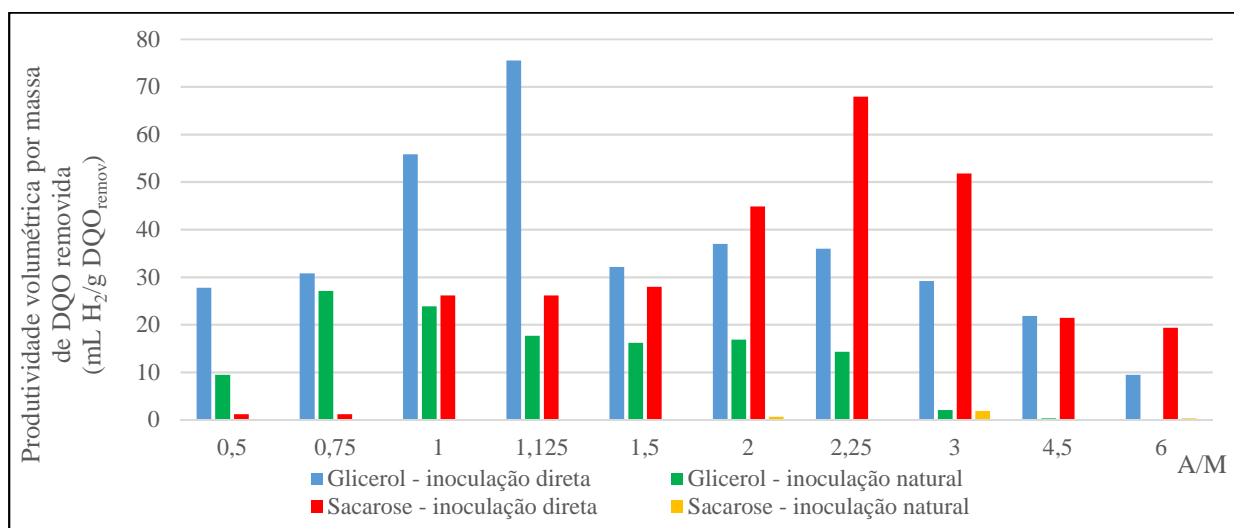
formação de CO₂ e biomassa. Uma grande parcela é apenas convertida a outros intermediários (LOVATO et al, 2015).

5.1.2 Produção de hidrogênio

A produção de H₂ foi avaliada utilizando-se 3 parâmetros: produtividade volumétrica de H₂ por massa de DQO removida (mL H₂/gDQO_{removida}.d), produtividade volumétrica (mL H₂/L.h) e produtividade molar específica (mol H₂/g SVT.h). Os mesmos foram escolhidos por serem os mais apresentados pela literatura relacionada, possibilitando a comparação e discussão dos resultados obtidos.

O Gráfico 1 mostra os valores obtidos de produtividade volumétrica de H₂ por massa de matéria orgânica removida nos testes. Verifica-se que as maiores produtividades podem ser observadas nas relações A/M de 1,125 para glicerol e 2,25 para sacarose e, com valores de e 75 e 68 mL H₂/g DQO_{removida}, respectivamente, ambos com inoculação direta.

Gráfico 1: Produtividade volumétrica de H₂ por massa de matéria orgânica removida obtida utilizando glicerol e sacarose como substrato orgânico, com inoculação direta e natural, nas relações A/M propostas.



Fonte: a autora.

Para comparação dos valores obtidos, verificou-se na literatura trabalhos que realizaram testes em batelada. Trevisan (2010) testou a atividade hidrogênica específica de lodo anaeróbio pré-tratado. Para otimização do teste, foram utilizadas diferentes relações A/M, entre 16 e 0,13,

de glicose como substrato, e faixas de pH de 5,0; 5,5; 6,0 e 6,5. A autora encontrou a maior produtividade de 38 mL H₂/g DQO, quando utilizada a relação A/M 3,2, e pH de 5,5.

Já Selembo et al (2009) realizaram testes em batelada para avaliar a produção de H₂ utilizando glicose, glicerol puro e bruto como substratos orgânicos e inóculo misto, todos na relação A/M de 3. Como resultados, para glicerol puro e bruto foram encontrados 71 e 43 mL H₂/g DQO, respectivamente, e 160 mL H₂/g DQO para a glicose. Os autores justificaram a menor produtividade do glicerol bruto pela presença de impurezas, que podem inibir a atuação microbiana.

As produtividades encontradas são superiores aos encontrados nos autores supracitados, inclusive para glicerol bruto. Contudo, o mesmo não se verifica quando analisados os dados do trabalho realizado por Chen et al (2006). Nesta pesquisa, foi conduzida uma avaliação da cinética de crescimento de bactérias produtoras de H₂, empregando sacarose, leite desnatado e resíduo de alimentos. A fermentação ocorreu em batelada, com lodo anaeróbio como inóculo.

Conforme os autores supracitados, a produção máxima de H₂ ocorreu quando foram utilizadas as relações A/M de 3,0 de sacarose, 21,3 de leite desnatado e 10,8 de resíduo de alimentos. Os valores máximos de produtividade de H₂ por massa de DQO removida foram 234, 119 e 101 mL H₂/g DQO, respectivamente.

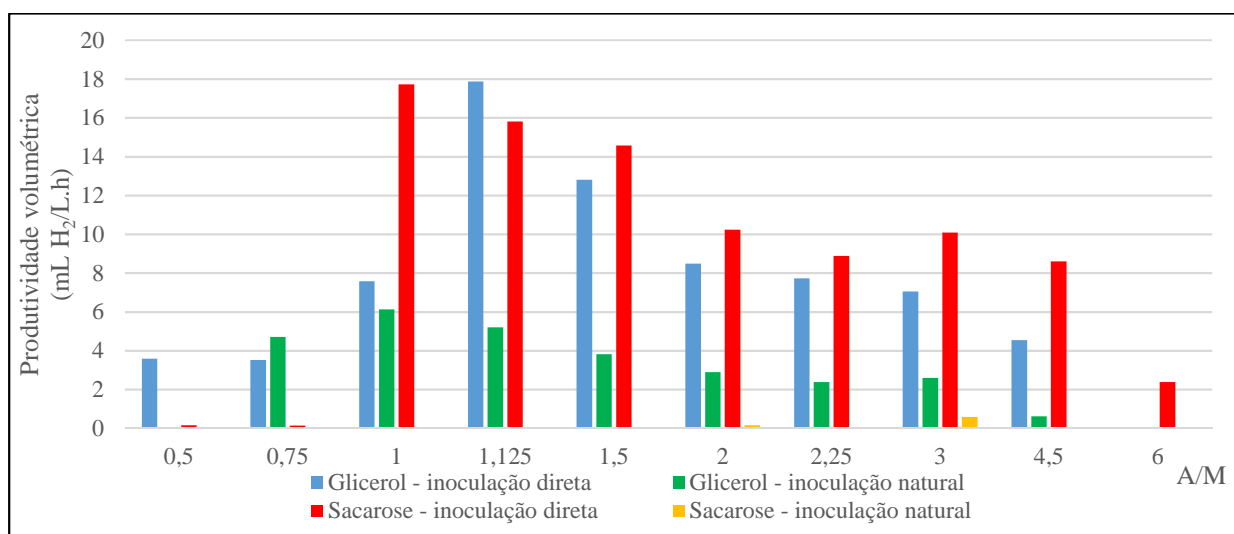
Fernandes et al (2010), empregando relação A/M de 1 e biomassa oriunda de reatores de leito fixo para a produção de H₂, testaram o efluente doméstico, vinhaça, glicerol e sacarose para avaliar a produção de H₂, em batelada. O gás foi produzido em todos os efluentes, com produtividades de 200 mL H₂/g DQO, para efluente doméstico, 579 mL H₂/g DQO para vinhaça, 200 mL H₂/g DQO para glicerol e 270 mL H₂/g DQO para sacarose.

Acredita-se que as elevadas produtividades volumétricas por massa de DQO removida obtidas pelos últimos autores citados sejam devido à utilização de inóculo oriundo de reator empregado para produção de H₂. Sendo assim, a biomassa já estava estabelecida e aclimatada para esta finalidade.

Ressalta-se que a produtividade volumétrica por massa de DQO removida relaciona o volume de H₂ produzido por massa de DQO removida, ou seja, o quanto da matéria orgânica inserida foi efetivamente convertida e transformada em H₂. Sendo assim, considerou-se este parâmetro o mais relevante para avaliação dos resultados obtidos. Mesmo não realizando etapa prévia de aclimação da biomassa com os substratos utilizados, considerou-se a produtividade satisfatória, principalmente do glicerol, quando comparado com os resultados da literatura.

Os valores de produtividade volumétrica obtidos nos testes podem ser visualizados no Gráfico 2. Destacam-se as relações A/M= 1, para sacarose, e 1,125, para glicerol, ambos com cerca de 18 mL H₂/L.h. No menor e maior valor de A/M utilizados, 0,5 e 6, não foi constatada produtividade quando utilizado sacarose e glicerol, respectivamente.

Gráfico 2: Produtividade volumétrica de H₂ nas relações A/M propostas, com inoculação direta e natural, glicerol e sacarose como fonte carbonácea.



Fonte: a autora.

No estudo realizado por Logan et al (2002), foi avaliada a produção de H₂ empregando respirômetros anaeróbios (batelada), com os substratos glicose, sacarose e amido de batata, na relação A/M de 1,25, e melação de cana, na relação A/M de 0,16. Nos testes, foi empregado solo pré-tratado como inóculo. Como resultados, foram obtidas as produtividades volumétricas de 4,25; 4,45; 3,06 e 4,55 mL H₂/L.h, respectivamente.

Seifert et al (2009) testaram glicerol e lodo anaeróbio pré-tratado, ambos em diferentes concentrações para avaliar a produção de H₂. As produtividades volumétricas encontradas foram de 3,83, em A/M de 0,43, e 7,06 mL H₂/L.h, em A/M de 0,86. Os autores ainda citam que em A/M de 2,58, a produtividade se estabiliza, alcançando 7,94 mL H₂/L.h.

Sarma et al (2013), empregando glicerol bruto em testes em batelada, utilizando a cepa *Enterobacter aerogenes* NRRL B407, sem adição de nutrientes, encontraram a produtividade máxima de 12,04 mL H₂/L.h, utilizando a concentração de substrato de 10 g/L.

Com estas informações, verifica-se que a produtividade volumétrica obtida no presente trabalho é coerente a literatura. Os valores encontrados são maiores do que os mostrados, inclusive quando empregada cultura pura, utilizando glicerol ou outros substratos.

Contudo, Ginkel, Sung & Lay (2001) obtiveram maiores valores do que os relatados neste trabalho. Os autores avaliaram o efeito da variação de pH (4,5 a 7,5) e concentração de sacarose (1,5 a 44,8 g DQO/L) na produção de H₂. Para formação do inóculo misto, os autores utilizaram uma mistura de solos, submetida ao tratamento térmico. Foi determinada a produtividade volumétrica máxima de 74,7 mL H₂/L.h, utilizando pH de 5,5 e concentração de substrato de 7,5 g/L.

Os valores dos parâmetros rendimento e produtividade volumétrica foram influenciados pela relação A/M utilizada, em ambos os substratos utilizados. Para glicerol, menores valores de A/M, entre 1 e 1,5, destacando-se a relação 1,125, mostraram-se satisfatórios. Já para sacarose, os melhores resultados estão em uma faixa mais ampla, entre 1 e 6.

No trabalho realizado por Sarma et al (2015), utilizando glicerol bruto, foi observado que a produção de H₂, via fermentativa, pode sofrer inibição pelo substrato. Os autores constataram que, quando elevadas concentrações de glicerol estavam presentes, menores rendimentos de H₂ foram obtidos. O glicerol bruto possui impurezas, como metanol e sabão, que em elevadas concentrações podem inibir o crescimento microbiano (CHI et al, 2007). Por isso, devido à maior concentração do glicerol no meio líquido, a partir da relação A/M= 2,25, os valores de rendimento e produtividade volumétrica tendem a diminuir. Fato este corroborado pela eficiência de conversão de glicerol, mostrada na Tabela 8. A partir desta mesma relação, não ocorre a conversão completa do substrato, como ocorre nas menores relações testadas.

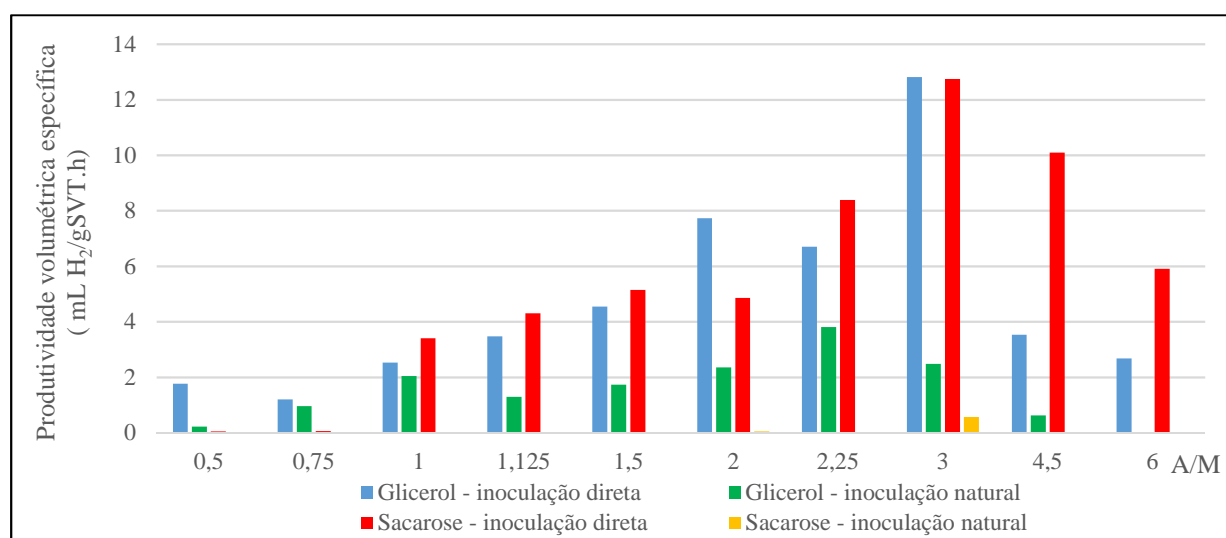
A diminuição da produção de gás devido ao excesso de substrato também é verificada quando utilizada a sacarose. De acordo com Gavala, Skiadas & Ahring (2006) e Lo et al (2008), ocorre maior produção de H₂ com o aumento de concentração de carboidratos. Contudo, há um limite em que o metabolismo bacteriano é alterado, passando a produzir álcoois, o que acarreta diminuição da produção de H₂. Com os valores de rendimento e produtividade volumétrica obtidos, acredita-se que este limite seja a partir da relação A/M de 3. Desta forma, ao contrário do glicerol, em que o excesso de substrato pode inibir a atividade microbiana, maiores concentrações de sacarose favorecem a formação de outros subprodutos, ao invés de H₂.

Já nas menores relações A/M, de 0,5 e 0,75, foram observados baixos valores dos parâmetros analisados, podendo ser decorrente por duas razões principais. A primeira é pelo excesso de lodo presente, e a segunda, devido à baixa concentração de matéria orgânica. A maior concentração de biomassa pode dificultar a transferência do substrato (MONTEGGIA, 1997; TREVISAN, 2010), tornando o mesmo limitante para o processo fermentativo. Além disso, conforme Seifert et al (2009) e Phowan & Danvirutai (2014), elevadas concentrações de biomassa podem causar efeito adverso, pois o H₂ produzido pode ser consumido para formar outros subprodutos, o que influencia diretamente no rendimento da fermentação. Já a matéria orgânica em escassez não fornece energia suficiente para ativar o metabolismo microbiano até formação dos produtos de interesse.

Cabe destacar que a produtividade volumétrica determina o volume de H₂ produzido por volume de reator, em um tempo de reação estabelecido. Sendo assim, o mesmo não relaciona o substrato afluente, nem a capacidade de conversão do mesmo pela biomassa e por isso, foi considerado um resultado auxiliar para comparação no presente trabalho.

No Gráfico 3 pode ser visualizada a produtividade volumétrica específica dos testes. Os maiores valores, de aproximadamente 13 mL H₂/gSVT.h, foram obtidos em ambos os substratos utilizados.

Gráfico 3: Produtividade volumétrica específica nas relações A/M propostas, utilizando glicerol e sacarose como substrato.



Fonte: a autora.

Diferente do rendimento e produção volumétrica, a produtividade específica mostrou valores crescentes nas menores A/M, alcançando o máximo em 3, para sacarose e glicerol. Sendo assim, quanto maior a relação A/M, há mais substrato do que biomassa no meio, ou seja, há a maior captação de matéria orgânica por microrganismo, já que não há competição por alimento, que seria decorrente caso o substrato fosse limitante (menores A/M). Contudo, na maior relação A/M testada, igual a 6,0, o efeito da presença do substrato pode inibir a captação do mesmo pelos microrganismos, ou então formar outros produtos, como já foi descrito.

Zhang, Liu & Fang (2003) avaliaram o efeito do pH (4,0 a 9,0) e concentração de amido (4,6 a 36,6 g/L) na produção de H₂ em condições termofílicas (temperatura de 55 °C). A produtividade volumétrica específica máxima obtida foi de 15,2 mL H₂/g SVS.h, na concentração de 4,6 g/L e pH 7.

Khanal et al (2004) conduziram diversos testes em batelada para avaliar o efeito do pH (4,5 a 6,5) na produção de H₂, utilizando sacarose como substrato, na concentração de 6 g/L. Os autores verificaram o maior valor de produtividade volumétrica específica de 9 mL H₂/g SVS.h, no pH de 5,5.

Fernandes et al (2010), citados anteriormente, também avaliaram a produtividade específica de H₂ em efluente doméstico, vinhaça, glicerol e sacarose, em A/M de 1. Os valores obtidos, com biomassa medida em sólidos voláteis suspensos (SVS), foram 22,25 mL H₂/g SVS.h para efluente doméstico, 86,81 mL H₂/g SVS.h para vinhaça, 31,30 mL H₂/g SVS.h para glicerol e 67,25 mL H₂/g SVS.h para sacarose.

Alguns valores obtidos no presente trabalho são menores ou maiores do que os encontrados na literatura. Este fato pode ser decorrente das condições experimentais utilizadas, origem e pré-tratamento do inóculo, bem como características dos substratos. Em relação à produtividade volumétrica específica, acredita-se que também haja diferença devido à unidade de medida de biomassa. Nos trabalhos supracitados, foi utilizado como referência de cálculo SVS, e no presente trabalho, SVT.

O tipo de biomassa utilizada nos testes influenciou a fermentação. Nos três parâmetros relacionados com a produção de H₂, verificou-se que resultados satisfatórios foram obtidos quando foi utilizada a inoculação direta. A inoculação natural, por sua vez, não se destacou por apresentar boa produção de H₂. Quando o substrato utilizado foi o glicerol, foi produzido biogás e H₂, em menor quantidade da constatada na inoculação direta. O mesmo não ocorreu quando a sacarose foi empregada. Nestes ensaios, pouco ou nenhum biogás foi detectado.

Acredita-se que isso ocorreu devido aos tipos de organismos dominantes presentes, responsáveis pela conversão dos substratos.

O consórcio microbiano produtor de H₂ pode ser obtido de várias fontes, desde solos e lodos de ETE (AKUTSU et al, 2009; LI & FANG, 2007). De acordo com Selembo et al (2009) e Chookaew, O-Thong & Prasertsan (2014), microrganismos da espécie *Klebsiella* e *Enterobacter* são predominantes em testes para produção de H₂ que utilizam glicerol como substrato orgânico. Já espécies de *Clostridium* (SELEMBO et al, 2009) são as dominantes quando empregados carboidratos, como glicose e sacarose. Conforme Wang & Wan (2009), espécies do gênero *Clostridium* são anaeróbias estritas e formadoras de endoesporos, enquanto que *Enterobacter* e *Klebsiella* são anaeróbias facultativas.

Desta forma, a fermentação de sacarose será bem-sucedida quando lodo anaeróbio for empregado, o que pode ter acarretado a não produção de biogás, quando utilizado inóculo natural. Já a conversão de glicerol apresenta maior eficiência quando lodo anaeróbio é utilizado, verificado na eficiência de conversão do substrato, já mostrado na Tabela 8, mas também pode ser fermentado quando utilizada a inoculação natural.

Substratos com elevados teores de matéria orgânica têm um elevado potencial para serem utilizados na produção de H₂, via fermentativa. A natureza do substrato determina a rota metabólica e o rendimento dos produtos finais da fermentação (ARIMI et al, 2015).

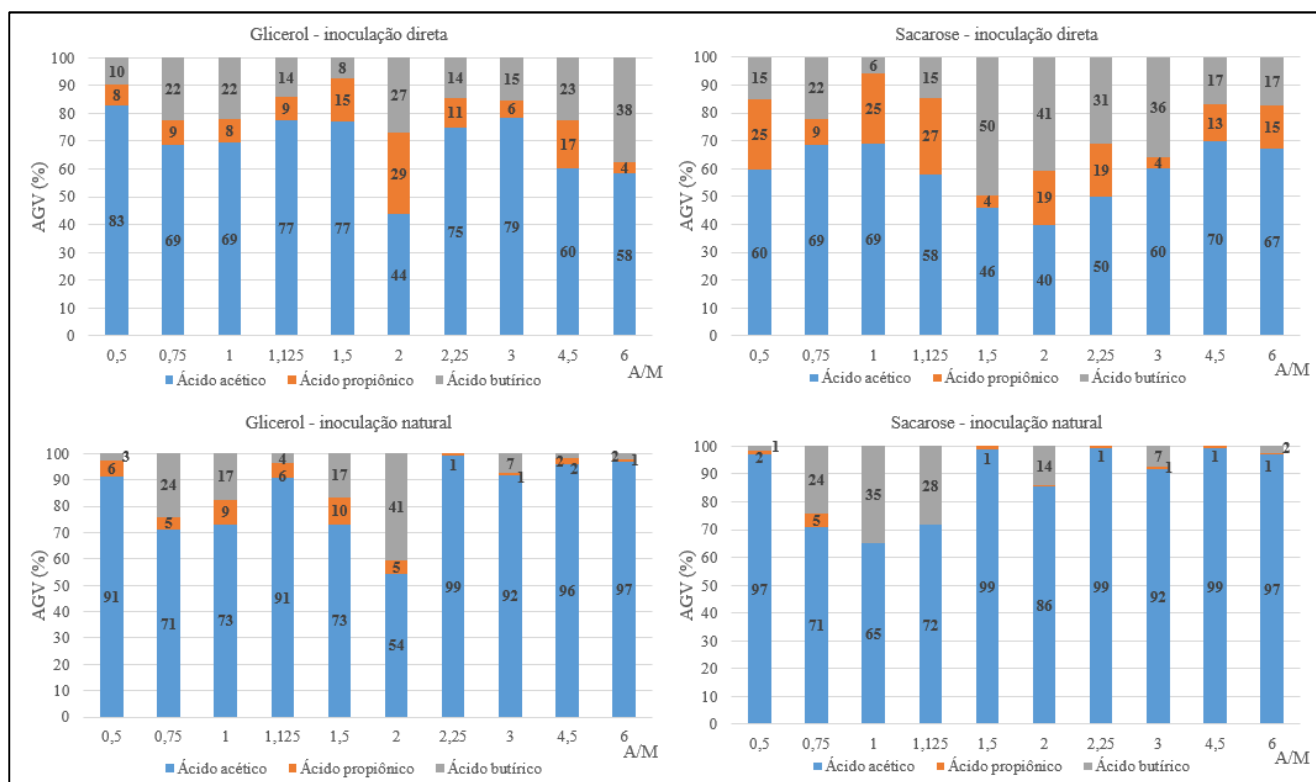
Sendo assim, mesmo que haja a presença de impurezas no glicerol bruto, os resultados de produção de gás obtidos neste trabalho, avaliados principalmente sob a forma de produtividade volumétrica por massa de substrato removido, são satisfatórios, próximos ou até superiores do que os verificados com sacarose, nas mesmas condições empregadas.

5.1.3. Produção de ácidos graxos voláteis

Para a avaliação da produção de AGV nos experimentos, duas informações são de grande valia. A primeira é a distribuição mássica, que mostra a proporção dos AGV presentes, após a fermentação. Já a segunda é o grau de acidificação, que relaciona a conversão do substrato à AGVs, em equivalente de DQO.

A distribuição percentual mássica obtida nos experimentos está mostrada no Gráfico 4. Foram avaliados os principais ácidos produzidos durante a fermentação de glicerol e sacarose, nas inoculações direta e natural.

Gráfico 4: Distribuição percentual mássica dos AGV produzidos, conforme cada relação A/M proposta, em função do tipo de inóculo e de substrato utilizados.

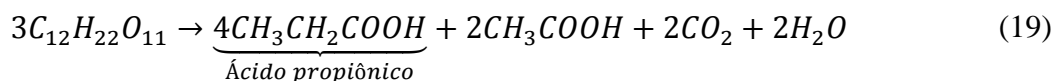
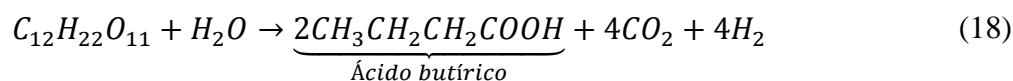
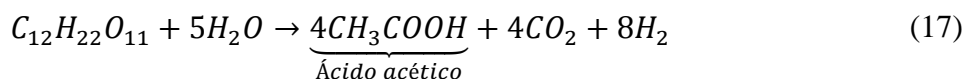


Fonte: a autora.

Como pode ser visualizado no Gráfico 4, dentre os AGV avaliados, o ácido acético foi o predominante na fermentação de glicerol e sacarose, salvo algumas exceções. Na inoculação direta, com glicerol como substrato, apenas na relação A/M 2 a proporção de ácido acético foi de 44%. Nas demais relações, este ácido esteve presente em no mínimo de 58% do total de AGV gerados. Já quando a sacarose foi empregada, em A/M de 1,5 e 2, o percentual deste ácido foi de 46 e 40%, respectivamente. Nas demais relações, esta proporção foi acima de 50%.

Na inoculação natural, verifica-se teor de ácido acético acima de 54%, e em algumas situações, correspondendo a 99% do conteúdo de AGV presente.

Os maiores produtos da produção de hidrogênio via fermentação de carboidratos são os ácidos acético, butírico e propiônico (KAPDAN & KARGI, 2006). De acordo com Khanal et al (2004), as reações de fermentação de sacarose para a produção de H₂ são descritas na Equação 17, com a formação de ácido acético, e na Equação 18, com a formação de ácido butírico. Já a formação de ácido propiônico está mostrada na Equação 19, conforme descrito por Foglia et al (2011).



Como pode ser observado, a rota metabólica de produção de ácido acético e butírico, utilizando sacarose como substrato, está associada a elevadas produções de H₂, ou seja, o rendimento teórico é de 8 e 4 mols de H₂ para cada mol de sacarose empregado, respectivamente. Já a conversão à ácido propiônico não libera H₂.

Já em relação ao glicerol, a estequiometria da formação de subprodutos da fermentação foi mostrada nas Equações 2 a 6, no Referencial Teórico deste trabalho. Destacam-se as Equações 2 e 3, na qual foram confrontadas a produção dos ácidos acético e butírico, subprodutos com o maior rendimento de H₂. Para cada mol de glicerol, 3 mols de H₂ são formados, concomitante à produção de acetato, e 2 mols de H₂, para butirato.

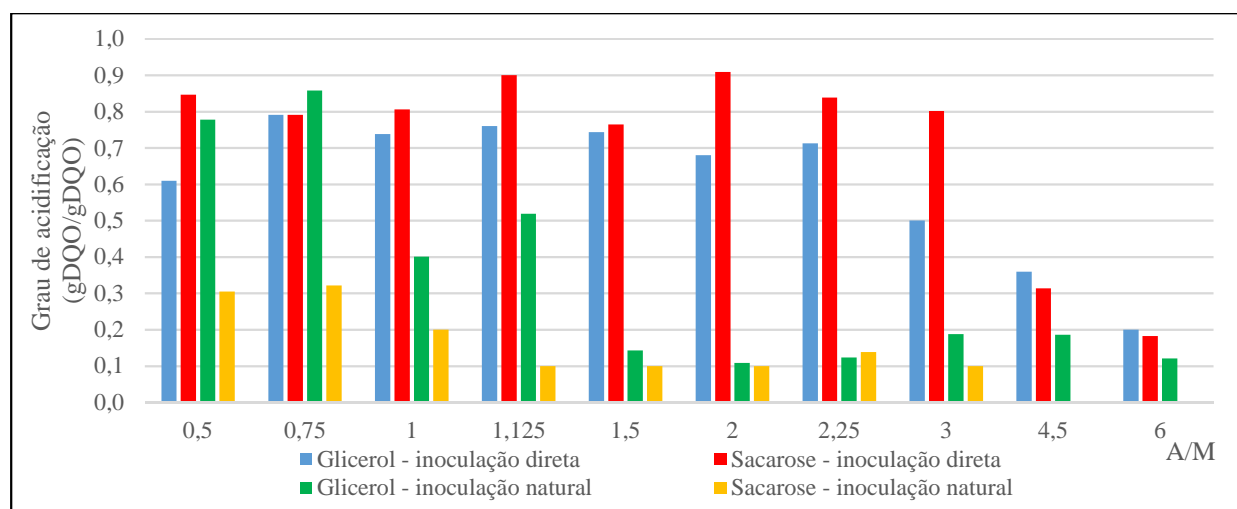
Nos resultados mostrados, mesmo nas situações em que o ácido acético não foi predominante, a mistura de acetato e butirato no meio líquido sempre foi prevalente. Sendo assim, quando analisada a proporção dos AGV formados, esta pode ser associada à produção de H₂.

O grau de acidificação calculado, em função da DQO dos AGV produzidos, pode ser visualizado no Gráfico 5. Visualiza-se o maior valor do grau de acidificação, de 90%, quando utilizada a sacarose como substrato orgânico e inoculação direta, nas relações A/M 1,125 e 2.

O maior grau de acidificação encontrado, utilizando o glicerol como substrato foi de aproximadamente 80%, na inoculação direta, e 85%, na inoculação natural. Com este inóculo também foi verificada a acidificação da sacarose, alcançando 32% na relação A/M de 0,75.

Como pode ver visualizado no Gráfico 5, salvo algumas exceções, a utilização da sacarose como substrato resultou em maiores valores do grau de acidificação. Quando o glicerol é empregado na fermentação, além dos AGV, outros produtos podem ser formados, como etanol (ITO et al, 2005; SAKAI & YAGISHITA, 2007, ROSSI et al, 2012) e 1,3-propanediol (SELEMBO et al, 2009; ROSSI et al, 2012), também associados à produção de H₂, como mostrado nas Equações 4 a 6.

Gráfico 5: Grau de acidificação dos experimentos em batelada, utilizando glicerol e sacarose como substrato e inoculação direta e natural, em cada relação A/M proposta.



Fonte: a autora.

Bengtsson et al (2008) avaliaram a etapa de acidificação utilizando reatores em batelada e efluentes industriais, soro de queijo e efluente de fábrica de papel e celulose. O maior grau de acidificação encontrado foi de 67%, quando empregado o soro de queijo como substrato orgânico, na relação A/M de 4,5.

A acidificação foi maior nas relações A/M entre 0,5 e 3, e menor em 4,5 e 6. Estes resultados corroboram os encontrados por Yu & Fang (2001). Neste trabalho, foram conduzidos experimentos a fim de verificar o efeito de diferentes concentrações de efluente de laticínios, de 2 a 30 g/L, sob a forma de DQO. Os autores supracitados perceberam que, quando utilizada a menor a concentração de substrato, 2 g/L, o grau de acidificação alcançou seu valor máximo, igual a 0,6, e houve pouca formação de álcoois. Contudo, quando a DQO do substrato aumentou, este parâmetro decaiu, até atingir o menor valor, de aproximadamente 0,3, quando utilizada a DQO de 30 g/L. Ao mesmo tempo, elevadas concentrações de álcoois produzidos no meio reacional foram detectadas. Sendo assim, Yu & Fang (2001) concluíram que os ácidos acético e butírico, bem como o H₂, são convertidos à álcoois, em altos teores de matéria orgânica.

A partir da análise dos AGV produzidos, percebe-se que o glicerol bruto testado foi convertido a ácidos acético e butírico, alcançando acidificação satisfatória, porém em geral inferior à obtida com sacarose. Tanto para a produção de H₂ como de AGV, verificou-se que relações A/M iguais ou maiores do que 4,5, para testes em batelada, não são recomendadas.

Acredita-se que, acima destes valores, a biomassa presente sofre influência das impurezas contidas no glicerol, que podem até inibir o desenvolvimento microbiano.

De uma forma geral, os resultados obtidos na primeira etapa deste trabalho mostraram que o glicerol bruto disponível para a realização dos testes possui potencial para a produção de H_2 e ácidos graxos voláteis, apresentando desempenho semelhante e até superior ao obtido com a sacarose. Contudo, verificou-se que a maior a concentração de glicerol inserida contribuiu para diminuir a eficiência do processo, medida sob a forma de conversão de substrato, produtividade por massa de substrato convertida, volumétrica e específica, bem como produção de AGV. Sendo assim, depois dessa análise preliminar, as etapas 2 e 3 deste trabalho foram realizadas utilizando glicerol como substrato orgânico.

5.2. Etapa 2 e 3: Reatores semi-contínuos e contínuos

Neste item, optou-se pela apresentação dos resultados e discussão em conjunto das etapas 2 e 3, no intuito de comparação, mesmo que a sustentação da biomassa dos dois sistemas fosse distinta. Os reatores semi-contínuos foram operados utilizando biomassa suspensa, e por isso o controle do TDC de 1,5 d foi realizado. Já nos reatores contínuos, a biomassa empregada foi aderida a um meio suporte, para que não fosse carreada juntamente com o efluente. Por isto, neste modelo operacional não houve controle do TDC. Cabe ressaltar que os demais parâmetros operacionais, como TDH de 1 d, substrato adicionado e suas concentrações, inóculo e pré-tratamento, meio nutricional, temperatura e pH inicial foram os mesmos em ambas as condições.

Esta comparação foi realizada pois não foram encontrados na literatura outros trabalhos relatando a operação semi-contínua, utilizando glicerol e inóculo misto. Além dos resultados dos reatores contínuos, também se buscou na bibliografia resultados de experimentos realizados empregando outros modelos operacionais, comumente utilizados para a produção de H_2 , para a discussão. Sendo assim, foi avaliado o desempenho operacional do regime semi-contínuo.

Foram operados dois reatores em cada etapa. Na etapa 2, avaliou-se a operação semi-contínua (RSC1 e RSC2), durante 132 dias. Já na etapa 3, os reatores foram operados de forma contínua (RC1 e RC2) no tempo de 62 dias.

As concentrações de glicerol afluyente fixadas, de 10 e 50 g/L, foram empregadas nos dois modelos operacionais. Isto conseqüentemente modificou a carga orgânica volumétrica (COV) aplicada, conforme Tabela 10.

Tabela 10: Concentração e carga orgânica volumétrica adicionada nos reatores 1 e 2, operados de forma semi-contínua e contínua.

	Concentração glicerol (g/L)	COV (g/L.d)	COV (g/L.h)
Semi-contínuo 1	10	7	0,29
Semi-contínuo 2	50	30	1,25
Contínuo 1	10	10	0,41
Contínuo 2	50	50	2,08

Fonte: a autora

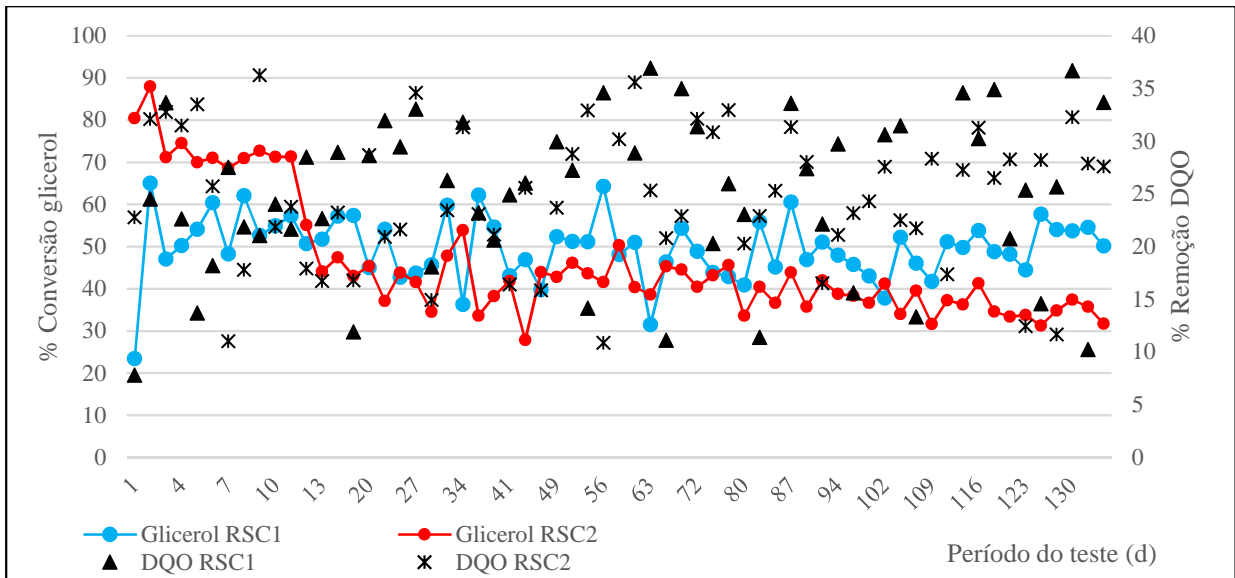
A apresentação dos resultados foi dividida em parâmetros físicos e químicos, em relação ao volume de H₂ produzido, rendimento molar, produtividade volumétrica e específica; e por fim, na diversidade microbiana.

5.2.1 Parâmetros físicos e químicos

5.2.1.1 Conversão de glicerol e remoção de DQO

A conversão do glicerol e remoção de DQO, durante a operação dos reatores semi-contínuos, pode ser visualizada no Gráfico 6. Pode-se notar que, salvo exceções, a faixa mais abrangente de conversão de glicerol é de 30-70%, e a remoção de DQO encontrada foi abaixo de 37%, em ambos os reatores.

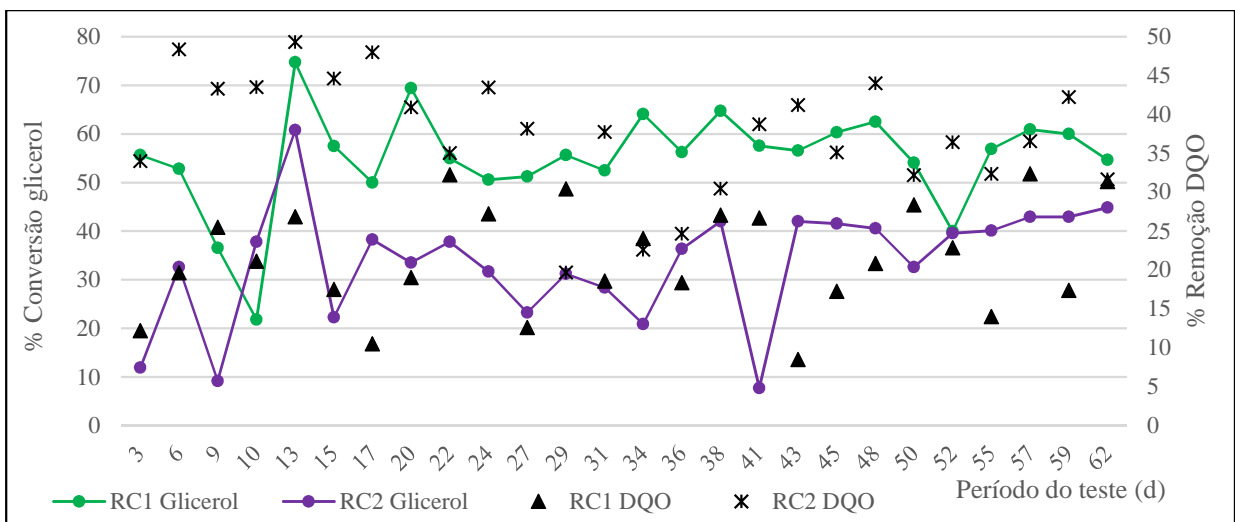
Gráfico 6: Conversão de glicerol e remoção de DQO durante o período de realização do teste, nos reatores semi-contínuos 1 e 2.



Fonte: a autora

Já quando analisada a conversão de glicerol no sistema contínuo, no Gráfico 7, percebe-se uma faixa de variação de 20-70%, no reator 1 e 10-50% no 2. A remoção de DQO atingiu valor máximo de 32% e 49,3% nos reatores 1 e 2, respectivamente.

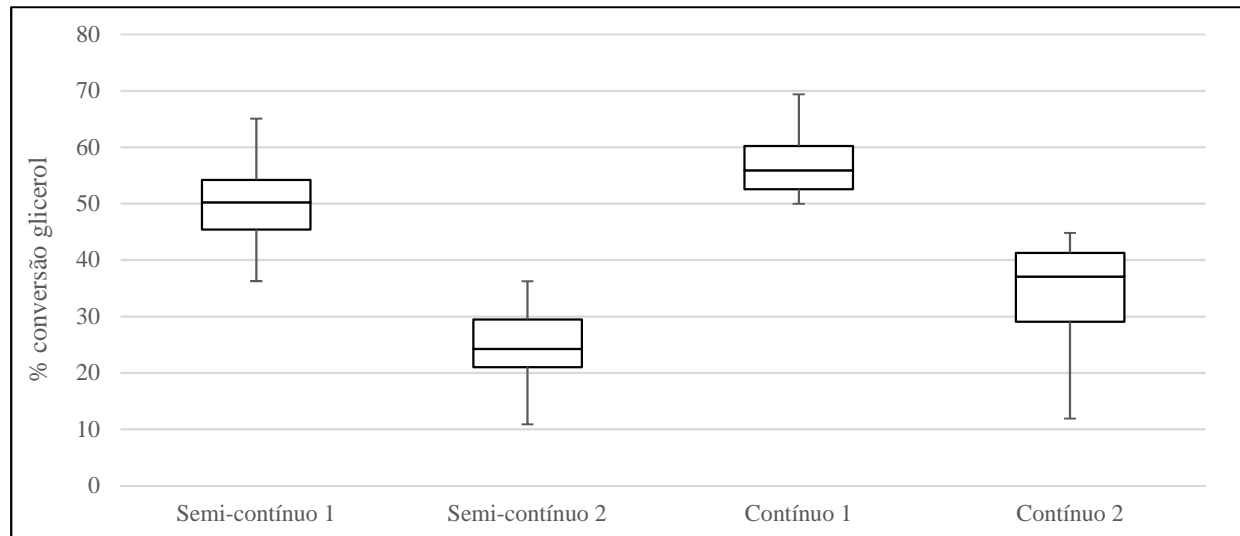
Gráfico 7: Conversão de glicerol e remoção de DQO nos reatores contínuos 1 e 2, no decorrer do período experimental.



Fonte: a autora

Os dados de conversão de glicerol residual dos dois regimes operacionais foram tratados sob a forma *Boxplot*, mostrados no Gráfico 8, para análise comparativa dos valores de mediana, quartis superior e inferior.

Gráfico 8: *Boxplot* dos dados de conversão de glicerol (%) nos reatores semi-contínuos e contínuos 1 e 2.



Fonte: a autora

Em relação à operação semi-contínua, verifica-se que o reator 1 apresenta mediana de 50%, e no reator 2, 24%. Já nos contínuos, o RC1 possui mediana de 55% e o RC2 de 38%. Assim, se percebe que quanto menor a concentração afluente, e conseqüentemente a COV aplicada, maior foi a conversão do glicerol.

Conforme trabalhos encontrados na literatura, em que foi utilizado glicerol como substrato orgânico e sistema de operação contínuo, verifica-se que os resultados encontrados são coerentes.

Reungsang, Sittijunda & O-Thong (2013) avaliaram reator UASB para produção de H₂ a partir de glicerol, puro e bruto, utilizando *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 imobilizada. Foram avaliadas as COV de 25; 37,5; 50; 62,5 e 75 g/L.d, e para glicerol puro 37,5; 50 e 62,5 g/L.d, no TDH de 24h. A conversão máxima encontrada quando utilizado o glicerol puro foi de 99,3%, utilizando a menor COV. Já em relação ao glicerol bruto, 99,6%, na COV de 50 g/L.d.

Lo et al (2013) testaram um CSTR para avaliação da produção de H₂ utilizando glicerol puro e bruto como substrato orgânico, e a cepa *Clostridium pasteurianum* CH₄ como inóculo. As condições empregadas foram: temperatura de 35 °C, TDH de 12 h, sem controle de pH, e concentração de glicerol, puro e bruto, de 10 g/L. A conversão média de glicerol puro foi de 99,3%, o bruto de 97,4%.

A conversão de glicerol poderia ser relacionada ao TDC. Segundo Kim, Han & Shin (2008), baixos valores de TDC podem reduzir a eficiência de conversão do substrato e retenção de biomassa ativa. Contudo, a partir da análise dos trabalhos apresentados, acredita-se que os elevados valores de conversão de glicerol mostrados pelos referidos autores, sejam associados à composição do substrato utilizado, e não devido à maior retenção de biomassa.

No trabalho de Lo et al (2013) é empregado CSTR sem imobilização microbiana. Por isso, é provável que ocorra o arraste de células durante a operação do reator, o que também impede o acúmulo de microrganismos. Mesmo assim, os autores relataram eficiência média de conversão de glicerol bruto de 97,4%.

Outra possibilidade pode ser relacionada com os constituintes presentes no substrato utilizado. Moncayo Bravo et al (2015) citam que as impurezas do glicerol bruto podem exercer efeito negativo na produção de H₂, bem como dificultar o crescimento da biomassa.

Desta forma, acredita-se que os menores valores de conversão podem ser relacionados às impurezas presentes no glicerol empregado no presente trabalho, e não devido ao controle de TDC utilizado, de 1,5 d. Isto também explica o menor percentual de conversão de glicerol verificado quando aplicada a maior COV, já que quanto maior a carga, maior o conteúdo de inibidores adicionados ao sistema. Esta constatação corrobora os valores de conversão obtidos no teste preliminar em batelada, realizado na etapa 1 deste trabalho e descrito no item 5.1.

Já Ferreira (2014) avaliou o efeito do TDH (1 a 14h) em reator anaeróbico de leito fluidizado (RALF), com glicerol bruto na concentração de 5 g/L. O inóculo foi oriundo de reator UASB, e o sistema operou a temperatura de 55°C. Como resultados de eficiência de conversão do substrato, a autora verificou a maior eficiência de conversão do substrato de 55,4% no TDH de 10h, e menor eficiência, de 16%, no menor TDH testado.

Como foi verificada pouca variabilidade dos resultados de remoção de DQO, não foi realizada a análise dos dados empregando o *Boxplot*, apenas valor médio e seu respectivo desvio padrão, valores máximos e mínimos, conforme mostrado na Tabela 11.

Tabela 11: Valores médios, máximos e mínimos de remoção de DQO encontrados durante a operação dos reatores semi-contínuos e contínuos.

	Semi-contínuo 1	Semi-contínuo 2	Contínuo 1	Contínuo 2
Média (%)	24,3 ± 7,1	24,6 ± 6,4	21,6 ± 6,9	37,5 ± 7,7
Máximo (%)	36,7	36,3	32,3	49,3
Mínimo (%)	10,2	10,9	8,5	19,7

Fonte: a autora

Em relação à remoção de DQO, Lovato et al (2015) citam que a mesma representa apenas a parcela de CO₂ presente no biogás e a absorção de carbono pela biomassa para formação de novas células. Sendo assim, valores de remoção de DQO obtidos nas etapas 2 e 3 não são elevados, pois grande parte do glicerol inserido não é removido, pois o mesmo é apenas convertido a compostos intermediários, como AGV, álcoois e 1,3-PD.

Os autores supracitados relataram remoção de DQO máxima de 38% e mínima de 17%, valores próximos dos encontrados quando analisados os reatores semi-contínuos e no reator contínuo 1. Já o reator contínuo 2 apresentou valores máximos de 50%, próximos dos encontrados por Júnior, Etchebere & Zaiat (2015).

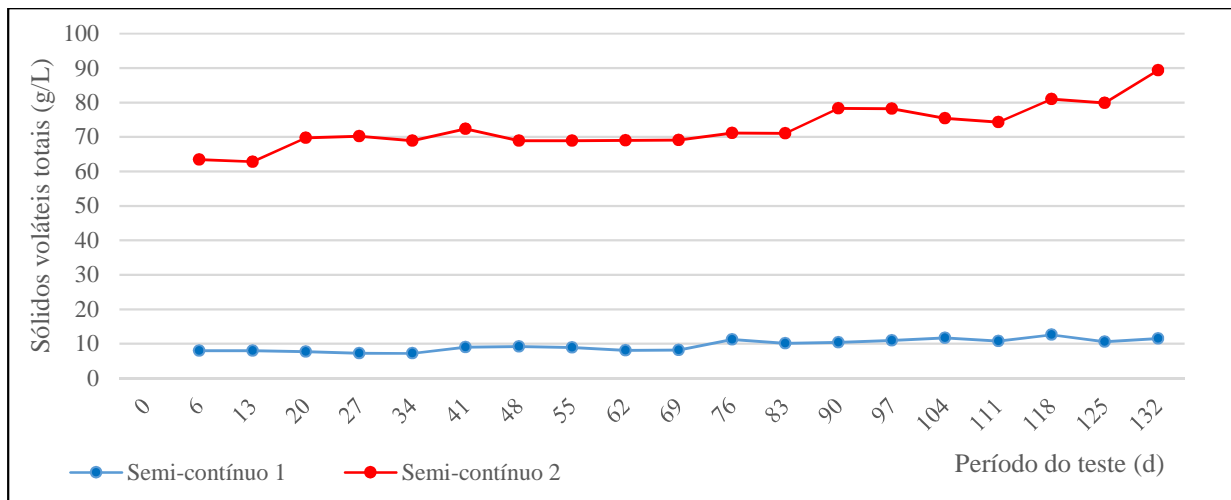
5.2.1.2 Concentração de biomassa

Para acompanhamento do desenvolvimento de biomassa nos reatores, análises de SVT do meio reacional foram realizadas semanalmente. Nos reatores contínuos, a determinação de SVT no material suporte foi realizada no início e ao final do teste.

Nos testes em batelada realizados neste trabalho, verificou-se que relações F/M maiores do que 4,5 podem inibir a atividade microbiana. Contudo, como em reatores semi-contínuos e contínuos ocorre o crescimento da biomassa, optou-se por inocular ambos os reatores semi-contínuos com SVT de 2,5 g/L.

Os valores encontrados deste parâmetro nos reatores semi-contínuos no decorrer do experimento podem ser vistos no Gráfico 9. Verifica-se o aumento da concentração de biomassa nos reatores semi-contínuos. No RSC1, a concentração de SVT se manteve estável durante todo o período operacional em torno de 10 g/L. Já no RSC2, de 60 a 70 g/L, até o 80º dia, e após isso, aumentou até alcançar o máximo SVT próximo a 90 g/L

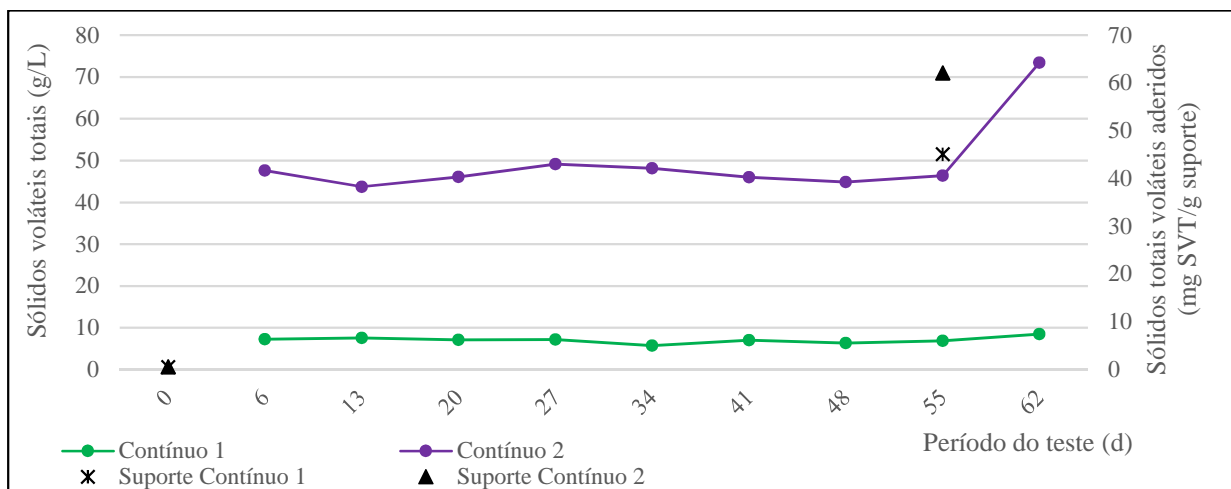
Gráfico 9: Concentração de SVT dos reatores semi-contínuos e contínuos no decorrer dos experimentos.



Fonte: a autora

Já nos reatores contínuos, além do monitoramento semanal do teor de SVT do meio líquido, também foi avaliado este parâmetro em relação ao material suporte, no início e no fim do período experimental, para acompanhamento do crescimento celular aderido. Estes resultados são mostrados no Gráfico 10.

Gráfico 10: Concentração de SVT dos reatores contínuos no meio líquido no decorrer do experimento e do meio suporte, no início e ao final do teste.



Fonte: a autora

Nos reatores contínuos, é possível observar SVT no meio líquido em torno de 10 g/L, no reator 1, e 50 g/L, no reator 2. Em relação à concentração no meio suporte, também foi constatado incremento de biomassa. No início da operação, os SVT do suporte dos dois reatores foram em torno de 0,6 mg SVT/g suporte. No fim da operação, foi verificado 45,1 mg SVT/g suporte no RC1 e 62,1 mg SVT/g suporte no RC2.

Moncayo Bravo et al (2015) testaram AnSBBR para produzir H₂ utilizando glicerol bruto, na concentração de 5 g/L, e TDH de 4h, com lodo anaeróbio pré-tratado aderido em polietileno de baixa densidade. A concentração de SVT encontrada no meio líquido foi de 1630 mg/L, e no meio suporte foi de 32 mg SVT/g suporte.

Lo et al (2013) avaliaram o desempenho de CSTR na produção de H₂ utilizando glicerol puro e bruto como substrato orgânico, na concentração de 10 g/L e a cepa *Clostridium pasteurianum* CH4 como inóculo, no TDH de 12h. A concentração celular, determinada por massa seca, foi de 0,79 g/L, quando o glicerol puro foi utilizado. Já para o bruto, este valor foi de 0,60 g/L.

Utilizando reator UASB, Reungsang, Sittijunda & O-Thong (2013) empregaram *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 imobilizada nos grânulos para produção de H₂ e TDH de 24h. Os autores utilizaram glicerol puro e bruto, e verificaram maior concentração de biomassa, medida por SVS, de 3,3 e 2,2 g SVS/L, respectivamente, na COV de 50 g/L.d.

Desta forma, verifica-se que a concentração de biomassa encontrada nos reatores avaliados neste estudo foi bastante elevada, quando comparado às descritas pela literatura. É possível afirmar que o controle do TDC nos reatores semi-contínuos não acarretou perda de lodo, e conseqüentemente, não interferiu na produção de H₂.

Além disso, ressalta-se que os reatores contínuos continham concentrações de SVT consideráveis no líquido e no meio suporte. Além disso, em ambas as condições, nota-se que nos reatores alimentados com maior concentração de glicerol afluente, a concentração de biomassa foi mais elevada.

De acordo com Barros et al (2010), a formação de biofilmes é afetada por vários fatores externos, incluindo a composição e a concentração da alimentação, a velocidade de escoamento da fase líquida (tensão de cisalhamento), a concentração de partículas, as colisões entre partícula-partícula e entre partículas e paredes. Além disso, a natureza e as concentrações dos substratos podem afetar o crescimento e a composição do biofilme.

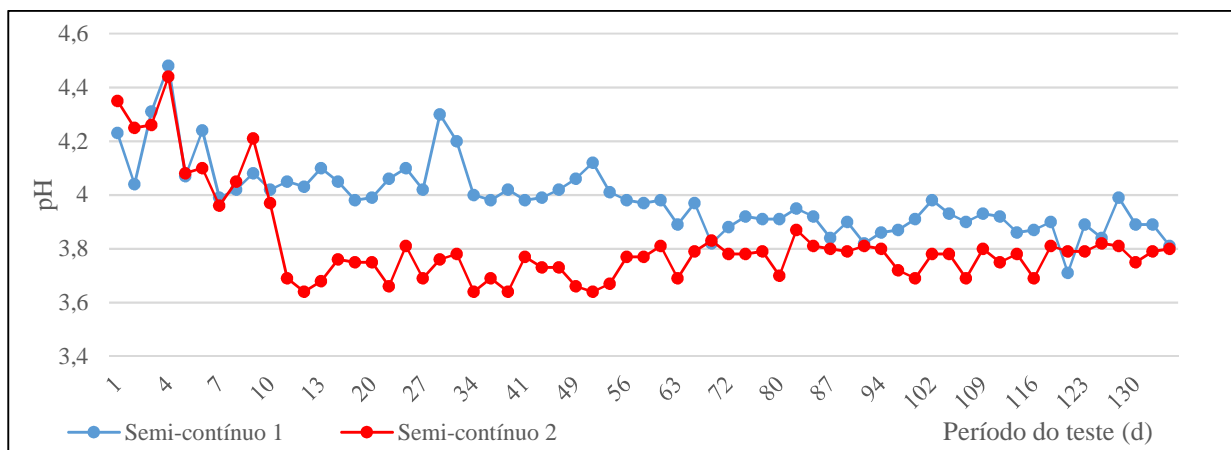
Ainda conforme os autores supracitados, em elevadas cargas de substrato, a acumulação de biofilme é mais elevada. A presença de excesso de carbono disponível e limitações em outros nutrientes (como nitrogênio, potássio ou fosfato) pode favorecer a produção de substâncias poliméricas celulares, ao invés de formação de células, o que conseqüentemente afeta a concentração de biomassa ativa.

Acredita-se que o excesso de células em reatores com biomassa aderida pode afetar negativamente o seu desempenho. Segundo trabalho realizado por Peixoto et al (2011) foi verificado que, com a redução de espaços vazios no material suporte, causada pelo excesso de biomassa presente, foram obtidos níveis de CO₂ acima de 90% no biogás. Além disso, também foi constatado aumento da concentração de ácido propiônico e inibição da produção de H₂, possivelmente causada por mudanças nas rotas metabólicas dos microrganismos.

5.2.1.3 pH

Os dados de pH obtidos durante o monitoramento dos reatores semi-contínuos podem ser visualizados no Gráfico 11. Observa-se queda dos valores deste parâmetro depois da primeira semana de operação.

Gráfico 11: pH verificado durante a operação dos reatores semi-contínuos 1 e 2, durante período experimental.

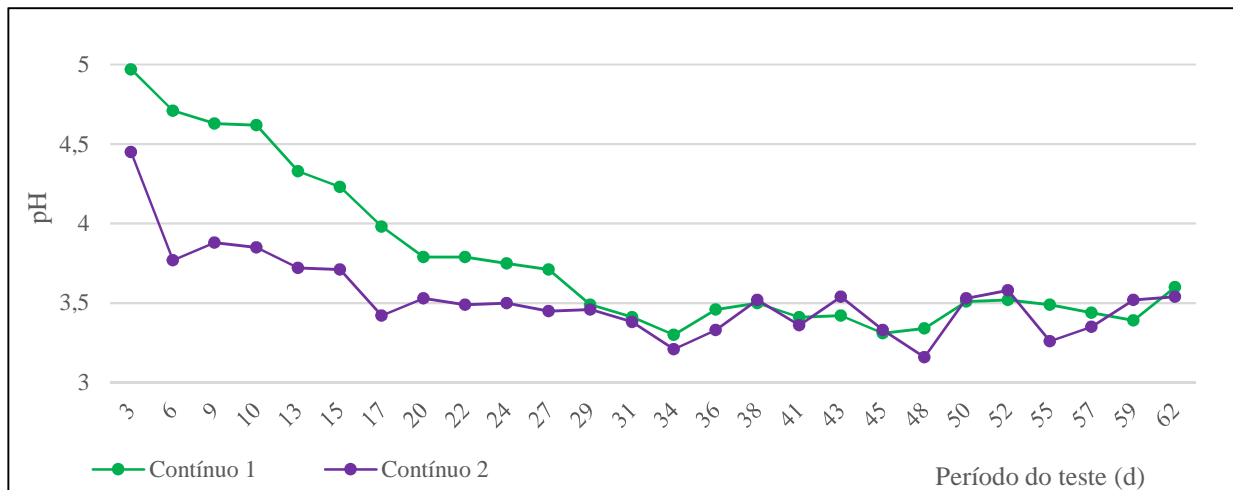


Fonte: a autora

O pH do RSC1 manteve-se na faixa de 4,0 a 4,2 até o 60º dia. Após este período, foi observada discreta queda do valor, obtendo valores abaixo de 4,0 até o final do teste. Já o RSC2 apresentou pH de 3,6 a 3,9 durante todo o experimento.

Nos reatores contínuos, o valor de pH apresentou queda durante a sua operação, conforme mostrado no Gráfico 12. Já na primeira semana, no reator 2 foi constatado pH abaixo de 4. No reator 1, esta condição foi alcançada após a segunda semana.

Gráfico 12: pH medido nos reatores contínuos 1 e 2 no decorrer do teste.



Fonte: a autora

Ressalta-se que após 15 dias de operação, o pH do reator contínuo 2 foi de 3,5, e até o final do experimento, este parâmetro se manteve igual ou menor do que o valor descrito. Já no RC1, esta mesma situação foi verificada após 30 dias.

Como não foi verificada grande variabilidade dos resultados, para o pH não foi realizada a análise sob a forma de *Boxplot*, apenas valor médio e seu respectivo desvio padrão, valores máximos e mínimos, conforme mostrado na Tabela 12. Os valores máximos foram 4,48 e 4,44, nos reatores semi-contínuos 1 e 2 respectivamente. Já nos contínuos os máximos encontrados foram de 4,97 no RC1 e 4,45 no RC2. No RSC1, o valor mínimo de pH foi de 3,71 e no RSC2, 3,64. O valor mínimo do pH no RC1 foi de 3,30 e no RC2 igual a 3,16.

Tabela 12: Valores médios, máximos e mínimos de pH encontrados durante a operação dos reatores semi-contínuos e contínuos.

	Semi-contínuo 1	Semi-contínuo 2	Contínuo 1	Contínuo 2
Média	3,98 ± 0,13	3,81 ± 0,17	3,77 ± 0,49	3,53 ± 0,26
Máximo	4,48	4,44	4,97	4,45
Mínimo	3,71	3,64	3,30	3,16

Fonte: a autora

Ainda conforme a Tabela 12, verifica-se que o valor médio de pH no reator semi-contínuo 1 foi $3,98 \pm 0,13$, e no reator semi-contínuo 2 de $3,81 \pm 0,17$. No reator contínuo 1, o valor médio foi de $3,77 \pm 0,49$, e no reator contínuo 2 de $3,53 \pm 0,26$.

Conforme Arimi et al (2015), o pH da fermentação é um dos fatores que influencia o rendimento energético e crescimento da biomassa. Este parâmetro também está relacionado às rotas de degradação que determinam os ácidos voláteis associados ao processo. Ren et al (2007) citam que, em operação contínua, os produtos formados são dependentes do pH do meio reacional. Em pH maior do que 6 e menor do que 4,5, os produtos preferenciais formados são ácido propiônico e etanol, respectivamente. Já o ácido butírico é formado em pH de 5,5.

De acordo com De Sá, Cammarota & Ferreira-Leitão (2014), o pH ótimo em termos de produção de H_2 se encontra na faixa de 5 a 7. Ginkel & Sung (2001) e Khanal et al (2004) também relacionam os melhores rendimentos de produção deste gás em torno de 5,5.

Corroborando os autores supracitados, Silva-Illanes et al (2015) citam em seu trabalho que o melhor pH para produção concomitante de H_2 e etanol é de 5,5. Os autores testaram os pH entre 5,5 a 6,5, utilizando glicerol como substrato, lodo anaeróbico como inóculo e CSTR.

No entanto, Lo et al (2013) relatam elevada produção de H_2 em CSTR sem o controle de pH, seja no início ou durante a operação do reator. Foi utilizado glicerol puro e bruto como substrato orgânico, e a cepa *Clostridium pasteurianum* CH4 como inóculo.

Neste trabalho, para determinação do pH ótimo para produção de H_2 , seria necessário a condução de testes em batelada preliminares, testando diferentes faixas de pH. Após isso, durante a operação de reatores contínuos, o monitoramento e o controle deste parâmetro durante o processo fermentativo deveria ser constante.

Como o objetivo foi avaliar o potencial de produção de H_2 a partir da operação semi-contínua, e contínua para comparação, optou-se por escolher a melhor faixa inicial descrita pela literatura, de 5,5 a 6. Durante a operação dos reatores, foi verificado o pH inicial, afluente aos reatores e, caso necessário, realizar-se-ia o ajuste. Contudo, como a mistura do meio nutricional e glicerol já resultava na faixa de pH escolhida para trabalho, o ajuste não foi realizado.

Em geral, duas constatações relacionadas ao pH devem ser ressaltadas. A primeira é que foi observada queda dos seus valores nos reatores operados com menor concentração de substrato (RSC1 e RC1) após determinado período (60 e 30 dias, respectivamente). Nos reatores com maior concentração de substrato (RSC2 e RC2), os menores valores de pH foram alcançados em menor tempo, próximo a 15 dias.

Já a segunda constatação está relacionada ao valor de pH com a concentração de substrato inserida. Quando utilizada maior concentração de glicerol, menor foi o pH observado.

Segundo Sarma et al (2013), as concentrações de glicerol empregadas têm interferência direta no pH do meio reacional. Na ausência de fonte carbonácea disponível em excesso, os ácidos produzidos são consumidos, evitando a queda brusca do pH. Já em maiores concentrações de glicerol afluyente, a formação de outros produtos finais é favorecida, o que também resulta no menor rendimento de H₂.

Desta forma, ressalta-se que o menor valor de pH pode afetar o processo, já que, conforme Zhang et al (2007), a atividade da hidrogenase, enzima que catalisa a produção de H₂ é inibida. Já Reis (2010) cita que a queda no pH pode acarretar desequilíbrio no balanço fisiológico da célula dos microrganismos, devido à penetração de ácidos na membrana celular.

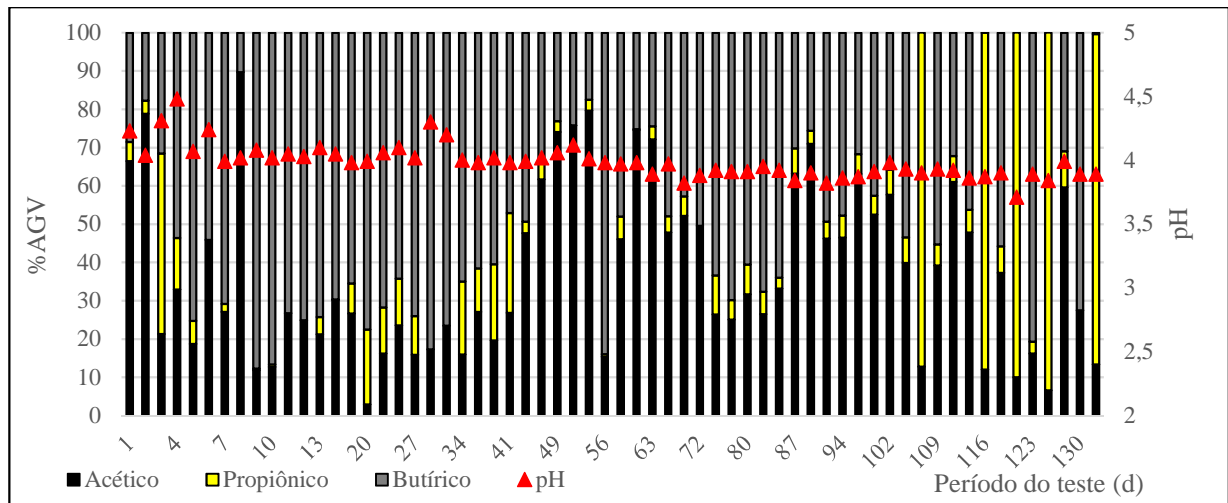
No presente trabalho, ainda com interferência nos resultados, o controle do pH durante a fermentação não foi realizado. O mesmo implicaria infraestrutura básica indisponível, como automação para a sua medição, bem como a inserção de ácido e base, sem comprometer o volume útil de trabalho.

5.2.1.4 Ácidos graxos voláteis

A comparação dos regimes operacionais testados em relação aos seus desempenhos na produção de H₂ também foi realizada analisando-se os AGV produzidos, a partir da sua distribuição mássica (%), bem como pelo grau de acidificação. Este último relaciona as concentrações de AGV produzida e de substrato afluyente, ambos sob a forma de DQO.

A distribuição mássica dos AGV, relacionada com o pH, encontrada durante o período experimental do reator semi-contínuo 1 pode ser visualizada no Gráfico 13. Comparando o pH com a presença dos AGV, percebe-se que não há relação clara entre os parâmetros, já que a composição dos ácidos não segue uma tendência definida.

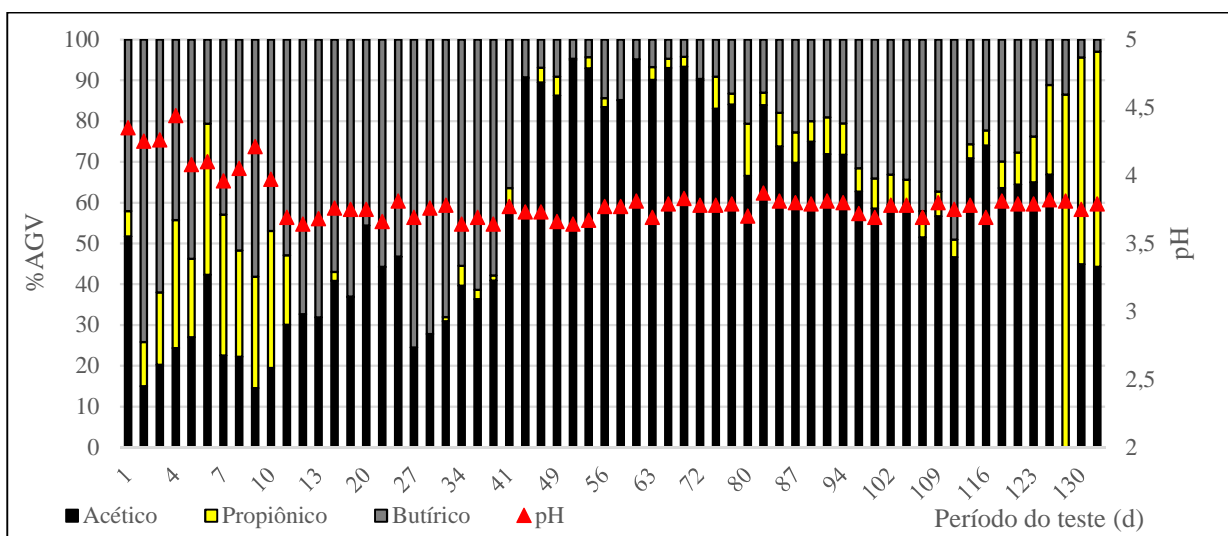
Gráfico 13: Distribuição mássica dos ácidos graxos voláteis durante o monitoramento do reator semi- contínuo 1, relacionada com o pH.



Fonte: a autora

A partir da análise do Gráfico 13 mostrado acima, verifica-se predominância dos ácidos acético e butírico durante o experimento, exceto a partir do 100º dia de operação, com maior proporção de ácido propiônico. O Gráfico 14 mostra a distribuição mássica dos AGV durante a operação do reator semi-contínuo 2.

Gráfico 14: Distribuição mássica dos ácidos graxos voláteis durante o monitoramento do reator semi-contínuo 2, relacionada com o pH.

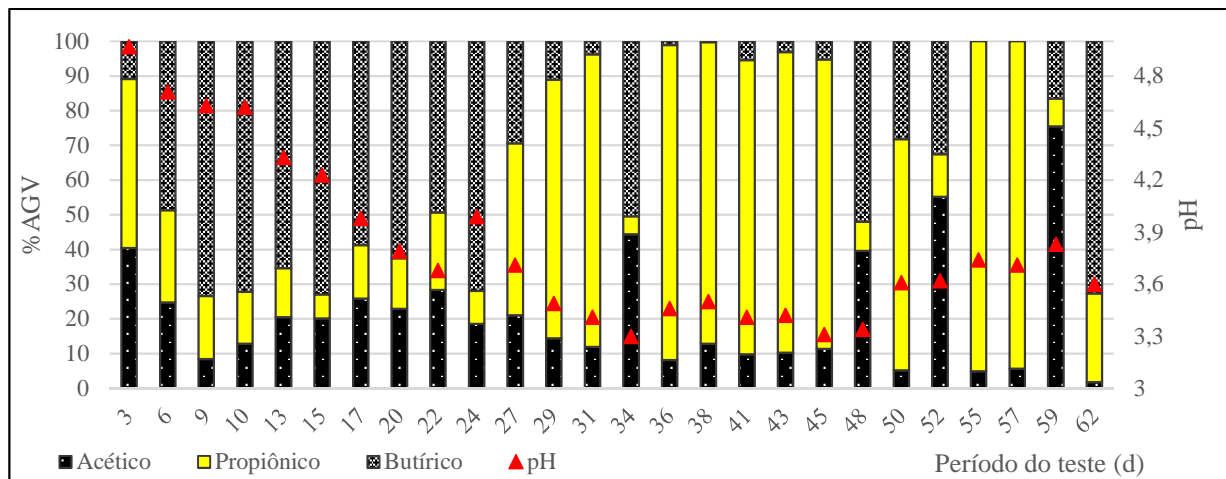


Fonte: a autora

Observa-se que o ácido predominante durante a operação do reator semi-contínuo 2 foi o acético, seguido pelo butírico, e por último, o propiônico. Bem como no gráfico anterior, a distribuição mássica de AGV do RSC2 não apresenta uma tendência da proporção de ácidos encontrada conforme o pH.

A distribuição mássica dos AGV detectados no monitoramento do reator contínuo 1 está mostrada no Gráfico 15.

Gráfico 15: Distribuição mássica dos ácidos graxos voláteis durante o monitoramento do reator contínuo 1, relacionada com o pH.

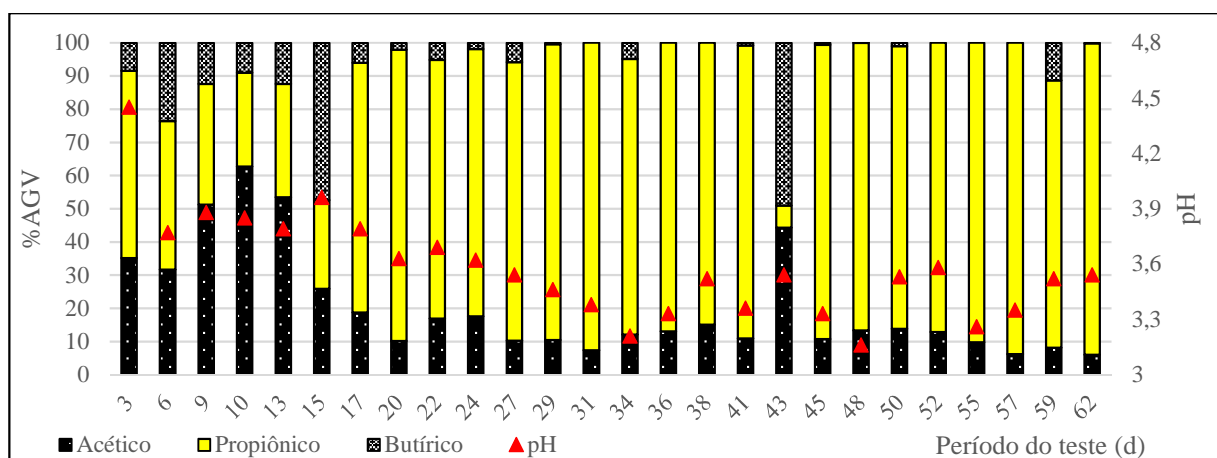


Fonte: a autora

No RC1, percebe-se predominância de ácido propiônico, seguido de butírico. O ácido acético foi encontrado em menor proporção das amostras analisadas deste reator. Ao contrário dos reatores semi-contínuos, verificou-se tendência de queda do pH quando houve modificação no teor dos AGV, de butírico para propiônico, sendo mais pronunciada a partir do 20º dia de operação. Isto pode ser um indicativo de modificação de rota metabólica ou da composição dos microrganismos presentes.

No Gráfico 16 está mostrada a distribuição mássica dos AGV presentes no reator contínuo 2, durante o período de operação.

Gráfico 16: Distribuição mássica dos ácidos graxos voláteis durante o monitoramento do reator contínuo 2, relacionada com o pH.



Fonte: a autora

O Gráfico acima mostra que, durante a operação do RC2, o ácido propiônico foi predominante durante todo o período do teste. O segundo ácido mais encontrado foi o acético, e por fim, o butírico. Também se percebe o menor valor de pH quando o ácido propiônico está presente em maior proporção, como foi verificado no RC1.

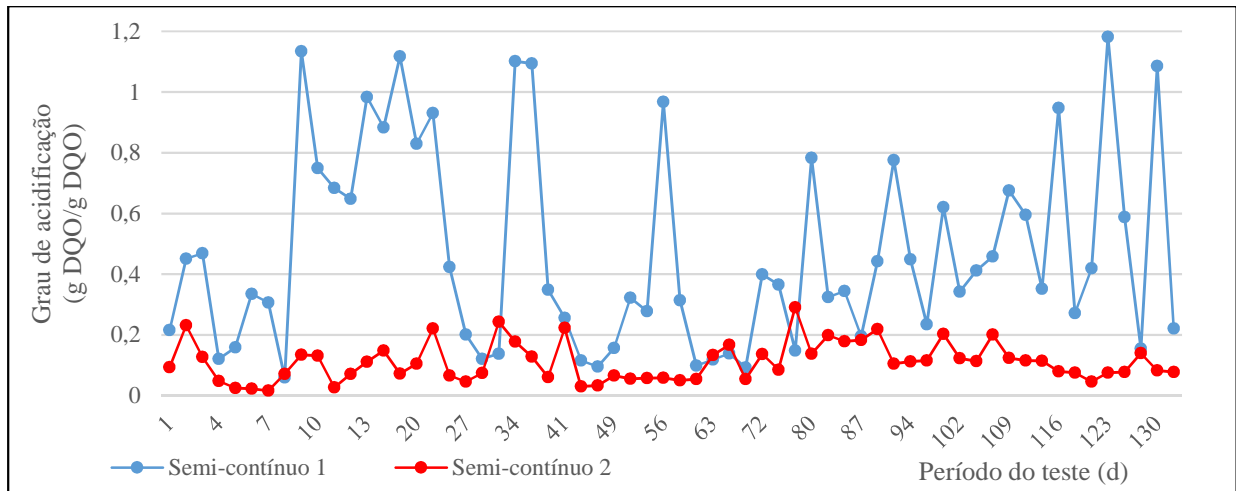
Como mencionado no Referencial Teórico deste trabalho, a produção máxima teórica é relacionada à formação de ácido acético (3 mols H_2 /mol glicerol), seguido de ácido butírico (2 mols H_2 /mol glicerol), butanol (2 mols H_2 /mol glicerol) e etanol (1 mol H_2 /mol glicerol). Cabe ressaltar que a produção de ácido propiônico e 1,3-PD não gera H_2 .

Sendo assim, a partir da análise das proporções dos AGV encontradas, duas condições distintas são identificadas. Nos reatores semi-contínuos, em que os ácidos majoritários são o acético e butírico, em ambas concentrações de glicerol testadas (10 e 50 g/L), a formação de H_2 é favorecida.

Já nos reatores contínuos, os primeiros 20 dias de operação do RC1 puderam ser relacionados à produção de H_2 , e após este período, devido ao maior teor de ácido propiônico observado, menor produção deste gás foi esperada. O mesmo não foi verificado no RC2, em que houve predominância deste ácido durante todo o experimento. Assim, já foi possível prever a não geração de H_2 .

O grau de acidificação no regime semi-contínuo pode ser visualizado no Gráfico 17. Percebe-se grande variação dos valores correspondentes ao reator 1, desde 0,05 até 1,18. Já o reator 2 obteve valores abaixo de 0,3 em todo o período operacional.

Gráfico 17: Grau de acidificação verificado durante o monitoramento dos reatores semi-contínuos 1 e 2.

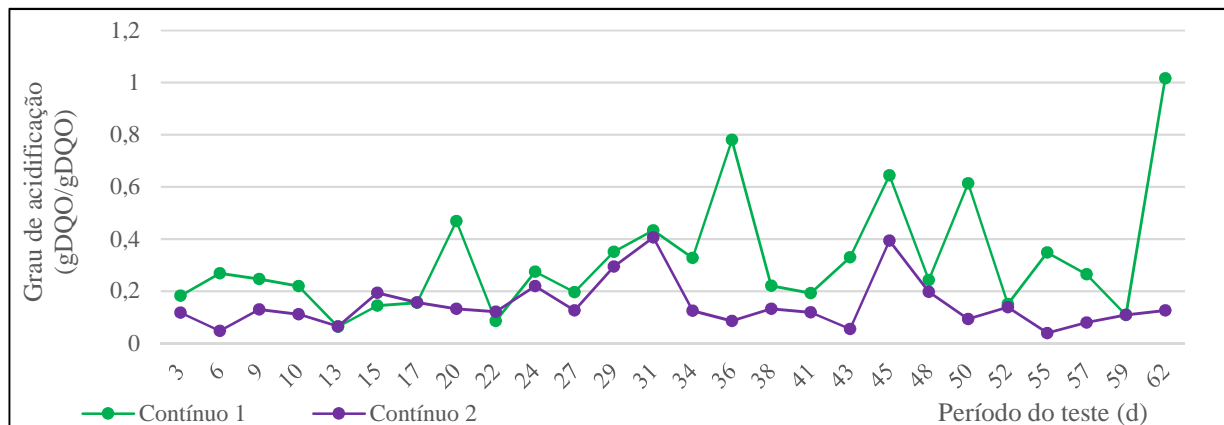


Fonte: a autora

O Gráfico 17 acima mostra a parcela do glicerol afluyente convertida à AGV. É possível verificar que a maior acidificação ocorre no reator 1, em que é aplicada a menor concentração e COV. Já no reator 2, a elevada concentração de glicerol resultou em menor conversão do glicerol em ácidos.

Nos reatores contínuos, o grau de acidificação variou de 0,06 a 1,01 no RC1, e abaixo de 0,4 no RC2, ao longo do experimento, como pode ser visualizado no Gráfico 18.

Gráfico 18: Grau de acidificação verificado durante o monitoramento dos reatores contínuos 1 e 2.

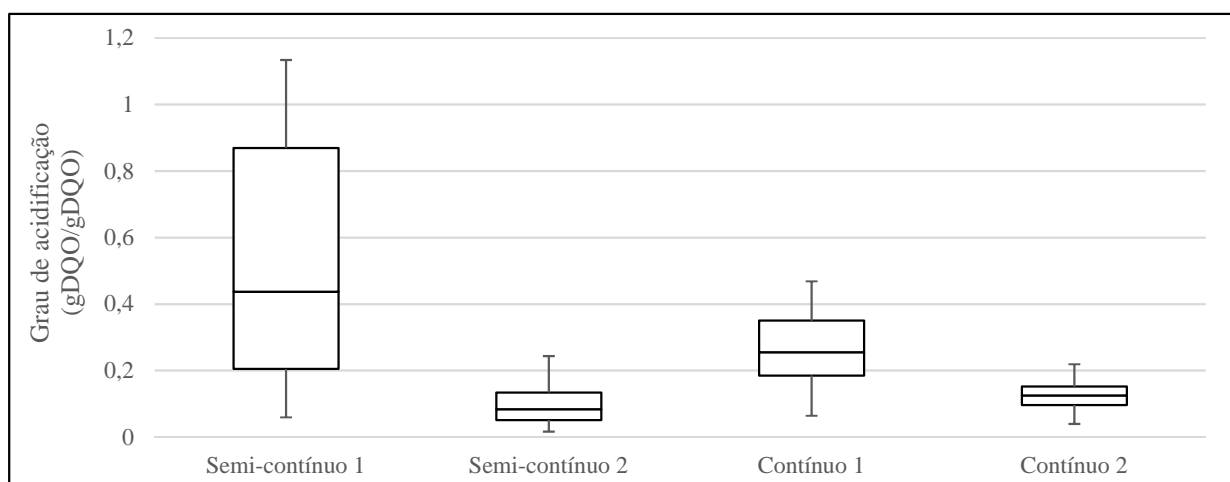


Fonte: a autora

A constatação realizada para os reatores semi-contínuos, em relação à concentração glicerol afluyente e acidificação, também é válida para os reatores contínuos. A maior produção de ácidos nos reatores contínuos está relacionada à menor concentração de glicerol afluyente.

Para melhor avaliação dos resultados, devido à grande variação dos mesmos, optou-se por realizar o Gráfico 19, o *Boxplot* comparativo dos dois reatores e os dois regimes operacionais testados.

Gráfico 19: *Boxplot* dos dados de grau de acidificação dos reatores semi-contínuos e contínuos.



Fonte: a autora

A partir da análise da distribuição dos dados sob a forma de *Boxplot*, é possível observar a grande variação dos resultados referentes ao grau de acidificação no reator semi-contínuo 1. A este reator também é atribuída a maior acidificação (referente aos ácidos analisados) com mediana de 45%, e quartil superior de 88%. Já no reator semi-contínuo 2, verifica-se mediana de aproximadamente 10%, e quartil superior de 15%.

Em relação aos reatores contínuos, também se verifica que no reator 1, em que foi inserida a menor concentração de glicerol, apresentou maior acidificação. As medianas são de 25% e 17%, respectivamente para RC1 e RC2. Já os quartis superiores foram de 35% e 18%.

O grau de acidificação obtido por Lo et al (2013) foi 0,44, utilizando glicerol puro e 0,54, utilizando glicerol bruto. Os autores avaliaram CSTR para produção de H₂, utilizando a cepa *Clostridium pasteurianum* CH4 como inóculo e ambos os substratos na concentração de 10 g/L. Já a proporção dos produtos majoritários encontrados, quando empregado o glicerol

bruto, foi 1,3-PD e butanol, cada qual na proporção de 23,5% da concentração afluyente de glicerol. Já em relação aos AGV, o mais abundante foi o ácido butírico, correspondendo a 16,6%, láctico em 14,9% e o acético, com 4,1%.

Reungsang, Sittijunda & O-Thong (2013), utilizando *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 imobilizada como inóculo em reator UASB, COV operado com de 37,5; 50 e 62,5 g/L verificaram maior produção de 1,3-PD e etanol como produtos finais, a partir da fermentação do glicerol bruto. Foi constatado que a maior proporção de 1,3-PD foi obtida na menor COV, e já etanol, na carga intermediária. Em relação aos ácidos produzidos, a proporção dos ácidos em relação à DQO afluyente nas respectivas cargas foram de 16,2; 11,8 e 12,8%. Na maior e menor carga, os ácidos propiônico e butírico foram majoritários, respectivamente.

Em AnSBBR, empregado por Moncayo Bravo et al (2015) para avaliar a produção de H₂ com glicerol bruto como substrato e lodo anaeróbico como inóculo, na COV de 12,8 g/L.d, foi verificada predominância de ácido acético, correspondendo a 42% dos intermediários formados. Em seguida, foram encontrados ácido propiônico (23%), etanol (22%) e ácido butírico (4%).

No trabalho de Sarma et al (2015), a produção semi-contínua de H₂ foi testada empregando glicerol bruto e o inóculo *Enterobacter aerogenes* NRRL B-407. Os autores realizaram duas bateladas, de 40 e 64h, utilizando glicerol bruto nas concentrações de 60 e 120 g/L, respectivamente. Na primeira batelada, os subprodutos foram acetona (4,9 mg/L), butanol (10,61 mg/L) e o composto predominante, etanol (317,03 mg/L). Na segunda batelada, também encontraram acetona (3,43 mg/L) e butanol (4,61 mg/L), contudo, maior quantidade de etanol (599,22 mg/L) foi produzida. Os autores ainda afirmam que a concentração de substrato é o parâmetro que determina a quantidade e o tipo de intermediários durante a produção fermentativa de H₂, pois pode alterar o balanço redox do meio.

Desta forma, percebe-se que quando o glicerol é utilizado como substrato, outros intermediários são formados, além dos ácidos analisados no presente trabalho. Infelizmente, os mesmos não puderam ser avaliados devido à falta de infraestrutura do laboratório onde a pesquisa foi realizada.

Foi possível verificar que a maior produção de ácidos está relacionada com a menor concentração afluyente de glicerol aplicada. Conforme Chookaew, O-Thong & Prasertsan (2014), quando o glicerol está presente em excesso, há maior tendência de formação de 1,3-PD

do que H_2 . Sendo assim, os produtos que induzem a produção concomitante de H_2 , como os AGV avaliados, não são gerados.

Jitrwung & Yargeau (2015) avaliaram a produção de H_2 e etanol, utilizando CSTR, glicerol bruto e *Enterobacter aerogenes* como inóculo. Foi verificado que o aumento da concentração de glicerol reduz a sua conversão, resulta em concentrações elevadas de biomassa e de intermediários como 1,3-PD e 1-propanol, e acarreta baixo rendimento de H_2 e seus produtos relacionados. Os autores sugerem que isso ocorra devido à inibição causada pelo substrato ou então pelos efeitos negativos causados pelos constituintes do glicerol bruto.

Sendo assim, de acordo com os autores supracitados, duas possibilidades podem estar relacionadas aos valores de acidificação observados. Uma é a produção de outros intermediários, como o 1,3-PD e álcoois, principalmente quando a maior concentração de glicerol foi utilizada. A outra é devido à inibição causada pelas impurezas presentes no glicerol, bem como constatado no item anterior, referente à conversão do substrato.

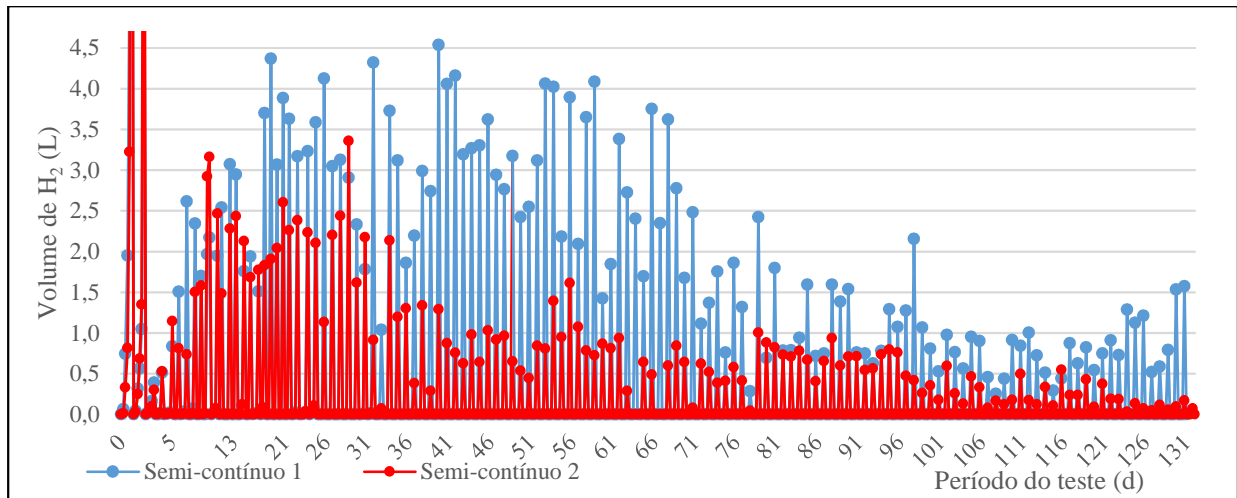
Mesmo com a formação de outros intermediários, considera-se que os valores do grau de acidificação obtidos no reator semi-contínuo 1 são satisfatórios, quando comparados com os valores citados na literatura.

5.2.2 Volume de H_2

Os resultados referentes ao volume máximo de H_2 produzido diariamente, nos reatores semi-contínuos 1 e 2, podem ser visualizados no Gráfico 20. Os valores obtidos dos dois primeiros dias foram elevados, e por isso não podem ser visualizados na escala utilizada do Gráfico. No primeiro dia de operação, no RSC1 foi constatada a produção de 11,7 L e no RSC2, de 14,6 L. Já no segundo dia, RSC1 de 6,6 L e RSC2 com 9,5 L.

A partir da análise do Gráfico 20 também pode-se observar que, além dos valores relatados, nos primeiros 60 dias de operação foi verificado maior volume de H_2 e após este período, tendência de diminuição, em ambos os reatores. Percebe-se maior produção de H_2 no RSC1, alimentado com a menor concentração de glicerol, durante todo o período operacional.

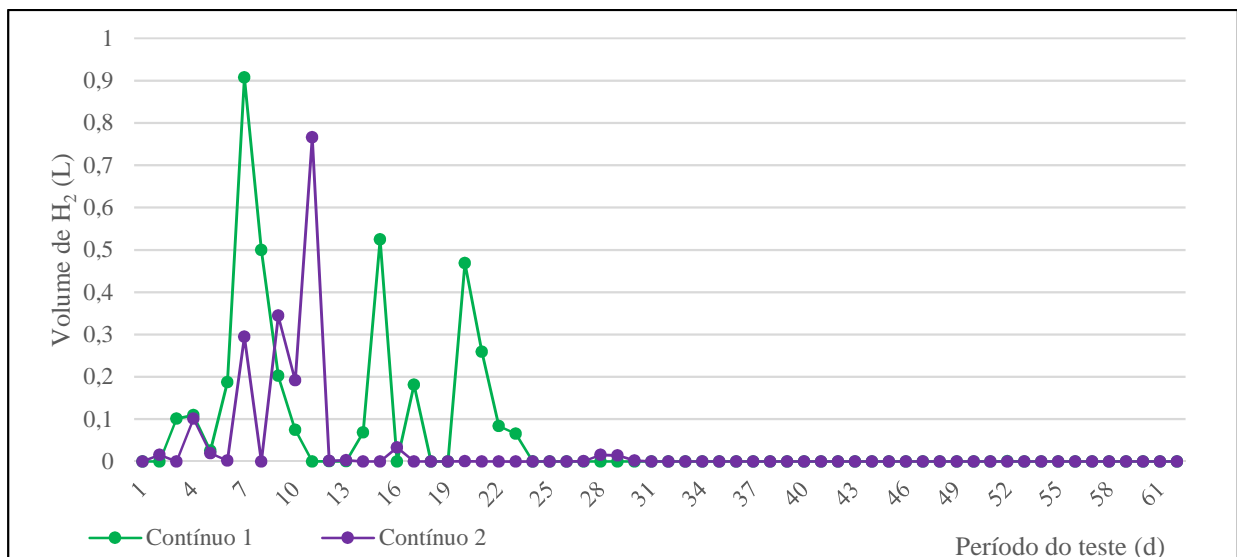
Gráfico 20: Volume (L) máximo de H₂ produzido diariamente durante a operação dos reatores semi-contínuos 1 e 2.



Fonte: a autora

Já a produção de H₂ nos reatores contínuos está mostrada no Gráfico 21. A produção de H₂ máxima foi de 907 mL no RC1 e 765 mL no RC2. O reator 1 não apresentou produção de gás a partir do 25º dia e no reator 2 a partir do 13º dia de operação.

Gráfico 21: Produção de H₂ diária durante a operação dos reatores contínuos 1 e 2.

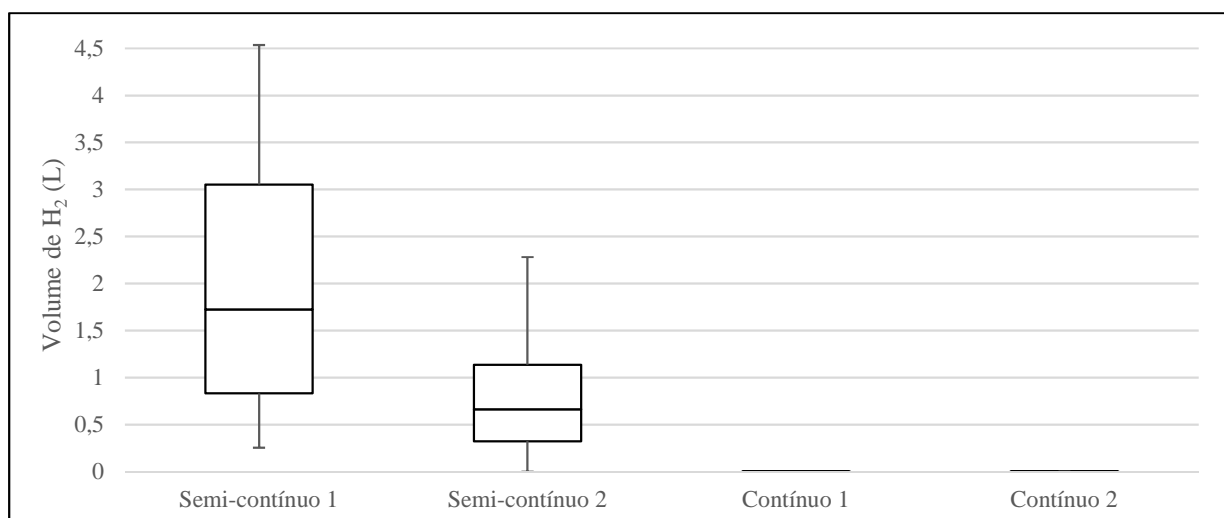


Fonte: a autora

O gráfico acima também mostra maior produção de H₂ no reator 1, alimentado com menor concentração de glicerol. O *Boxplot*, mostrado no Gráfico 22, foi realizado a fim de

comparar os valores entre quartis e medianas nos reatores, conforme os regimes operacionais propostos.

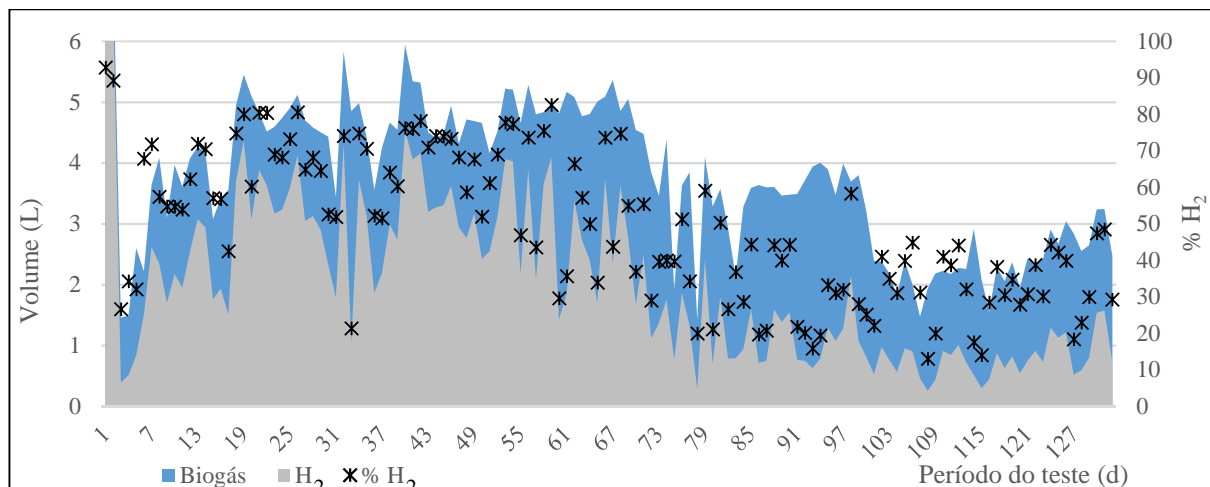
Gráfico 22: *Boxplot* dos resultados de volume de H₂ obtidos durante a operação dos reatores semi-contínuos e contínuos.



Fonte: a autora

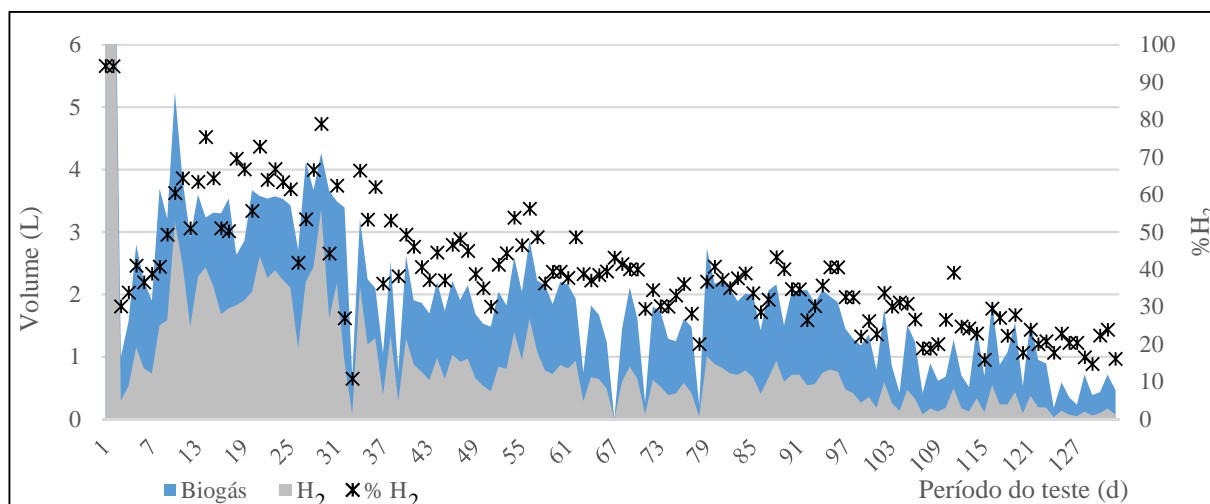
Percebe-se que houve grande variação dos valores de volume de H₂ obtidos no RSC1, com mediana de 1,75 L e em RSC2, de 0,7 L. O quartil superior, referente aos 25% dos resultados com valores mais elevados, foi 3 L, para RSC1, e 1,2 para RSC2. Já o quartil inferior, correspondente a 25% dos dados com menores valores, é 0,8 L para RSC1 e 0,3 L para RSC2. Os resultados do volume de H₂ produzido nos reatores contínuos, como foram baixos, não aparecem no *Boxplot* acima.

Já a proporção de H₂ no biogás no reator semi-contínuo 1 pode ser visualizada no Gráfico 23. Nos dois primeiros dias de operação, a porcentagem de H₂ no biogás produzido foi superior a 90%, e apresentou decréscimo nos dias subsequentes.

Gráfico 23: Proporção de H_2 no biogás durante a operação do fermentador semi-contínuo 1.

Fonte: a autora

A proporção de H_2 no biogás produzido durante a operação do reator semi-contínuo 2 está mostrada no Gráfico 24. O reator 2 também apresentou valores de porcentagem de H_2 acima de 90% nos dois primeiros dias, bem como verificado no RSC1. Tanto os volumes como as porcentagens de H_2 obtidos nos primeiros dias de operação em ambos os reatores semi-contínuos foram considerados demasiadamente elevados, quando comparados com os obtidos na literatura. Sendo assim, recomenda-se que um novo experimento seja realizado a fim de validá-los.

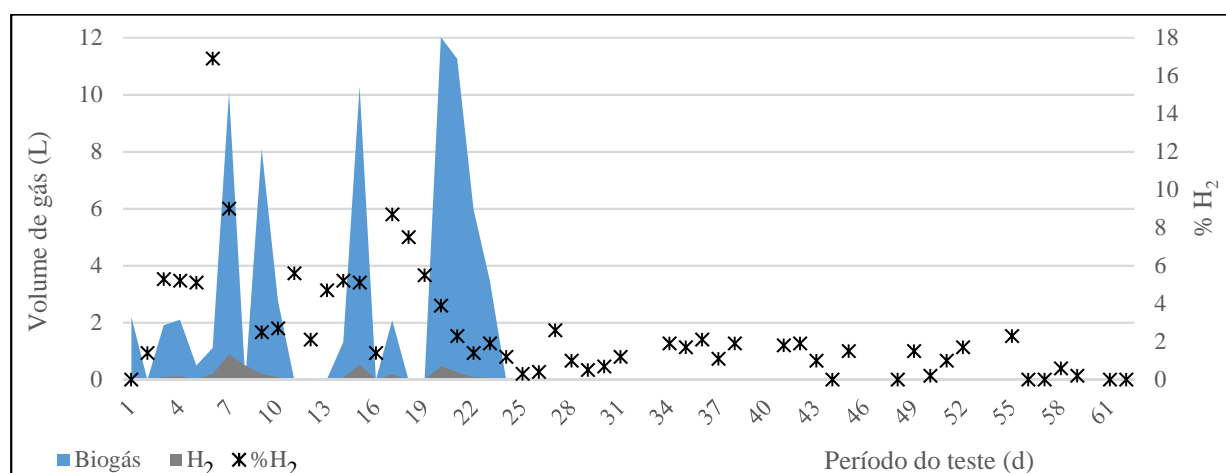
Gráfico 24: Proporção de H_2 no biogás gerado durante a operação do fermentador semi-contínuo 2.

Fonte: a autora

É possível verificar, a partir da observação dos Gráficos 23 e 24, a menor produção, tanto de biogás como de H_2 , no fermentador semi-contínuo 2. Também se observa tendência de queda de produção, tanto de biogás, como de H_2 no decorrer do teste, em ambos reatores.

O Gráfico 25 mostra a proporção de H_2 durante a operação do reator contínuo 1. É possível verificar que a porcentagem máxima encontrada deste gás é de 17%, no 7º dia de operação. Após o 20º dia, são encontrados valores abaixo de 2%, até o final do teste.

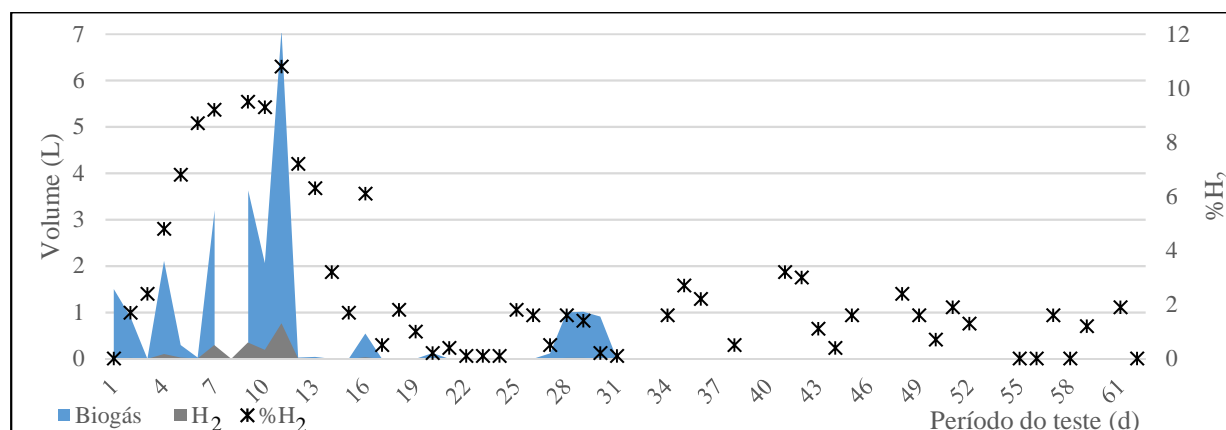
Gráfico 25: Proporção de H_2 gerado no reator contínuo 1, durante o experimento.



Fonte: a autora

A proporção de H_2 no reator contínuo 2 pode ser visualizada no Gráfico 26. O percentual máximo encontrado foi de 10,8%, no 12º dia. A partir do 17º dia, os valores foram inferiores a 4%.

Gráfico 26: Proporção de H_2 gerado no reator contínuo 2, no decorrer do teste.

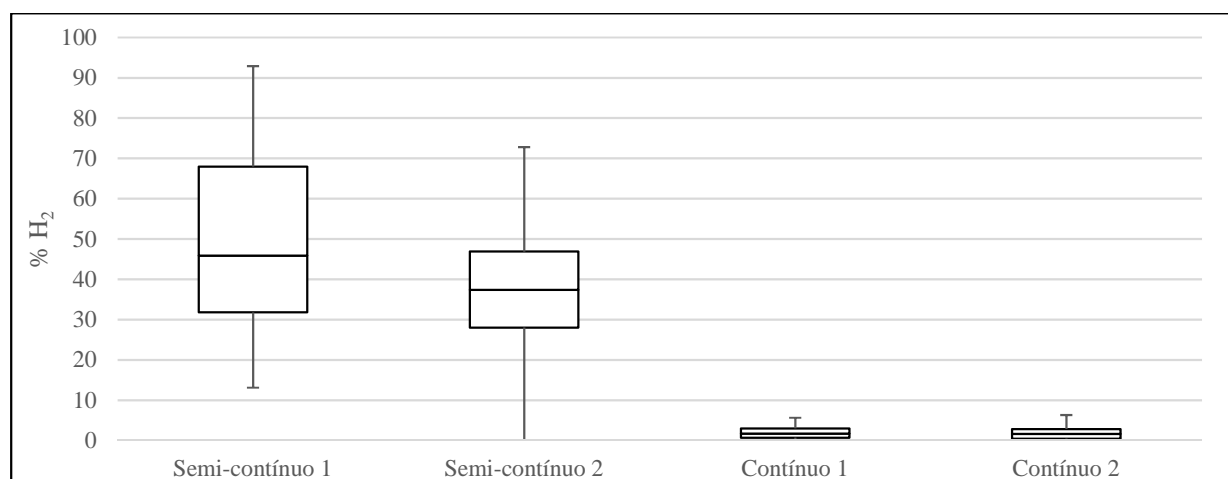


Fonte: a autora

Nos Gráficos 25 e 26 foram verificados teores de H_2 mas sem volume registrado deste gás. É importante ressaltar que a detecção de H_2 em ambos os reatores contínuos foi realizada pela análise cromatográfica, contudo, não houve volume suficiente de gás para que o mesmo fosse contabilizado pelos medidores de vazão empregados.

Também foi elaborado Gráfico *Boxplot* (Gráfico 27) para análise dos dados de porcentagem de H_2 no biogás produzido pelos reatores, já que houve grande variação dos mesmos. Verifica-se que a mediana no RSC1 é 46%, e em RSC2 38%. Já nos reatores contínuos, os valores da mediana e dos quartis superior e inferior encontram-se abaixo de 5%.

Gráfico 27: *Boxplot* dos valores de porcentagem de H_2 no biogás dos reatores semi-contínuos e contínuos.



Fonte: a autora

O Gráfico 27 acima também permite visualizar o quartil superior, de 69% para RSC1 e 48% para RSC2. Já como quartil inferior, 31% em RSC1 e 29% para RSC2.

Para comparação dos resultados obtidos durante a operação dos dois regimes operacionais empregados, foram avaliadas pesquisas que empregaram glicerol como substrato orgânico em processos contínuos, utilizando os principais modelos de reatores descritos na literatura.

Ferreira (2014) avaliou o efeito do TDH (1 a 14h) em reator anaeróbico de leito fluidizado (RALF), com glicerol bruto na concentração de 5 g/L. O inóculo foi oriundo de reator UASB, e o sistema operou a temperatura de 55°C. A porcentagem de H_2 no biogás em função do TDH se manteve em cerca de 60% em todos os tempos testados, obtendo o mínimo de 50%, no TDH de 10h e máximo de 70% no TDH de 1h.

Nazareth (2015) avaliou a produção de H₂ e outros metabólitos, utilizando glicerol bruto como fonte carbonácea, também empregando RALF e lodo de reator UASB como inóculo, operados com TDH de 0,5 a 8h. Conforme a autora, o percentual máximo obtido foi atingido no TDH de 0,5h, de 81,2%.

Lo et al (2013) testaram um CSTR para avaliação da produção de H₂ utilizando glicerol puro e bruto como substrato orgânico, e a cepa *Clostridium pasteurianum* CH4 como inóculo. As condições empregadas foram: temperatura de 35 °C, TDH de 12 h, sem controle de pH, e concentração de glicerol, puro e bruto, de 10 g/L. Quando o glicerol puro foi utilizado, a porcentagem média de H₂ no biogás foi de 78,3%, e o bruto 72,7%.

Já no trabalho de Chookaew, O-Thong & Prasertsan (2014) foi operado um reator UASB com a cepa *Klebsiella sp.* TR17, na temperatura de 40°C, pH de 8,0 e TDH de 2 a 12 h e concentração de glicerol de 10 a 30 g/L. Os autores verificaram que, no TDH de 4h, o aumento da concentração de glicerol de 10, 20 a 30 g/L não apresentou diferença significativa no conteúdo de H₂ no biogás, com valores de 42, 46 e 43%, respectivamente.

Reungsang, Sittijunda & O-Thong (2013) utilizaram reator UASB para produção de H₂ a partir de glicerol, puro e bruto, utilizando *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 imobilizada. Foram avaliadas as COV de 25; 37,5; 50; 62,5 e 75 g/L.d. Segundo os autores, a melhor COV aplicada foi de 50 g/L.d, alcançando porcentagem máxima de H₂ no biogás de 37,1%, utilizando glicerol puro, e 24,2% para glicerol bruto.

Lovato et al (2015) testaram AnSBBR para produzir H₂ a partir de glicerol puro, aplicando COV de 7,7 a 17,1 g DQO/L.d, a partir da variação da concentração afluenta (3, 4 e 5 g/L) e período de ciclo (3 e 4 h). Também foi utilizado glicerol bruto, apenas na concentração de 5 g/L e TDH de 3h, resultando em COV de 17,1 g DQO/L.d. Verificaram que o aumento da concentração afluenta de glicerol puro e diminuição do tempo de ciclo favoreceu a produção de H₂, obtendo a maior porcentagem de 68%, quando a COV 17,1 g/L.d foi utilizada.

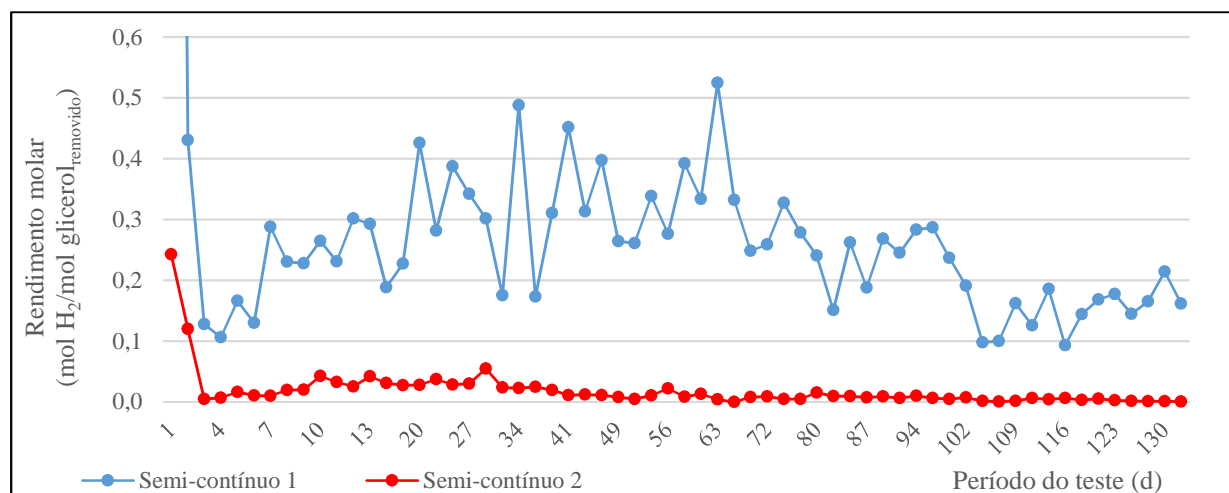
Os valores de porcentagem de H₂ obtidos no presente trabalho variaram de 10 a 80% em ambos os reatores, e a média encontrada durante o experimento, RSC1 com 48,8% e RSC2 com 39,2%, está de acordo com os descritos pela literatura, conforme autores supracitados.

Além do volume e porcentagem de H₂ no biogás, também foram calculados o rendimento molar, bem como a produtividade volumétrica e específica, para avaliação dos resultados obtidos. Os mesmos são apresentados a seguir.

5.2.3. Rendimento molar

O rendimento molar ($\text{mol H}_2/\text{mol glicerol}_{\text{removido}}$) verificado durante a operação dos reatores semi-contínuos pode ser visualizada no Gráfico 28.

Gráfico 28: Rendimento molar obtido durante a operação dos fermentadores operados de forma semi-contínua, nas concentrações de 10 e 50 g/L.



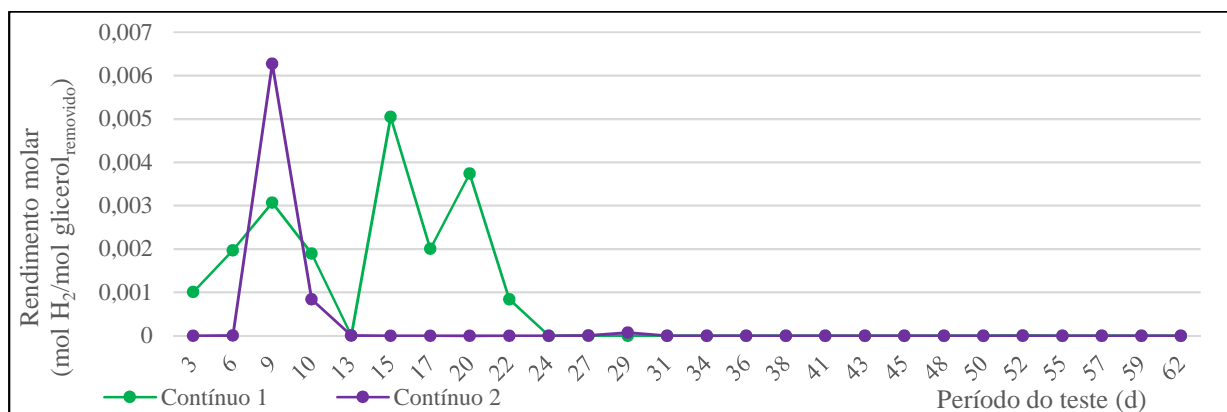
Fonte: a autora

A partir da análise do Gráfico 28, pode-se visualizar os maiores valores de rendimento molar no primeiro dia de operação, de 3,58 e 0,24 mols H₂/mol de glicerol, no RSC1 e RSC2, respectivamente. Já no decorrer do experimento, houve grande variação dos valores em RSC1, alcançando máximo de 0,52 e mínimo de 0,09 mol H₂/mol glicerol. Já em RSC2, exceto nos primeiros dias, os demais rendimentos foram abaixo de 0,05 mol H₂/mol glicerol.

No primeiro dia de operação, foi constatado rendimento maior do que o máximo teórico, que é 3 mols H₂/mol glicerol, na produção de ácido acético. Isto pode ter sido decorrente das impurezas contidas no glicerol bruto, conforme relatado por Sarma et al (2015).

O rendimento molar obtido durante a operação dos reatores contínuos está mostrado no Gráfico 29.

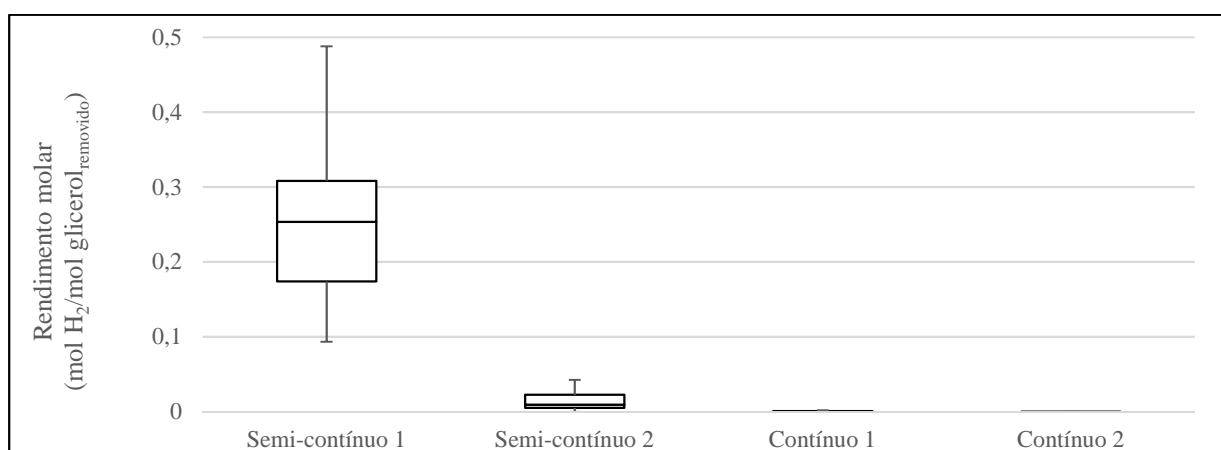
Gráfico 29: Rendimento molar obtido durante a operação dos fermentadores operados de forma contínua, nas concentrações de glicerol de 10 e 50 g/L.



Fonte: a autora

Verifica-se que o rendimento em ambos os reatores foi abaixo de 0,007 mol H₂/mol de glicerol durante todo o período experimental. A análise dos resultados de rendimento molar comparativa dos regimes operacionais testados pode ser realizada pelo Gráfico 30, na qual mostra a distribuição dos mesmos sob a forma de *Boxplot*. O Gráfico mostra os valores da mediana de 0,25 e menor que 0,05 mol H₂/mol glicerol, para RSC1 e RSC2, respectivamente.

Gráfico 30: *Boxplot* dos resultados obtidos de rendimento molar dos reatores operados de forma semi-contínua e contínua.



Fonte: a autora

O Gráfico acima também mostra os quartis dos resultados observados nos reatores semi-contínuos. No RSC1, os valores dos quartis superior e inferior foram 0,31 e 0,18,

respectivamente. Já no RSC2, os mesmos estão abaixo de 0,05 mol H₂/mol glicerol. Os baixos valores de rendimento dos reatores contínuos não apareceram no gráfico.

Ferreira (2014), avaliou o efeito do TDH (1 a 14 h) em RALF, operado na temperatura termofílica e alimentado com glicerol bruto na concentração de 5 g/L, com inóculo oriundo de reator UASB. Os resultados mostraram que o rendimento permaneceu constante entre os TDH de 14h à 2h (1,2 e 1,4 mol H₂/mol glicerol) e no TDH de 1h o rendimento foi maior (3 mols H₂/mol glicerol).

Os autores Lo et al (2013), citados no tópico anterior, avaliaram a produção de H₂ utilizando glicerol puro e bruto, na concentração de 10 g/L, em CSTR, utilizando a cepa *Clostridium pasteurianum* CH4 como inóculo. Quando o glicerol puro foi utilizado, o rendimento máximo foi de 0,50 mol H₂/mol glicerol. Já quando o glicerol bruto foi utilizado, este valor aumentou para 0,77 mol H₂/mol glicerol.

Silva-Illanes et al (2015) avaliaram o efeito da variação de pH (5,5 a 6,5) e TDH (8 a 12h) no potencial de produção de H₂, empregando CSTR, inóculo oriundo de lodo ativado e glicerol bruto como substrato. O maior rendimento, de 0,41 mol H₂/mol glicerol foi obtido quando utilizado pH de 5,5 e TDH de 12 h.

Jitrwung & Yargeau (2015) empregaram CSTR, glicerol bruto e *Enterobacter aerogenes* ATCC 35029 como inóculo para produção de H₂. Além de pH e velocidade de agitação, parâmetros como concentração de substrato e vazão de reciclo foram otimizados. Como resultado, foi verificado rendimento de 0,86 mol H₂/mol glicerol, na agitação de 500 rpm, pH 6,4, glicerol bruto na concentração de 18,5 g/L e 33% de reciclo (que favorece a diluição do afluente e retorno da biomassa) e alimentação na vazão de 0,44 mL/min. Os autores ressaltam que, nestas condições, o reator permaneceu estável durante 7 dias.

Os maiores valores obtido por Reungsang, Sittijunda & O-Thong (2013), em reator UASB com glicerol, puro e bruto, na COV de 50 g/L.d, utilizando *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 imobilizada, foram de 0,41 mol H₂/mol glicerol quando utilizado glicerol puro, e 0,32 mol H₂/mol glicerol, para glicerol bruto.

Já os resultados de Lovato et al (2015), utilizando AnSBBR e glicerol puro e bruto, mostraram valor máximo de 1,19 mol H₂/mol para glicerol puro, na concentração de 4 g/L, e de 0,1 mol H₂/mol glicerol, quando utilizada a forma bruta, na concentração de 5 g/L.

A partir da análise dos trabalhos descritos pela literatura, verifica-se que a faixa dos rendimentos obtidos a partir de operação contínua é bastante ampla, variando de 0,1 a 3,0 mol

H₂/mol glicerol. Mesmo assim, considera-se que os rendimentos obtidos neste trabalho, utilizando reatores semi-contínuos, são inferiores aos valores citados na bibliografia, ainda considerando o TDH empregado de 24 h.

O baixo rendimento de H₂ pode ser atribuído a duas razões principais. A primeira foi devido à concentração de substrato utilizada, e a segunda, ao TDH empregado.

Conforme os valores da literatura mostrados acima, há uma tendência de obtenção de maiores rendimentos quando menores concentrações de glicerol são utilizadas. Nas maiores concentrações de glicerol, os resultados descritos na literatura são próximos dos encontrados neste trabalho.

Como já citados, Chookaew, O-Thong & Prasertsan (2014) citam que, quando o glicerol está presente em excesso, há maior tendência de formação de 1,3-PD do que H₂. Esta constatação vem ao encontro dos resultados deste trabalho, já que o rendimento de H₂, quando utilizada a maior concentração de glicerol, de 50 g/L, foi inferior ao obtido quando empregado 10 g/L.

De Oliveira Faber & Ferreira-Leitão (2016) testaram diferentes concentrações de glicerina e verificaram que o máximo rendimento de H₂ foi observado quando utilizada a menor concentração de substrato. Ademais, foi constatado que o aumento na concentração de glicerina acarretou diminuição do rendimento de H₂. Este efeito foi também relatado por Ito et al. (2005), Temudo et al. (2008) e Lo et al. (2013).

Já a última possível justificativa do baixo rendimento obtido pode ser relacionada ao TDH empregado. Chookaew, O-Thong & Prasertsan (2014) e Zhang et al (2003) verificaram que baixos valores de TDH favorecem a produção de menores concentrações de etanol, aumentando a produção de H₂. De acordo com Silva, Mack & Contiero (2009), a rota metabólica oxidativa para a produção de etanol e butanol, como pode ser visualizada na Figura 12, concorre com a rota acidogênica. Sendo assim, quando o consumo do substrato é direcionado para a formação de álcoois, a produção de gás é conseqüentemente reduzida.

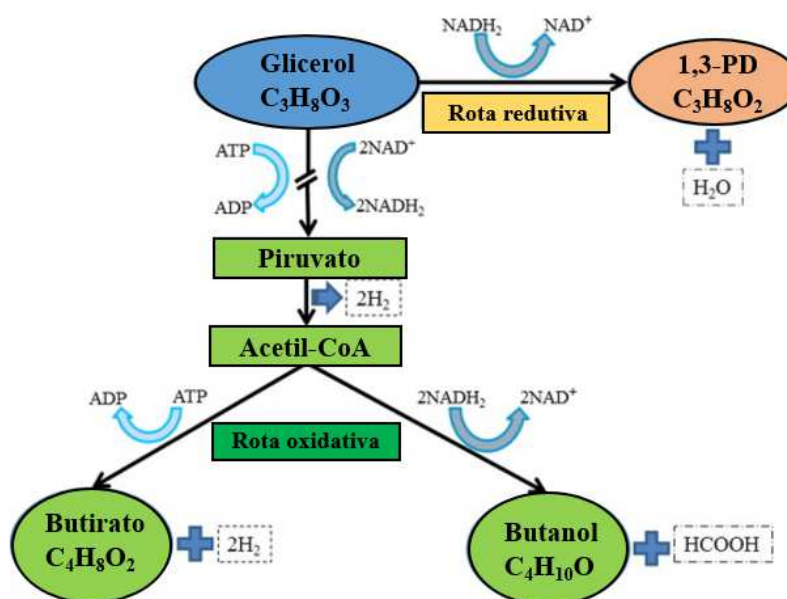


Figura 7: Rotas metabólicas, oxidativa e redutiva, de fermentação de glicerol.

Fonte: Adaptado de Pachapur et al (2015).

Sarma et al (2015) relataram o emprego do modelo semi-contínuo para produção de H_2 e do inóculo *Enterobacter aerogenes* NRRL B-407. Foram realizadas duas bateladas, de 40 e 64h, utilizando glicerol bruto nas concentrações de 60 e 120 g/L, respectivamente. Os rendimentos obtidos foram de 4,06 e 4,19 mols H_2 /mol glicerol. Contudo, os autores associaram os elevados valores a outros compostos que podem estar presentes no glicerol bruto, como sabão e ácidos graxos.

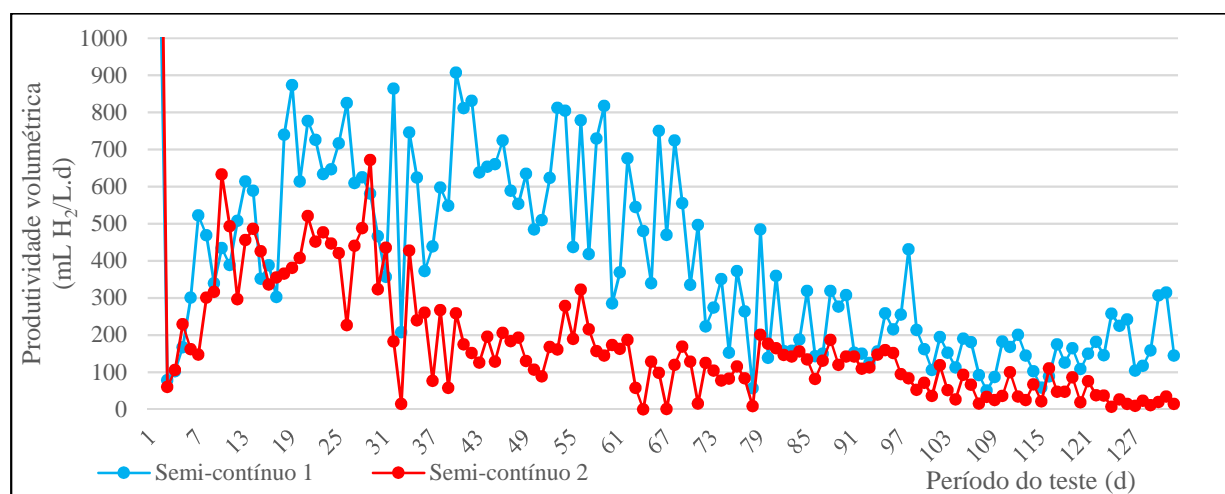
Além do citado, não há na literatura mais trabalhos relatando a operação semi-contínua, utilizando glicerol como substrato orgânico, o que dificulta a análise comparativa dos resultados.

Desta forma, os resultados das pesquisas realizadas até o momento, bem como os obtidos neste trabalho indicam que o rendimento seja afetado tanto pela concentração de glicerol como pelo TDH. Nos reatores semi-contínuos, estes dois fatores parecem contribuir em conjunto para o direcionamento da rota metabólica à produção de intermediários que diminuem ou consomem não somente o H_2 , mas também os AGV formados, já relatados anteriormente.

5.2.4. Produtividade volumétrica

A produtividade volumétrica ($\text{mL H}_2/\text{L.d}$) obtida durante a operação dos fermentadores semi-contínuos pode ser visualizada no Gráfico 31. Verifica-se variação nos resultados, com tendência de diminuição dos valores, ao final do teste.

Gráfico 31: Produtividade volumétrica dos reatores semi-contínuos durante o experimento realizado.

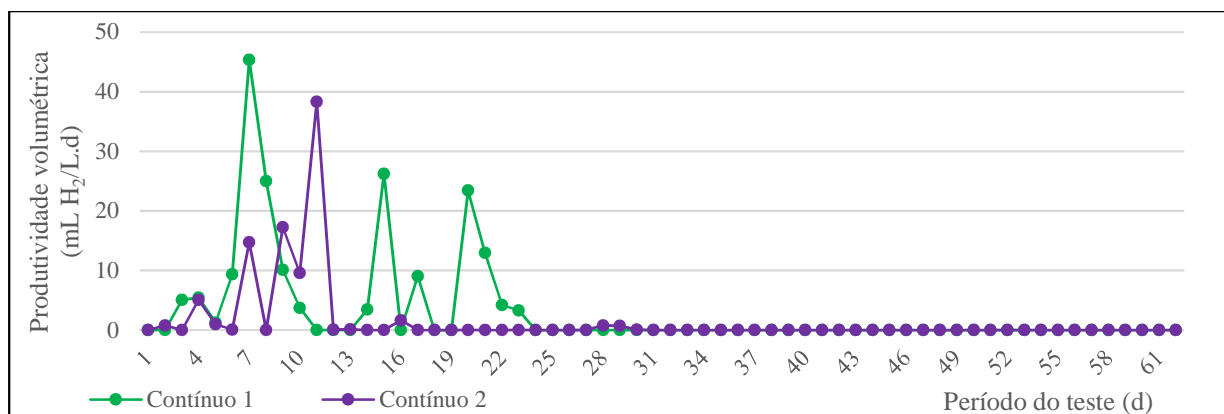


Fonte: a autora

Os valores máximos deste parâmetro foram encontrados no primeiro dia de operação, iguais a $2340 \text{ mL H}_2/\text{L.d}$ no RSC1 e $2928 \text{ mL H}_2/\text{L}$ no RSC2. Além destes, os maiores valores foram de $907,2$ e $671,9 \text{ mL H}_2/\text{L.d}$, obtidos no RSC1 e RSC2 respectivamente, e os mínimos, de $50,8$, no RSC1, e $0,0 \text{ mL H}_2/\text{L.d}$, no RSC2.

A produtividade volumétrica dos reatores contínuos está apresentada no Gráfico 32. O máximo encontrado, de $45,3 \text{ mL H}_2/\text{L.d}$ foi no RC1. Já no reator 2, este valor foi de $38,3 \text{ mL H}_2/\text{L.d}$.

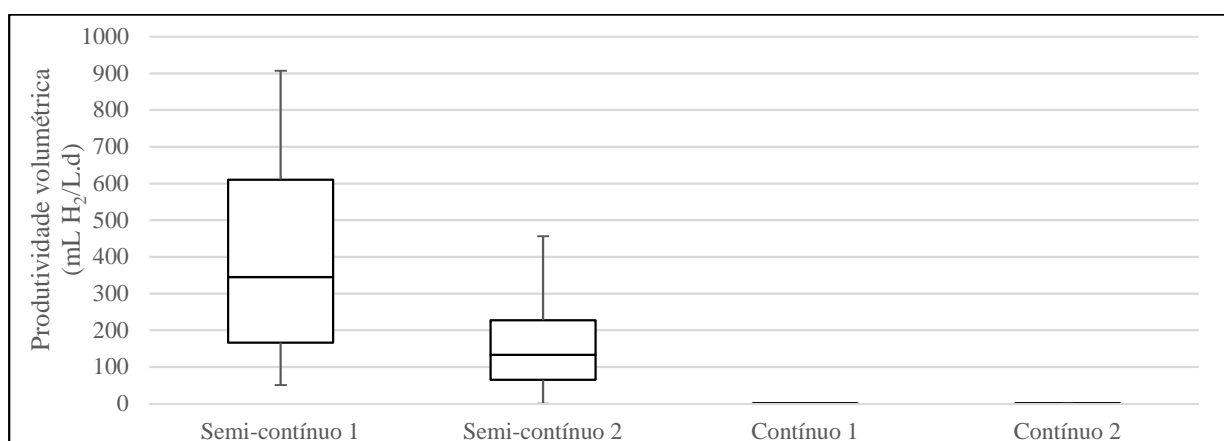
Gráfico 32: Produtividade volumétrica dos reatores contínuos no decorrer do teste.



Fonte: a autora

Ressalta-se os baixos valores de produtividade encontrados durante a operação dos reatores contínuos. Após 15 dias de operação, não foi observada produtividade no RC2 e, no RC1, após 25 dias.

Para melhor avaliação da produtividade volumétrica, devido à grande variação dos resultados, estes dados também foram calculados sob a forma de *Boxplot*, mostrado no Gráfico 33, que permite verificar a sua distribuição nas duas condições operacionais propostas.

Gráfico 33: *Boxplot* da produtividade volumétrica dos reatores semi-contínuos e contínuos.

Fonte: a autora

A distribuição dos dados sob a forma de *Boxplot* mostra valores de mediana no RSC1 de 350 e no RSC2 de 130 mL H₂/L.d. Já os quartis máximos foram 610 e 220, e mínimos 180 e 80 mL H₂/L.d, em RSC1 e RSC2 respectivamente. Como houve pouca produtividade

volumétrica nos reatores contínuos, abaixo de 45 mL H₂/L.d, os mesmos não aparecem no gráfico devido à escala empregada.

Ito et al (2005) empregaram um reator de leito fixo, inoculado com *Enterobacter aerogenes* HU-101, com TDH de 10h, para avaliar a produção de H₂ utilizando glicerol puro e bruto como fonte carbonácea. A produtividade máxima foi 36439 mL H₂/L.h para glicerol bruto e 46272 mL H₂/L.h para glicerol puro. Como justificativa à menor produtividade verificada empregando glicerol bruto, os autores citaram a presença de sais, que podem ter apresentado efeito inibidor.

Os autores Reungsang, Sittijunda & O-Thong (2013) já citados, utilizaram reator UASB para produção de H₂ a partir de glicerol, puro e bruto, utilizando *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 imobilizada. A melhor produtividade volumétrica, tanto para glicerol puro como bruto, foi obtido na COV de 50 g/L.d. Com o glicerol puro, o máximo valor obtido foi de 4824, e com o bruto, de 3333 mL H₂/L.d.

Lo et al (2013), já citados anteriormente, testaram um CSTR para avaliação da produção de H₂ utilizando glicerol puro e bruto como substrato orgânico, ambos na concentração de 10 g/L, e a cepa *Clostridium pasteurianum* CH4 como inóculo. Quando o glicerol puro foi utilizado, a produtividade máxima foi de 2472 mL H₂/L.h. Já quando o glicerol bruto foi utilizado, a produtividade aumentou para 3984 mL H₂/L.d. Ressalta-se que o reator foi operado cerca de 10 dias.

Chookaew, O-Thong & Prasertsan (2014) operaram reator UASB com *Klebsiella sp.* TR17, na temperatura de 40°C, TDH de 2 a 12 h e concentração de glicerol de 10 a 30 g/L. A produtividade volumétrica máxima, no valor de 5835 mL H₂/L.d, foi encontrada quando empregada a concentração de 30 g/L.

Sarma et al (2015), empregando o modelo semi-contínuo para produção de H₂ e inóculo *Enterobacter aerogenes* NRRL B-407, realizaram duas bateladas, de 40 e 64h, utilizando glicerol bruto nas concentrações de 60 e 120 g/L, respectivamente. Na primeira batelada (60 g/L) a produção acumulada de H₂ foi de 14,41 L, que corresponde a 4,80 L H₂/L. Já na segunda (120 g/L), a produção acumulada de H₂ foi de 15,55 L, ou, conforme os autores, 5,18 L H₂/L. Como estratégia de operação, ainda foi borbulhado nitrogênio gasoso (N₂) para diminuir a pressão parcial de H₂ que, conforme os autores, pode apresentar efeito adverso no rendimento de H₂.

Analisando os valores da literatura de produtividade volumétrica, dois itens importantes precisam ser ressaltados. O primeiro é que os trabalhos citados avaliam a produção de H_2 utilizando como inóculo culturas puras. Já o segundo tópico é em relação aos valores apresentados, que são os máximos encontrados. Sendo assim, buscou-se trabalhos que empregaram culturas mistas, utilizando glicerol bruto como substrato, em sistemas contínuos para comparação.

Nazareth (2015), utilizando lodo anaeróbio pré-tratado como inóculo, também testou diferentes COV em RALF, e glicerol bruto como substrato para avaliar a produção de H_2 . A autora empregou COV de 240, 487 e 1092 g/L.d, e obteve maior produtividade volumétrica, igual a 316 mL H_2 /L.d, na carga intermediária.

Já Moncayo Bravo et al (2015) empregaram AnSBBR para avaliar a produção de H_2 utilizando efluente sintético com glicerol puro como substrato, e lodo anaeróbio como inóculo. Foram testados diferentes valores de COV, de 7,5 a 16,2 g/L.d, a partir da variação do TDH em 3 e 4 h, e a DQO afluente em 3, 4 e 5 g/L. De acordo com os autores, não foi encontrada relação clara entre a COV aplicada e a produção de H_2 . Contudo, ressaltaram que a maior produção volumétrica, igual a 1512 mL H_2 /L.d, foi obtida na COV de 12,9 g DQO/L.d.

Lovato et al (2015) também utilizaram AnSBBR e glicerol puro para produção de H_2 , aplicando COV de 7,7 a 17,1 g DQO/L.d. O glicerol bruto foi utilizado apenas na concentração de 5 g/L e TDH de 3h, resultando em COV de 17,1 g DQO/L.d. A produtividade máxima obtida foi de 2258 mL H_2 /L.d quando utilizado glicerol puro e COV aplicada de 17,1 g/L.d. Na condição testada com glicerol bruto, o valor máximo encontrado foi 217 mL H_2 /L.d.

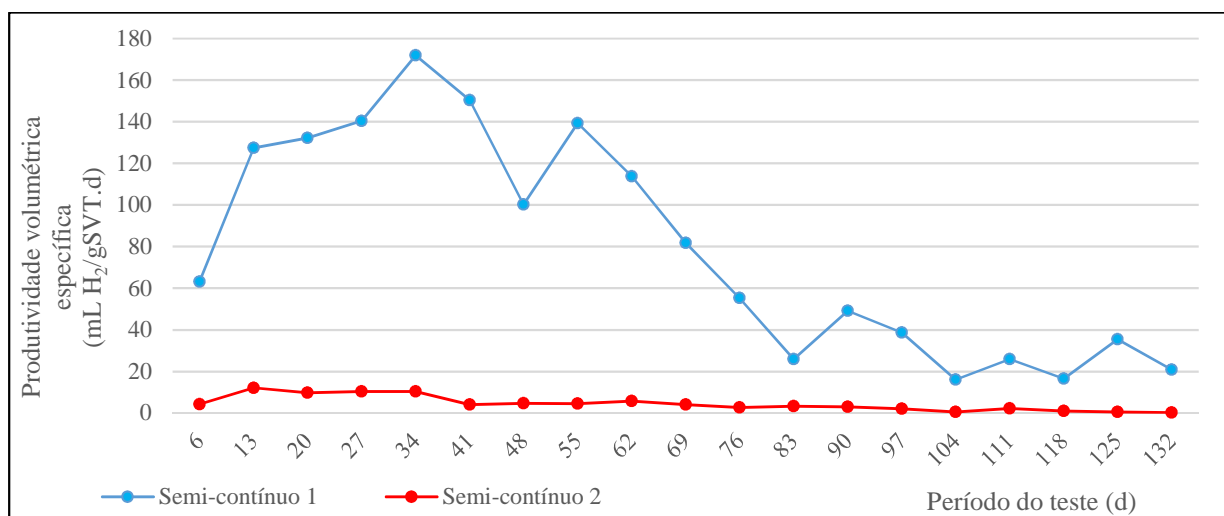
Ferreira (2014) empregou RALF para produção de H_2 utilizando glicerol como substrato. Foram testados os valores de TDH de 1 à 14h, em temperatura de 55°C. A menor produtividade volumétrica, igual a 2460 mL H_2 /L.d foi obtida no valor de TDH de 14h, e a maior de 36208 mL H_2 /L.d no valor de TDH de 1h. De acordo com a autora, este valor foi decorrente da maior COV aplicada.

A partir da avaliação de trabalhos que utilizaram culturas mistas, exceto o último apresentado que utilizou condição termofílica, verifica-se que os dados deste trabalho são semelhantes e até superiores aos citados, mesmo quando utilizado glicerol puro, ou seja, ausente de impurezas. Destaca-se o valor máximo encontrado quando utilizado RALF, que é menor do que a mediana do fermentador semi-contínuo 1.

5.2.5. Produtividade volumétrica específica

Os resultados referentes à produtividade volumétrica específica ($\text{mL H}_2/\text{gSVT.d}$) podem ser visualizados no Gráfico 34. O RSC1 apresentou máximo de $172 \text{ mL H}_2/\text{gSVT.d}$, decorridos 30 dias do início do experimento, e mínimo de $16,1 \text{ mL H}_2/\text{gSVT.d}$, no 104º dia. No RSC2 foram verificados em todo o período do experimento valores abaixo de $20 \text{ mL H}_2/\text{gSVT.d}$.

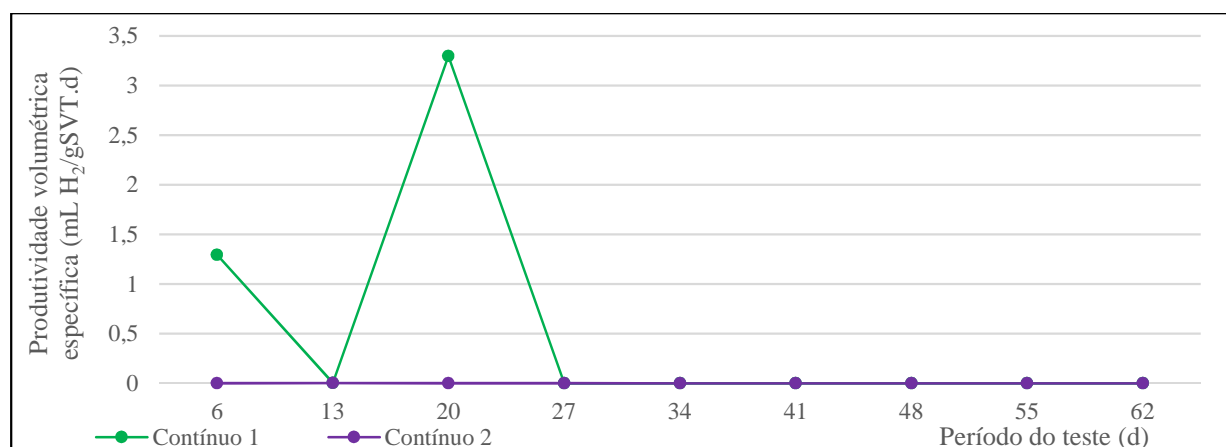
Gráfico 34: Produtividade volumétrica específica obtida nos reatores operados sob a forma semi-contínua.



Fonte: a autora

Já a produtividade volumétrica dos reatores contínuos está mostrada no Gráfico 35. Como pode ser visualizado, esta configuração operacional também não apresentou bons resultados para este parâmetro, com valor máximo de $3,3 \text{ mL H}_2/\text{gSVT.d}$, no RC1. Após o máximo obtido no RC1 e em todo o monitoramento realizado no RC2, não foi observada produtividade durante o experimento.

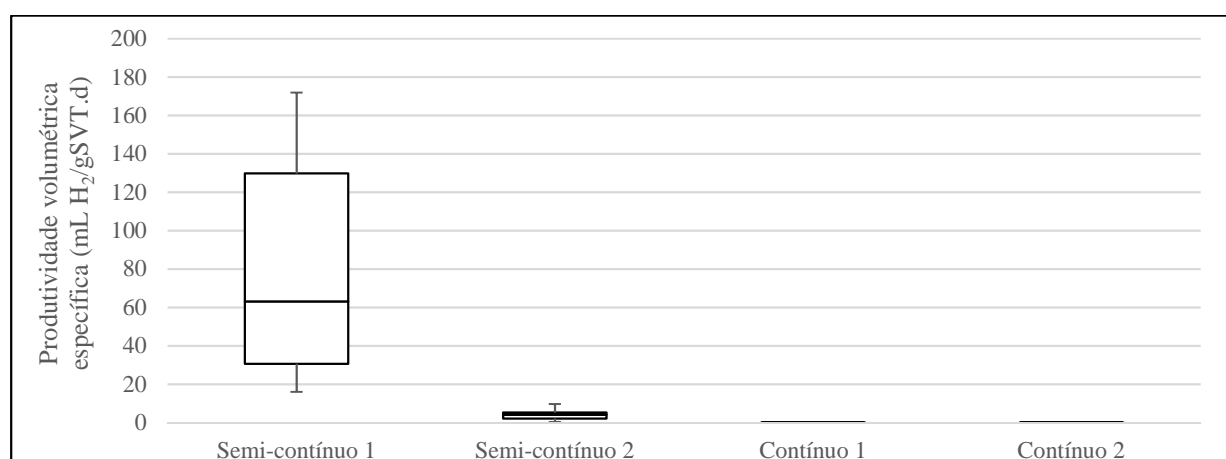
Gráfico 35: Produtividade volumétrica específica dos reatores contínuos, durante o período operacional.



Fonte: a autora

Bem como nos outros parâmetros, os dados de produtividade volumétrica específica também foram analisados sob a forma de *Boxplot*, como pode ser visto no Gráfico 36. Os valores de mediana, quartil superior e inferior no RSC1 são, respectivamente, 65, 130 e 30 mL H₂/gSVT.d. Já no RSC2, estes apresentaram valores abaixo de 10 mL H₂/gSVT.d.

Gráfico 36: Produtividade volumétrica específica dos reatores operados de forma semi-contínua e contínua.



Fonte: a autora

Os resultados referentes aos reatores contínuos, também devido à escala utilizada para elaboração do gráfico, não são contemplados no gráfico. Mais uma vez, verifica-se os baixos valores obtidos no fermentador 2, que operou com maior COV aplicada.

De acordo com Moncayo Bravo et al (2015), a produtividade volumétrica específica máxima encontrada foi de 443 mL H₂/g SVT.d, na COV de 12,9 g DQO/L.d. Os autores empregaram AnSBBR para avaliar a produção de H₂ utilizando efluente sintético com glicerol puro como substrato, lodo anaeróbio imobilizado e pré-tratado como inóculo.

Condições semelhantes ao trabalho supracitado foram testadas por Lovato et al (2015). Neste último, a máxima produtividade volumétrica específica foi de 889 mL H₂/g SVT.d com glicerol puro na COV de 13,3 g DQO/L.d. Já quando o glicerol bruto foi testado, o valor máximo foi de 13,44 mL H₂/gSVT.d, na COV de 17,1 g DQO/L.d.

Reungsang, Sittijunda & O-Thong (2013) utilizaram reator UASB alimentado com glicerol puro e bruto e *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 imobilizada como inóculo. O valor máximo de produtividade volumétrica específica foi de 1827 mL H₂/g SVS.d, com glicerol bruto como substrato na COV de 37,5 g/L.d. Já quando o glicerol puro foi utilizado, o máximo foi de 1451 mL H₂/g SVS.d.

Os valores encontrados na literatura de produtividade volumétrica específica de H₂ são muito superiores aos verificados no presente trabalho. Pode-se verificar que a operação semi-contínua foi capaz de reter uma elevada quantidade de biomassa, o que conseqüentemente reduziu os valores deste parâmetro. Já na operação dos reatores contínuos, os baixos valores obtidos, ou nulos, ocorreram tanto pela baixa produção de gás, mas também pelo acúmulo de SVT.

5.2.6. Diversidade microbiana

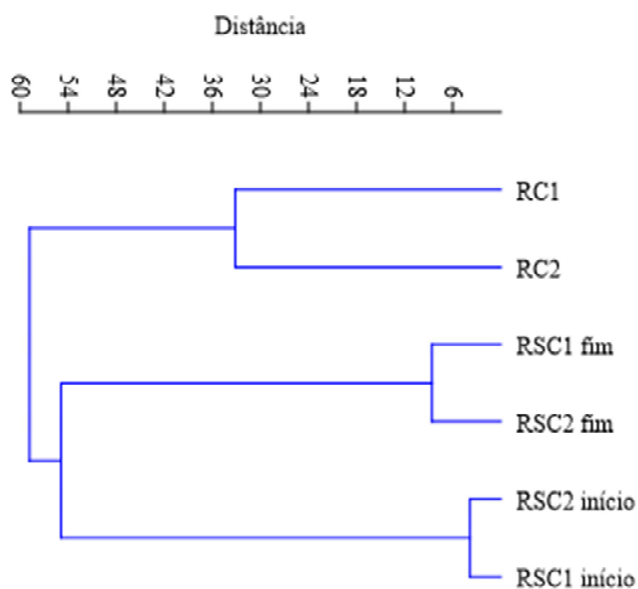
Além dos parâmetros físicos e químicos e produção de gás, a diversidade microbiana, a nível de gênero, também foi avaliada nos regimes operacionais testados.

Nos reatores semi-contínuos, duas amostras foram analisadas em cada reator, uma associada à elevada e outra à baixa produção de gás, no início e no final do experimento, respectivamente. Como foi apresentado no Gráfico 20, do item 5.2.2, percebe-se que é possível realizar diferenciar estas duas condições a partir do 70º dia de operação. Sendo assim, as amostras analisadas, relacionadas à boa produção, foram coletadas no 26º dia, e à má produção, no 111º dia.

Já nos reatores contínuos, como não foram verificados bons resultados em relação à produção de H₂, optou-se por analisar somente uma amostra de cada reator, decorridos 41 dias do início do experimento.

Primeiramente, foi realizado o agrupamento hierárquico dos organismos presentes em cada modelo experimental avaliado. O mesmo está mostrado no Gráfico 37.

Gráfico 37: Agrupamento hierárquico clássico baseado na abundância relativa dos microrganismos presentes em cada reator.



Fonte: a autora

O agrupamento mostra que é possível associar a diversidade genética do período operacional semi-contínuo, bem como entre os modelos de reatores testados. A variabilidade genética foi maior no semi-contínuo durante período de operação (início e fim) de ambos os reatores. Ou seja, no início da operação foram encontrados microrganismos semelhantes em ambos os reatores (independente da concentração inicial de glicerol). Já no fim, também foram semelhantes entre si, mas diferentes da amostra coletada no início do teste.

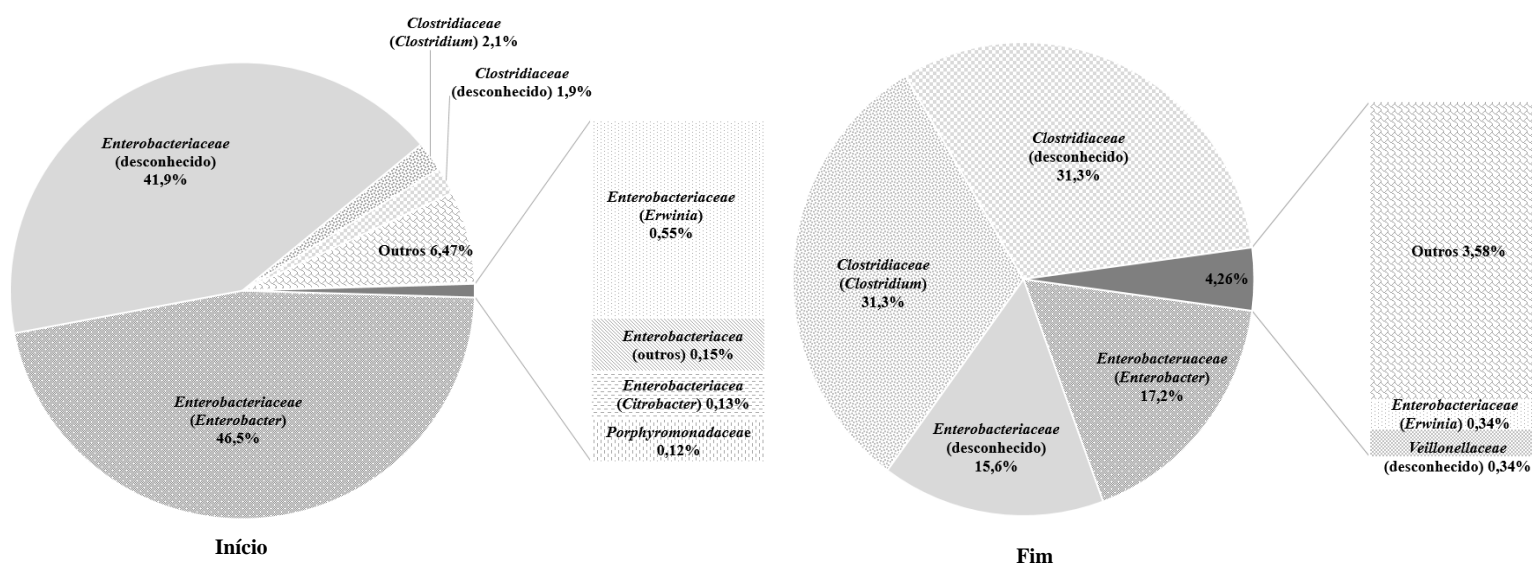
Já nos reatores contínuos, os microrganismos encontrados foram diferentes dos verificados na operação semi-contínua, independente do período avaliado, o que contribuiu pela maior variabilidade genética constatada.

Sendo assim, o agrupamento revelou dois grupos. O primeiro, relacionado aos reatores semi-contínuos, em que é associada à geração de H_2 , ácidos acético e butírico. O segundo grupo, em que se encontram os reatores contínuos, relacionam à produção de ácido propiônico

e baixa ou nula produção de H₂. As poucas similaridades entre os dois grupos confirmam a influência da forma de operação na seleção dos microrganismos.

As diversidades microbianas encontradas nos reatores, baseadas na abundância relativa, são mostradas a seguir. No Gráfico 38 pode-se visualizar a condição do reator semi-contínuo 1, no início e no fim do experimento, em que são apresentadas as famílias e, entre parêntesis, os gêneros dos microrganismos.

Gráfico 38: Diversidade microbiana, baseada na abundância relativa dos microrganismos, encontrada no reator semi-contínuo 1, no início e no fim da operação



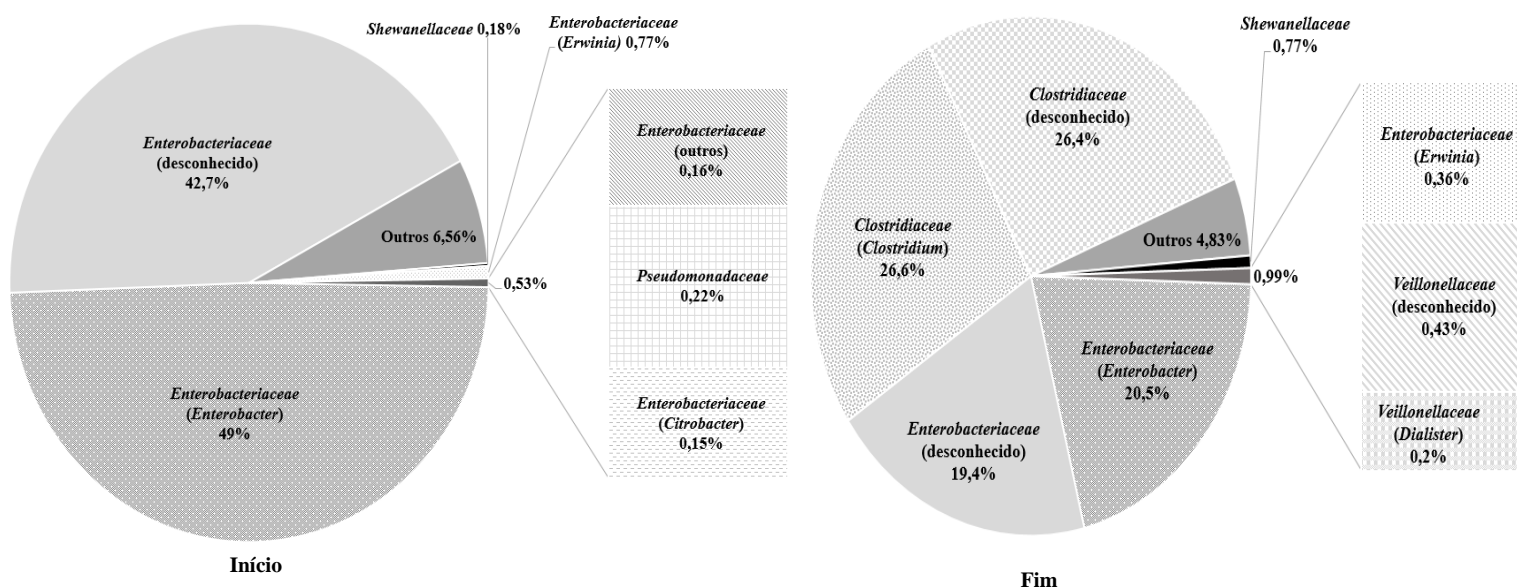
Fonte: a autora

Pode-se visualizar que a família *Enterobacteriaceae* foi predominante no início da operação do reator semi-contínuo 1, correspondendo à 89,2% dos microrganismos encontrados, divididos em gênero desconhecido (41,9%), *Enterobacter* (46,5%), *Erwinia* (0,55%), outros (0,15%) e *Citrobacter* (0,12%). A família *Clostridiaceae* foi a segunda mais encontrada, sendo 4% dos organismos, nos gêneros *Clostridium* (2,1%) e desconhecido (1,9%).

Já no final do experimento do RSC1, verificou-se modificação na abundância relativa. A Família *Clostridiaceae* foi a predominante, correspondendo a 62,6%, em igual proporção entre os gêneros *Clostridium* e desconhecido (31,3%). A família *Enterobacteriaceae* passou para o segundo lugar, representando 33,1% dos organismos, divididos em *Enterobacter* (17,2%), desconhecido (15,6%) e *Erwinia* (0,34%).

O Gráfico 39 mostra a diversidade microbiana verificada no reator semi-contínuo 2, no início e no final do experimento.

Gráfico 39: Diversidade microbiana, baseada na abundância relativa dos microrganismos, encontrada no reator semi-contínuo 2, no início e no fim da operação.



Fonte: a autora

O mesmo comportamento visualizado no RSC1 também foi verificado no RSC2, tanto no início como no fim do experimento. No início, a família *Enterobacteriaceae* foi predominante, correspondendo a 92,8% dos microrganismos encontrados, em que os gêneros majoritários também foram *Enterobacter* (49%) e desconhecido (42,7), seguidos por *Erwinia* (0,77%), outros (0,16%) e *Citrobacter* (0,15%).

No final, a família *Clostridiaceae* foi a mais abundante, com 53% dos organismos presentes, com os gêneros *Clostridium* (26,6%) e desconhecido (26,4%). A família *Enterobacteriaceae* foi a segunda mais encontrada (40,2%), divididos nos gêneros *Enterobacter* (20,5%) e desconhecido (19,4%) e *Erwinia* (0,36%). Também se verificou microrganismos da família *Veillonellaceae*, do gênero *Dialister* (0,2%), e maior quantidade de *Shewanellaceae* (0,77%).

Reungsang, Sittijunda & O-Thong (2013) avaliaram a produção de H₂ em UASB inoculado com *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 imobilizada em grânulos de lodo pré-tratados, utilizando glicerol como substrato. Foi associada a presença deste organismo à

produção de H₂, mas também bactérias do filo *Firmicutes*, como *Clostridium*, *Bacillus* e *Dialister*. Conforme os autores, estes grupos bacterianos se relacionam com a detecção de ácidos propiônico, acético, láctico e butírico.

Já Mangayil, Karp & Santala (2012) utilizaram lodo ativado enriquecido, a partir de consecutivas aclimações, para produzir H₂ a partir de glicerol bruto, na concentração de 1 g/L, pH 6,5 e temperatura de 40°C. A caracterização molecular revelou que o consórcio microbiano utilizado apresentava *Clostridium* como gênero dominante.

Lo et al (2013) investigaram o potencial de produção de H₂ de *Clostridium butyricum*, *Clostridium pasteurianum* e *Klebsiella* sp. Dentre os microrganismos, *Clostridium pasteurianum* CH4 exibiu os melhores resultados.

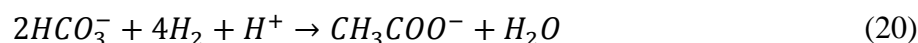
Neste trabalho, as famílias que mais contribuíram para a variabilidade genética dos microrganismos nos reatores semi-contínuos foram a *Enterobacteriaceae* e a *Clostridiaceae*, predominantes no início e no final do experimento, respectivamente. Em relação à presença destes organismos, também foi possível associar às condições de melhor (início) e pior produção de H₂ (fim).

Vários pesquisadores já confirmaram o potencial do gênero *Enterobacter*, principalmente da espécie *Enterobacter aerogenes* para a conversão de glicerol bruto a H₂ (ITO et al, 2005; YAZDANI & GONZALEZ, 2007; SAKAI & YAGISHITA, 2007; SEIFERT et al, 2009; MARQUES et al, 2009; REUNGSANG, SITTIJUNDA & O-THONG, 2013; JITRWUNG & YARGEAU, 2015; SARMA et al, 2015). A maioria apresenta avanços empregando esta espécie em culturas puras.

A fermentação de glicerol por *Enterobacter* resulta em 1,3-PD e ácido acético. Além dos citados, outros intermediários como ácidos láctico e fórmico, bem como etanol também podem ser obtidos (AMARAL et al, 2009). Já quando há a presença de *Clostridium*, o principal produto é o 1,3-PD (BARBIRATO et al, 1998), e butanol, seguido de etanol (BIEBL, 2001), enquanto que a produção de ácidos orgânicos e H₂ diminuem (AKUTSU et al, 2009).

De Sá, Cammarota & Ferreira-Leitão (2014) citam que a desvantagem na utilização de culturas mistas no processo fermentativo de produção de H₂ é associada à presença de microrganismos consumidores deste gás, tais como bactérias metanogênicas e homoacetogênicas. A realização do pré-tratamento térmico previne a ocorrência da metanogênese, contudo, não inibe o consumo de H₂ pelas bactérias homoacetogênicas.

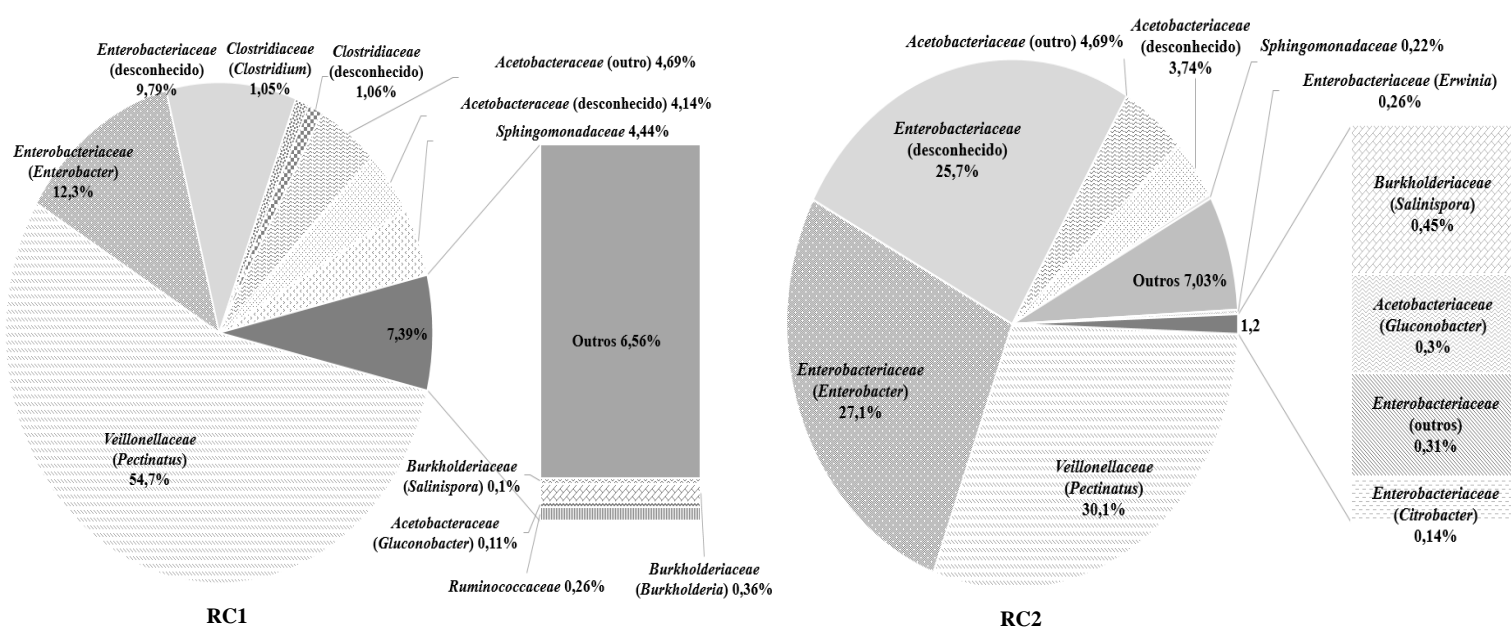
As bactérias homoacetogênicas utilizam CO_2 e H_2 para produzir ácido acético (NI et al, 2011; RODRIGUES et al, 2016), conforme mostrado na Equação 20. Algumas delas pertencem ao gênero *Clostridium*, que têm como característica a sobrevivência em condições extremas, como as requeridas nos pré-tratamentos de biomassa. Exemplos são a *Clostridium aceticum* e *Clostridium thermoautotrophicum* (DE SÁ, CAMMAROTA & FERREIRA-LEITÃO, 2014).



Desta forma, foi clara a modificação da abundância da comunidade microbiana produtora de H_2 no início e no fim do experimento. Foi possível associar a elevada produção de H_2 e ácidos graxos voláteis, no início da operação dos reatores semi-contínuos, independente da concentração glicerol afluyente, com o gênero *Enterobacter*. Já a queda da produção de H_2 , verificada ao final do teste, pode ser vinculada ao gênero *Clostridium*.

A diversidade microbiana verificada nos reatores contínuos está mostrada no Gráfico 40. Como já mencionado, para este modelo de reator, foram analisadas duas amostras, uma de cada reator.

Gráfico 40: Diversidade microbiana, baseada na abundância relativa dos microrganismos, encontrada durante a operação dos reatores contínuos 1 e 2.



Fonte: a autora

Como mostrado no Gráfico 40, foi possível verificar uma elevada diversidade microbiana nos reatores contínuos. No reator 1, a predominância foi da família *Veillonellaceae*, com o gênero *Pectinatus*, correspondendo a 54,7% dos organismos. Em segundo lugar de abundância relativa destacou-se a família *Enterobacteriaceae* (gênero *Enterobacter* e desconhecido), com 22,1% e, em terceiro, *Acetobacteraceae* (outro, desconhecido e *Gluconobacter*), com 8,94%. A família *Clostridiaceae* (gênero desconhecido e *Clostridium*) apareceu em quarto lugar, com 2,11%. Outras famílias, como *Burkholderiaceae* (*Salinispora* e *Burkholderia*), *Sphingomonadaceae* e *Ruminococcaceae* também estiveram presentes, mas em pequenas proporções.

Já no reator 2, também foi verificada elevada diversidade microbiana, mas com quantidades relativas distintas do reator 1. A predominância foi da família *Enterobacteriaceae*, com o gênero *Enterobacter* correspondendo a 27,1%, desconhecido 25,7%, outros 0,31%, *Erwinia* 0,26% e *Citrobacter* 0,14%. A segunda maior família em abundância foi a *Veillonellaceae*, com o gênero *Pectinatus*, representando 30,1% dos organismos e, em terceiro, *Acetobacteraceae* (outro, desconhecido e *Gluconobacter*), com 8,73%. O restante, em menor proporção, foi referente às famílias *Burkholderiaceae* (*Salinispora*) e *Sphingomonadaceae*. A família *Clostridiaceae* não foi encontrada neste reator.

Nos reatores contínuos, a diversidade microbiana está relacionada com 3 principais famílias que são *Veillonellaceae* (*Pectinatus*), *Acetobacteraceae* (outro, desconhecido e *Gluconobacter*) e *Enterobacteriaceae* (desconhecido, outros, *Erwinia* e *Citrobacter*). Cabe ressaltar que as duas primeiras famílias citadas não foram encontradas nos reatores semi-contínuos.

Júnior, Etchebehere & Zaiat (2015) avaliaram a produção de H₂ empregando vinhaça em reator anaeróbico ascendente de leito fixo. Foram testados como material suporte argila expandida, cerâmica porosa, carvão e polietileno de baixa densidade. Os reatores foram operados com TDH de 24h, COV de 36,2 g DQO/L.d, na temperatura de 25 °C. Verificou-se que os meios suportes utilizados selecionam diferentes populações microbianas.

Ainda conforme os autores, também foi realizada análise da diversidade microbiana no início e no fim do experimento, relacionados à elevada e à baixa produção de H₂, respectivamente. Como resultados, foi verificado que membros da família *Veillonellaceae* foram dominantes (60,7%) durante a elevada produção de H₂. Organismos do gênero *Pectinatus* estiveram presentes no início, com abundância relativa de 54,1%, e no fim, decaiu para 3,1%. Já a baixa produção de H₂ ao final do teste foi associada ao aumento da família

Burkholderiaceae (de 22,5 a 69,2%). Segundo os autores, membros desta família não produzem H_2 e são eficientes na mineralização de matéria orgânica sob condições aeróbicas. Sendo assim, a sua detecção foi associada a condições microaerofílicas, que inibiram a atuação de organismos estritamente anaeróbios.

Conforme Tholozan, Membré & Grivet (1997), os principais intermediários da fermentação de açúcares por membros do gênero *Pectinatus* é H_2 , ácidos acético e propiônico. Devido a este último produto, são considerados organismos de baixo rendimento de H_2 (CASTELLÓ et al, 2009, XAFENIAS, ANUNOBI & MAPELLI, 2015).

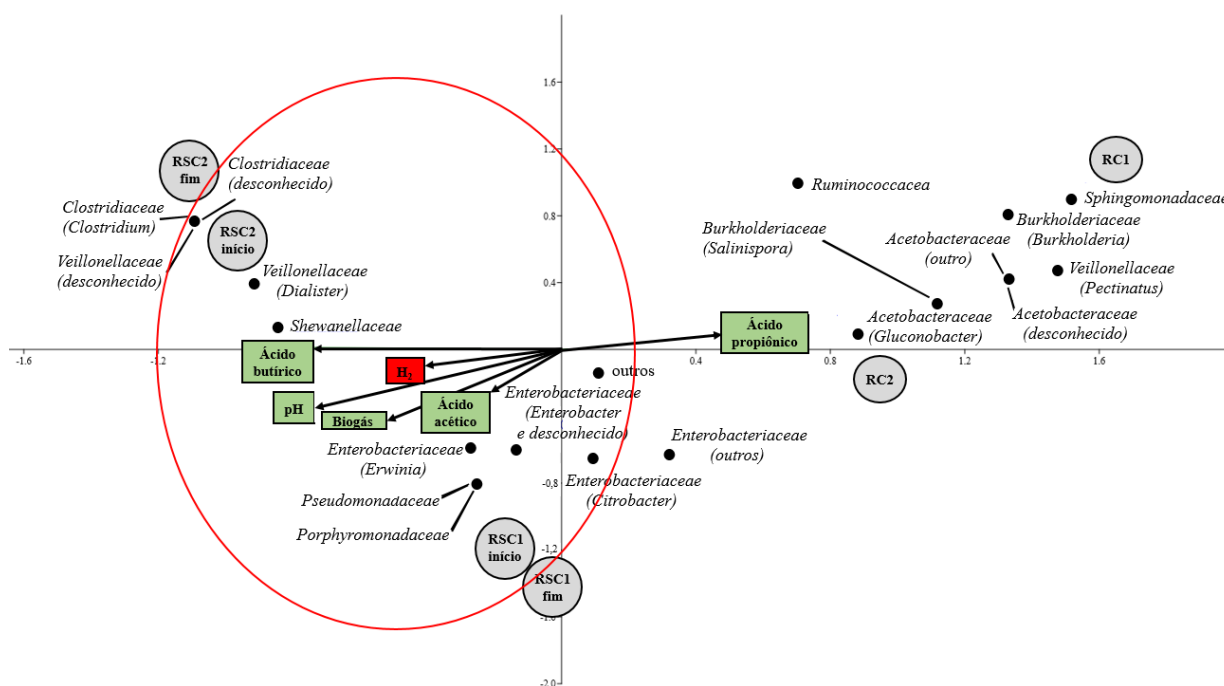
No estudo realizado por Dennis et al (2013), foi testado um sistema bioeletroquímico para produção de H_2 utilizando glicerol como substrato e lodo anaeróbio como inóculo. O principal objetivo foi avaliar a relação da diversidade microbiana com os intermediários formados. Verificou-se que a população de *Enterobacteriaceae* (*Citrobacter*) teve relação positiva com a formação de 1,3-PD e etanol. Já *Veillonellaceae* (*Pectinatus*) foi correlacionado com a produção de ácido propiônico.

Já as bactérias da família produtora de ácido acético, *Acetobacteraceae*, dos gêneros como *Gluconobacter*, *Acetobacter* e *Gluconacetobacter* podem produzir ácido glicérico e fosfato de dihidroxiacetona a partir de glicerol (ALMEIDA, FÁVARO & QUIRINO, 2012). As mesmas também são capazes de oxidar etanol a ácido acético em condições aeróbias (STASIAK & BLAZEJAK, 2009).

A partir da análise dos dados encontrados na literatura, verifica-se que a família *Veillonellaceae* (*Pectinatus*), organismos abundantes nos reatores contínuos, principalmente no RC1, são relacionados à produção de ácido propiônico, o que corrobora os resultados de AGV, já discutidos. Foi constatada condição microaerofílica nos reatores contínuos devido à presença de *Burkholderiaceae*, conforme descritos por Júnior, Etchebere & Zaiat (2015), e *Acetobacteraceae*. Acredita-se que, mesmo em abundância relativa inferior à 10%, estes organismos indicam a presença de condições não favoráveis de produção de H_2 .

Para comparar os principais parâmetros físicos e químicos avaliados e diversidade microbiana com a produção de H_2 , foi realizada a análise de correlação canônica, visando a identificação e quantificação de sua associação. A mesma está apresentada no Gráfico 41.

Gráfico 41: Análise de correlação canônica entre os microrganismos encontrados nos reatores, parâmetros físicos e químicos, volume de biogás e hidrogênio.



Fonte: a autora

Percebe-se neste gráfico a proximidade da correlação entre as variáveis. Os microrganismos, bem como os parâmetros no interior ou próximos ao círculo em vermelho destacado, estão associados à produção de H_2 . Bem como, quanto mais distantes, menos relacionados com a produção deste gás.

Sendo assim, se verifica que os microrganismos das famílias *Enterobacteriaceae*, *Clostridiaceae*, *Veillonellaceae* (gêneros *Dialister* e desconhecido) são relacionadas com a produção de H_2 , bem como a produção de ácidos acético e butírico, e o maior pH do meio reacional. As condições iniciais dos reatores semi-contínuos 1 e 2 possuem maior proximidade da produção de H_2 do que as finais.

Já os organismos das famílias *Burkholderiaceae*, *Acetobacteraceae* e *Veillonellaceae* (*Pectinatus*), além da formação de ácido propiônico, não estão correlacionados com a produção de H_2 . Nesta situação, se enquadraram os reatores contínuos 1 e 2.

5.2.7. Reator semi-contínuo vs. contínuo

Neste trabalho, foi possível verificar que os reatores semi-contínuos apresentaram bons resultados de produtividade volumétrica, mas baixos rendimentos de H₂. Já os reatores contínuos, em todos os parâmetros de avaliação de produção de gás, não foram satisfatórios.

Os elevados valores de produtividade volumétrica encontrados nos reatores semi-contínuos podem ser associados ao seu modelo de operação que, segundo Borzani (2001), é baseado em choque de carga. De acordo com Aquino & Chernicharo (2005), em condições de choque de carga orgânica e/ou hidráulica, há acúmulo de H₂ no biogás. Nestas situações, os microrganismos produtores de H₂, que apresentam rápido crescimento, produzem mais hidrogênio, pois há excesso de fonte de carbono. De acordo com os autores, a acumulação de hidrogênio ocorre devido a limitações de transferência de H₂ dos microrganismos produtores para os consumidores. Sendo assim, nesta configuração, a etapa acidogênica é favorecida, em detrimento da metanogênica.

Os baixos valores de rendimento podem ser atribuídos às concentrações de glicerol utilizadas (10 e 50 g/L) e ao TDH empregado (24h). De acordo com Ito et al (2005), Temudo et al (2008) e Lo et al (2013) e De Oliveira Faber & Ferreira-Leitão (2016), o aumento na concentração de glicerol acarreta diminuição do rendimento de H₂.

Já Zhang et al (2003) e Chookaew, O-Thong & Prasertsan (2014) ressaltam que baixos TDH favorecem a produção de menores concentrações de etanol, o que aumenta a produção de H₂. Arimi et al (2015) citam que baixos TDH são cruciais para aumentar o rendimento de H₂ e eliminar competidores. Ferreira (2014) verificou que a diminuição do TDH, de 14 à 1h, incrementou não somente o rendimento, mas também a produtividade volumétrica de H₂.

Contudo, foi clara a mudança na rota metabólica dos organismos presentes nos reatores semi-contínuos, no início e no final da operação, em que foi observada elevada e baixa produção de gás, respectivamente. Essa modificação pode ter 3 razões principais, que são o pH, a composição da comunidade microbiana e o acúmulo de impurezas.

Verificou-se que o pH do meio líquido, no reator semi-contínuo 1 apresentou queda, atingindo valores abaixo de 4,0 a partir do 50° dia de operação. Já o reator semi-contínuo 2 apresentou pH abaixo de 3,8 a partir do 15° dia. Isto pode ter favorecido a formação de outros intermediários, e seu conseqüente acúmulo pode ter acarretado diminuição da produção de H₂. Segundo Khanal et al (2004), o pH pode diminuir a produção de H₂ e causar a modificação na população microbiana.

Nos RSC1 e RSC2 foi similar a modificação na comunidade predominante no início e ao final do teste. A elevada produção de H₂ foi relacionada à abundância da família *Enterobacteriaceae* (gêneros *Enterobacter*, desconhecido, *Erwinia*, outros e *Citrobacter*). Por outro lado, a baixa produção foi associada à família *Clostridiaceae* (gêneros *Clostridium* e desconhecido).

De acordo com estudos que utilizaram *Clostridia* e glicerol como substrato, foi verificada maior produção de 1,3-PD, enquanto a geração de ácidos voláteis e H₂ diminuiu (GRUPE & GOTTSCHALK, 1992; VASCONCELOS, GIRBAL & SOUCAILLE, 1994; AKUTSU et al, 2009).

Além disso, como citado anteriormente, de acordo com Ni et al (2011) e Rodrigues et al (2016), algumas bactérias homoacetogênicas utilizam CO₂ e H₂ para produzir ácido acético. Lima & Zaiat (2012) e De Sá, Cammarota & Ferreira-Leitão (2014) citam que algumas delas pertencem ao gênero *Clostridium*, e resistem ao pré-tratamento a que a biomassa é submetida. Sendo assim, esta constatação corrobora os resultados de menor produção de gás verificada ao final do experimento, principalmente no RSC2, em que foi verificada maior proporção de ácido acético em relação aos AGV analisados. Entretanto, como a avaliação da diversidade microbiana foi realizada a nível de gênero, e não de espécie, este fato não foi comprovado.

O último item que pode estar associado com a redução da produção de H₂ é o acúmulo de impurezas do glicerol. A mediana de conversão de glicerol no RSC1 foi de 60% e no RSC2 de 40%, sendo assim, uma parcela não foi convertida, mas mantida no meio líquido. Mesmo que tenha sido removido parte do meio líquido para atendimento da condição operacional inicial proposta, acredita-se que a constante concentração destas substâncias também colaborou para este resultado.

Ainda em relação aos reatores semi-contínuos, também foi verificado que a concentração inicial de glicerol interferiu nos resultados. Em todos os parâmetros de produção de H₂ avaliados, o desempenho do RSC1, em que foi inserido 10 g/L de glicerol, foi maior do que o RSC2, alimentado com 50 g/L. Isto pode ser relacionado com o pH e formação de outros produtos intermediários, além dos AGV analisados.

Conforme Sarma et al (2013), em maiores concentrações de glicerol afluente, a formação de outros produtos finais é favorecida, o que também contribui para o menor rendimento de H₂. Quando o glicerol está presente em menores proporções, os ácidos produzidos são consumidos, já que há ausência de fonte carbonácea disponível em excesso, o que também evita a queda brusca do pH. Além disso, de acordo com Chookaew, O-Thong &

Prasertsan (2014), quando o glicerol está presente em excesso, há maior tendência de formação de 1,3-PD do que H_2 . Sendo assim, os produtos que induzem a produção concomitante de H_2 , como os AGV avaliados, não são gerados.

Desta forma, considera-se a maior concentração de glicerol favoreceu a formação de outros produtos finais, o que também explica o menor grau de acidificação obtido. Cabe ressaltar que o grau de acidificação relaciona a DQO dos AGV gerados (ácidos acético, propiônico e butírico) com a DQO de alimentação. No RSC2, este valor esteve próximo de 0,2 em todo o período operacional, ou seja, apenas 20% do alimento foi convertido a AGV, contra a mediana de cerca de 45% do RC1.

No presente trabalho, os reatores contínuos não apresentaram bom desempenho de produção de H_2 . Segundo Arimi et al (2015), os reatores CSTR são sensíveis a variação nas condições de pH, temperatura e TDH. Os autores ainda ressaltam que este modelo operacional apresenta limitação em relação à retenção de biomassa, principalmente quando baixos TDH são empregados. Por isso, neste trabalho optou por empregar modelo de CSTR modificado, utilizando material suporte para aderência dos microrganismos. Mesmo assim, esta alteração não foi suficiente para alcançar resultados satisfatórios.

A ineficiência dos reatores contínuos pode estar associada a 4 motivos principais: pH, direcionamento da rota metabólica para a formação de ácido propiônico e outros intermediários não relacionados com a produção de H_2 , acúmulo de SVT e condições microaerófilas.

O pH apresentou constante queda até alcançar o valor de 3,5, após 30 e 17 dias após o início da operação no RC1 e RC2, respectivamente, o que coincide com o período em são cessadas a produção de gás e H_2 . De acordo com o grau de acidificação encontrado apresentou mediana de 0,25 em RC1 e 0,17 em RC2. Verifica-se que apenas uma pequena parcela da DQO inicial foi convertida a AGV. Sendo assim, isto pode ser relacionado com a formação de outros subprodutos, além dos AGV analisados.

Ressalta-se que o pH exerce influência sobre os intermediários. Produtos de fermentação reduzidos, como álcoois, representam H_2 não liberado sob a forma de gás. Os produtos formados pelo mesmo microrganismo variam de acordo com as condições ambientais (MAINTINGUER, HATANAKA & OLIVEIRA, 2015), como o pH. Sarma et al (2015) citam que o decréscimo do pH devido à acumulação de subprodutos é um dos principais desafios encontrados na conversão de glicerol em H_2 .

A partir da análise da diversidade microbiana nos reatores contínuos, se verificou a influência da família *Veillonellaceae* (*Pectinatus*). Conforme Castelló et al (2009), Dennis et al (2013) e Xafenias, Anunobi & Mapelli (2015), membros do gênero *Pectinatus* são considerados organismos de baixo rendimento de H₂ devido à produção de ácido propiônico. Esta verificação corroborou a maior proporção de ácido propiônico, em relação aos outros AGV encontrados nos reatores contínuos.

Além do ácido propiônico, também se acredita que tenham sido gerados outros intermediários. Como foram utilizadas as mesmas concentrações de glicerol dos reatores semi-contínuos (10 e 50 g/L), a elas são associadas o menor rendimento de H₂, bem como a formação de outros produtos, como álcoois e 1,3-PD.

Verificou-se elevadas concentrações de SVT, tanto no meio líquido, como aprisionadas no meio suporte. Contudo, acredita-se que ao invés de ser benéfico, este acúmulo diminuiu a produção de H₂. Qureshi et al (2005) comentam que as substâncias poliméricas extracelulares (EPS) são responsáveis pela funcionalidade e integridade dos biofilmes, devido às suas forças coesivas.

De acordo com Barros et al (2010), a acumulação de biofilme é mais elevada em elevadas cargas de substrato. A presença de excesso de carbono disponível favorece a produção de EPS ao invés de formação de células, o que conseqüentemente afeta a concentração de biomassa ativa. Além disso, os autores também comentam que a proporção de EPS pode variar em torno de 50 a 90% da matéria orgânica encontrada.

Kumar & Das (2001) e Kim et al (2006) comentam um dos principais problemas relacionados aos sistemas imobilizados é a retenção de biogás. Além da acumulação de gás, Peixoto et al (2011) constataram níveis de CO₂ acima de 90% no biogás, devido à redução de espaços vazios no material suporte, causada pelo excesso de biomassa.

Sendo assim, segundo os autores supracitados, acredita-se que os elevados valores de SVT encontrados não necessariamente estavam associados à biomassa ativa, mas sim a EPS. O seu acúmulo nos interstícios do meio suporte podem reter o biogás e não favorecer a produção de H₂.

Por isso, uma das estratégias sugeridas por Andreani et al (2015) e Perna et al (2013) para assegurar estabilidade de produção de H₂ em sistema contínuo é a remoção regular de biomassa do reator para evitar acúmulo. Esta mesma constatação é válida para este trabalho, já

que a retenção de lodo no sistema contínuo pareceu diminuir e inibir a produção de H_2 , o que não foi verificado nos reatores semi-contínuos, em que foi realizado controle de TDC.

Por fim, a análise de diversidade revelou a presença das famílias *Burkholderiaceae* e *Acetobacteraceae*, e ambas foram associadas à presença de oxigênio. A primeira família também foi encontrada por Júnior, Etchebehere & Zaiat (2015), e relacionada associada a condições microaerofílicas. Desta forma, acredita-se que estes organismos indicaram a presença de condições não favoráveis de produção de H_2 , mesmo em abundância relativa inferior à 10%.

A mesma consideração feita nos semi-contínuos relacionada à concentração inicial de glicerol nos reatores pode ser realizada para os contínuos. Em geral, o reator com menor concentração de substrato apresentou melhores resultados. Entretanto, como os mesmos não apresentaram estabilidade durante a operação, esta constatação não pode ser comprovada.

É importante destacar que o mau desempenho dos reatores contínuos também possa ser decorrente do acúmulo de impurezas contidas no glicerol. Devido à característica de operação dos semi-contínuos, em que 60% do conteúdo do reator foi retirado e 40% mantido, a taxa de diluição (quociente da vazão aplicada pelo volume de reator) verificada foi $0,6\text{ d}^{-1}$. Já nos contínuos, este valor foi igual a $1,0\text{ d}^{-1}$. Por isso, acredita-se que o colapso dos reatores contínuos se deu em menos tempo.

5.3 Considerações finais

O presente trabalho foi realizado em três etapas. A primeira, empregando reatores em batelada, verificou-se que a utilização de glicerol como substrato orgânico foi promissora, obtendo-se valores de produtividade de H_2 próximos dos encontrados quando a sacarose foi utilizada. Contudo, elevadas concentrações de glicerol podem apresentar efeito inibitório na produção de H_2 , possivelmente devido à presença de impurezas contidas neste substrato.

A segunda etapa foi realizada a fim de avaliar o regime de operação semi-contínuo na produção de H_2 , utilizando lodo anaeróbio pré-tratado suspenso. Foram verificados resultados satisfatórios em relação à produtividade volumétrica, quando comparados com os valores encontrados na literatura. Contudo, a principal desvantagem observada deste modelo foi o baixo rendimento de H_2 . Os principais AGV formados, nas concentrações testadas, foram ácidos acético e butírico.

Por fim, a terceira etapa teve como objetivo testar reatores contínuos, com biomassa pré-tratada aderida para produção de H_2 , para comparação com os resultados dos semi-contínuos. Os contínuos não apresentaram resultados satisfatórios de produção de H_2 em todos os parâmetros avaliados. O principal ácido encontrado foi o propiônico, em ambas as concentrações de substrato utilizadas.

Sendo assim, foi possível verificar que o modelo operacional semi-contínuo é de simples operação, e requer dispositivo para retirada do meio reacional, sem a necessidade de etapa adicional de decantação, que é necessária em AnSBR, ou a utilização de biomassa aderida, como em AnSBBR.

Foram obtidos elevados valores de volume e porcentagem de H_2 nos primeiros dias de operação, que interferiram diretamente na produtividade volumétrica. Contudo, para os mesmos serem validados, recomenda-se que o acompanhamento de novas partidas dos reatores semi-contínuos seja realizado.

Na Tabela 13, os resultados deste trabalho foram confrontados com valores encontrados na literatura, em que foram utilizados outros modelos operacionais. Vale destacar que a avaliação da produtividade volumétrica foi baseada nos valores máximos deste parâmetro apresentados pela literatura. Em geral, as pesquisas mostradas não informam a duração dos experimentos contínuos, e se informam, os mesmos são bastante reduzidos, o que impede a comparação da produtividade em longos períodos operacionais.

Os trabalhos de Ito et al (2005), Chookaew, O-Thong & Prasertsan (2014), Lo et al (2013) e Reungsang, Sittijunda & O-Thong (2013) se destacam pelas elevadas produtividades volumétricas de H_2 encontradas, com CSTR e UASB. Cabe ressaltar que as pesquisas citadas empregaram culturas puras de microrganismos.

No trabalho de Ferreira (2014), em que foi utilizado RALF e lodo misto, foi relatada produtividade volumétrica máxima de 36208 mL H_2 /L.d, valor muito superior dos máximos encontrados neste trabalho. Acredita-se que o mesmo se deu devido à condição termofílica (55°C), bem como o baixo TDH empregado. Além do parâmetro citado, destaca-se também o elevado rendimento obtido, de 3 mols mol H_2 /mol glicerol bruto.

É possível verificar que nos trabalhos de Moncayo Bravo et al (2015) e Lovato et al (2015), em que foram empregados AnSBBR e inóculo misto, as maiores produtividades volumétricas, quando utilizado glicerol bruto, foram de 200 e 217 mL H_2 /L.d, respectivamente. Estes valores são inferiores aos encontrados no presente trabalho, quando utilizada a concentração de 10 g/L.

O trabalho Sarma et al (2015) relatou o emprego do modelo semi-contínuo para a produção de H_2 utilizando glicerol como substrato orgânico. Os autores encontraram elevados valores, tanto de produtividade como de rendimento. Os mesmos podem ser decorrentes de alguns controles aplicados durante a operação do reator. Além do emprego de cultura pura, também foi realizado o controle do pH e borbulhamento de nitrogênio gasoso (para diminuir a pressão parcial de H_2) durante o processo fermentativo.

De acordo com os trabalhos mostrados que utilizaram glicerol como substrato em sistemas contínuos, verificou-se elevados rendimentos e produtividades volumétricos empregando culturas puras e sistemas termofílicos. Contudo, como citado por Maintinguer, Hatanaka & Oliveria (2015), culturas puras não representam situações reais, por exemplo, a utilização de efluente industrial. Para manutenção da cepa escolhida, é necessária etapa prévia de esterilização do substrato, o que representa um custo adicional, bem como o uso de altas temperaturas que podem inviabilizar o processo. Desta forma, o desenvolvimento de pesquisas, otimizando os parâmetros para maior eficiência de produção de H_2 , empregando culturas mistas e ambientes mesofílicos é de suma importância.

Uma das possibilidades para melhorar o rendimento de H_2 neste modelo operacional é a otimização do TDH. Este parâmetro foi arbitrariamente escolhido neste trabalho, já que não havia na literatura informações a respeito da operação semi-contínua. Além do TDH, as concentrações de glicerol empregadas também podem ter favorecido a formação de outros intermediários, que não os AGV relacionados com a produção de H_2 . Sendo assim, acredita-se que um melhor desempenho pode ser obtido a partir da avaliação de outros valores de ambos os parâmetros.

Conforme Gavala, Skiadas & Ahring (2006), há uma tendência distinta entre eficiência técnica e econômica de produção de H_2 . A primeira é baseada no rendimento e a segunda, na produtividade volumétrica. Este paralelo pode ser realizado para o modelo semi-contínuo, de acordo com os resultados obtidos no presente trabalho. Sendo assim, este modelo operacional apresentou promissora eficiência econômica. Contudo, a eficiência técnica também deve ser aprimorada.

Tabela 13: Comparação dos resultados encontrados na bibliografia utilizando glicerol (puro e bruto) como substrato em sistemas contínuos, com os dados obtidos neste trabalho.

Autores	Inóculo	Tipo de Reator	TDH e temperatura	Concentração de glicerol ou COV	Maior produção de H₂	Maior rendimento molar
Moncayo Bravo et al (2015)	Lodo anaeróbio	AnSBBR	4 h 30°C	5 g/L	1512 mL H ₂ /L.d (puro) 200 mL H ₂ /L.d (bruto)	Não informado
Ito et al. (2005)	<i>Enterobacter aerogenes</i> HU-101	Contínuo com leito fixo	10 h 37°C	10 g/L	46272 mL H ₂ /L.d (puro) 36439 mL H ₂ /L.d (bruto)	1,12 mol H ₂ /mol (bruto)
Temudo et al (2008)	Cultura anaeróbia mista	CSTR	10 h 30°C		Não informado	0,05 mol/mol glicerol
Nazareth (2015)	Lodo anaeróbio de ETE aderido	RALF	8 a 0,5 h 30°C	5 g/L	316,3 mL/L.d	Não informado
Chookaew, O-Thong & Prasertsan (2014)	<i>Klebsiella sp. TR17</i> em condições não estéreis	UASB	4 h 40°C	30 g/L	5835 mL H ₂ /L.d	Não informado
Lo et al (2013)	<i>Clostridium pasteurianum</i> CH4	CSTR	12 h 35°C	10 g/L	2474 mL H ₂ /L.d (puro) 3984 mL H ₂ /L.d (bruto)	0,50 mol H ₂ /mol (puro) 0,77 mol H ₂ /mol (bruto)
Reungsang, Sittijunda & O-Thong (2013)	<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	UASB	24 h 37°C	50 g/L.d	4824 mL H ₂ /L.d (puro) 3333 mL H ₂ /L.d (bruto)	0,41 mol H ₂ /mol (puro) 0,32 mol H ₂ /mol (bruto)
Lovato et al (2015)	Lodo anaeróbio	AnSBBR	3 e 4 h 30°C	4 g/L (puro) 5 g/L (bruto)	2258 mL H ₂ /L.d (puro) 217 mL H ₂ /L.d (bruto)	1,19 mol H ₂ /mol (puro) 0,10 mol H ₂ /mol (bruto)
Sarma et al (2015)	<i>Enterobacter aerogenes</i> NRRL B-407	Semi- contínuo	40 e 64 h Não	60 e 120 g/L	4800 e 5180 mL H ₂ /L.d (60 e 120 g/L,	4,06 e 4,19 mols H ₂ /mol glicerol (60 e

			informado		respectivamente)	120 g/L, respectivamente)
Jitrung & Yargeau (2015)	<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 35029	CSTR	±52 h 37°C	18,5 g/L	Não informado	0,86 mol H ₂ /mol glicerol
Silva-Illanes et al (2015)	Lodo ativado	CSTR	12 h Não informado	10 g/L	Não informado	0,41 mol H ₂ /mol glicerol bruto
Ferreira (2014)	Lodo anaeróbio	RALF	1 h 55°C	5 g/L	36208 mL H ₂ /L.d	3 mols mol H ₂ /mol glicerol bruto
Este trabalho	Lodo anaeróbio	Contínuo com biomassa aderida	24 h 35°C	10 g/L	Abaixo de 45 mL H ₂ /L.d (ambas as concentrações)	Abaixo de 0,007 mol H ₂ /mol glicerol (ambas as concentrações)
Este trabalho	Lodo anaeróbio	Semi- contínuo	24 h 35°C	10 e 50 g/L	Máximo de 2340 e 2928 mL H ₂ /L.d e mediana de 350 e 130 mL H ₂ /L.d (10 e 50 g/L, respectivamente)	Máximo de 3,58 e 0,24 mols H ₂ /mol glicerol e mediana de 0,25 e 0,01 mol H ₂ /mol glicerol (10 e 50 g/L, respectivamente)

Fonte: a autora

5 CONCLUSÃO

O glicerol apresentou resultados satisfatórios nos testes em batelada realizados na primeira etapa deste trabalho. Verificou-se queda da eficiência de conversão do glicerol quando maiores relações A/M foram empregadas. Os AGV predominantes foram os ácidos acético e butírico, alcançando grau de acidificação de até 80%. As produtividades volumétricas por massa de DQO removida, volumétrica e específica foram próximas e até superiores às obtidas com sacarose.

Os reatores semi-contínuos foram operados utilizando as concentrações de 10 e 50 g/L de glicerol durante 132 dias. Verificou-se maior eficiência de conversão de substrato e melhores resultados de produção de gás e estabilidade no reator alimentado com a menor concentração de substrato, mas com tendência de diminuição ao longo do experimento. Em ambas as concentrações, os AGV predominantes foram acético e butírico.

A maior concentração de glicerol favoreceu o decaimento brusco dos valores da produção de gás, bem como diminuição do grau de acidificação. Acredita-se que a utilização da maior concentração afluente pode ter favorecido a formação de outros produtos intermediários, além dos AGV. Os rendimentos máximos foram de 3,58 e 0,24 mols H₂/mol glicerol, e produtividade volumétrica de 2340 e 2928 mL H₂/L.d, no reator com 10 e 50 g/L, respectivamente. Contudo, a mediana do rendimento, em ambos reatores ao decorrer do experimento foi de 0,25 e 0,01 mols H₂/mol glicerol e a mediana da produtividade volumétrica de 350 e 130 mL H₂/L.d;

Os reatores contínuos foram operados durante 62 dias, nas concentrações de 10 e 50 g/L de glicerol. Contudo, não foram verificados resultados satisfatórios de produção de H₂. Constatou-se elevadas concentrações de SVT, tanto no meio líquido, como aprisionadas no meio suporte, mas acredita-se que os SVT encontrados no material suporte não necessariamente estavam associados à biomassa ativa, e que podem ter interferido no desempenho dos reatores. O pH dos reatores contínuos apresentou constante queda até alcançar o valor de 3,5, mais pronunciada na maior concentração afluente, quando foi cessada a produção de gás e H₂. Em ambos os reatores contínuos, o AGV predominante foi o propiônico.

Nos dois reatores semi-contínuos, a modificação na comunidade predominante no início e ao final do teste foi semelhante. A elevada produção de H₂ foi relacionada à abundância da família *Enterobacteriaceae* (gêneros *Enterobacter*, desconhecido, *Erwinia*, outros e

Citrobacter). Por outro lado, a baixa produção foi associada à família *Clostridiaceae* (gêneros *Clostridium* e desconhecido).

A diversidade microbiana nos reatores contínuos mostrou a influência da família *Veillonellaceae* (*Pectinatus*), organismos de baixo rendimento de H₂ devido à produção de ácido propiônico. Esta verificação corroborou a maior proporção de ácido propiônico, em relação aos outros AGV encontrados neste modelo operacional. Além da família citada, também foi encontrada, em proporção menor do que 10% da abundância relativa, a presença das famílias *Burkholderiaceae* e *Acetobacteraceae*, ambas associadas à presença de oxigênio. Sendo assim, acredita-se que estes organismos indicaram a presença de condições não favoráveis de produção de H₂.

7 RECOMENDAÇÕES

Para a realização de trabalhos futuros com reatores semi-contínuos visando a produção de hidrogênio, utilizando glicerol como substrato e inóculo misto pré-tratado, recomenda-se:

- Realizar novas partidas dos reatores semi-contínuos, para comprovação dos elevados valores de volume e porcentagem de H₂ obtidos nos primeiros dias de operação, bem como encontrar a justificativa de sua ocorrência;
- Avaliar diferentes TDH, menores do que 24 h, na tentativa de melhorar o rendimento de produção de H₂;
- Monitorar a concentração de álcoois e 1,3-PD durante a operação dos reatores, além dos parâmetros de monitoramento empregados neste trabalho, para a avaliação e identificação de possíveis modificações de rotas metabólicas dos microrganismos presentes;
- Controlar o pH na faixa entre 5 a 6, durante o processo fermentativo, no intuito de minimizar a formação de subprodutos não relacionados com a produção de H₂;
- Testar diferentes concentrações de substrato, para identificar a melhor faixa a ser inserida nos reatores semi-contínuos e maximizar a produção de H₂, bem como minimizar o efeito inibitório das impurezas contidas no glicerol;
- Realizar o pré-tratamento do glicerol, no intuito de diminuir a concentração de substâncias inibitórias ao processo biológico.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAD-ANDALOUSSI, S.; DÜRR, C.; RAVAL, G.; PETITDEMANGE, H. Carbon and electron flow in *Clostridium butyricum* grown in chemostat culture on glycerol and on glucose. **Microbiology**, v. 142, n. 5, p. 1149-1158, 1996.
- AKUTSU, Y.; LEE, D. Y.; LI, Y. Y.; NOIKE, T. Hydrogen production potentials and fermentative characteristics of various substrates with different heat-pretreated natural microflora. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, n. 13, p. 5365-5372, 2009.
- ALGAPANI, D. E.; QIAO, W.; SU, M.; PUMPO, F.; WANDERA, S. M.; ADANI, F.; DONG, R. Bio-hydrolysis and bio-hydrogen production from food waste by thermophilic and hyperthermophilic anaerobic process. **Bioresource Technology**, v. 216, p. 768-777, 2016.
- ALMEIDA, J. R. M.; FÁVARO, L. C. L.; QUIRINO, B. F. Biodiesel biorefinery: opportunities and challenges for microbial production of fuels and chemicals from glycerol waste. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, n. 1, p. 1, 2012.
- AMARAL, P. F. F.; FERREIRA, T. F.; FONTES, G. C.; COELHO, M. A. Z. Glycerol valorization: new biotechnological routes. **Food and Bioproducts Processing**, v. 87, n. 3, p. 179-186, 2009.
- ANDREANI, C. L.; TORRES, D. G. B.; SCHULTZ, L.; CARVALHO, K. Q.; GOMES, S. D. Hydrogen production from cassava processing wastewater in an anaerobic fixed bed reactor with bamboo as a support material. **Engenharia Agrícola**, v. 35, n. 3, p. 578-587, 2015.
- ANGENENT, L. T.; KARIM, K.; AL-DAHMAN, M. H.; WRENN, B. A.; DOMÍNGEZ-ESPINOSA, R. Production of bioenergy and biochemicals from industrial agricultural wastewater. **Trends in Biotechnology**, v. 22, n. 9, p. 476 – 485, 2004.
- ANP - AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. Boletim mensal do biodiesel. Rio de Janeiro, novembro de 2016. 13 p. Disponível em: < <http://www.anp.gov.br/wwwanp/publicacoes/boletins-anp/2386-boletim-mensal-do-biodiesel> >. Acesso em: 20 dezembro 2016.
- APHA - AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 22th Ed., APHA/AWWA/WEF, 2012.
- AQUINO, S.F.; CHERNICHARO, C.A.L. Acúmulo de ácidos graxos voláteis (AGVs) em reatores anaeróbios sob estresse: causas e estratégias de controle. **Engenharia Sanitária Ambiental**, v. 10, n. 2, p. 152-161, 2005.
- ARIMI, M. M.; KNODEL, J.; KIPROP, A.; NAMANGO, S. S.; ZHANG, Y.; GEIBEN, S. U. Strategies for improvement of biohydrogen production from organic-rich wastewater: a review. **Biomass and Bioenergy**, v. 75, p. 101-118, 2015.
- BABU, V. L.; MOHAN, S. V.; SARMA, P. N. Influence of reactor configuration on fermentative hydrogen production during wastewater treatment. **International Journal of Hydrogen Energy**, n. 34, p. 3305 – 3312, 2009.

BARBIRATO, F.; CAMARASA-CLARET, C.; GRIVET, J. P.; BORIES, A. Glycerol fermentation by a new 1,3-propanediol-producing microorganism: *Enterobacter agglomerans*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 43, n. 5, p. 786-793, 1995.

BARBIRATO, F.; HIMMI, E. H.; CONTE, T.; BORIES, A. 1,3-Propanediol production by fermentation: an interesting way to valorize glycerin from the ester and ethanol industries. **Industrial Crops and Products**, v. 7, n. 2, p. 281-289, 1998.

BARROS, A. R.; AMORIN, E. L. C.; REIS, C. M.; SHIDA, G. M.; SILVA, E. L. Biohydrogen production in anaerobic fluidized bed reactors: Effect of support material and hydraulic retention time. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, n. 8, p. 3379-3388, 2010.

BATES S.T., BERG-LYONS D., CAPORASO J.G.; WALTERS, W. A.; KNIGHT, R.; FIERER, N. Examining the global distribution of dominant archaeal populations in soil. **The ISME Journal**, v. 5, p. 908-917, 2011.

BEN - BALANÇO ENERGÉTICO NACIONAL 2016. **Relatório Síntese ano base 2015**. Empresa de Pesquisa Energética – EPE. 62 p. Rio de Janeiro, 2016. Disponível em: <https://ben.epe.gov.br/downloads/S%c3%adntese%20do%20Relat%c3%b3rio%20Final_2016_Web.pdf>. Acesso em: 27 de dezembro de 2016.

BENGTSSON, S.; HALLQUIST, J.; WERKER, A.; WELANDER, T. Acidogenic fermentation of industrial wastewaters: effects of chemostat retention time and pH on volatile fatty acids production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 40, n. 3, p. 492-499, 2008.

BERNAL, M.; TINOCO, L. K.; TORRES, L.; MALAGÓN-ROMERO, D.; MONTOYA, D. Evaluating Colombian *Clostridium* spp. strains hydrogen production using glycerol as substrate. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 5-5, 2013.

BEZERRA, R. A.; RODRIGUES, J. A. D.; RATUSZNEI, S. M.; CANTO, C. S. A.; ZAIAT, M. Effect of organic load on the performance and methane production of an AnSBBR treating effluent from biodiesel production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 165, n. 1, p. 347-368, 2011

BIEBL, H. Fermentation of glycerol by *Clostridium pasteurianum* - batch and continuous culture studies. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 27, n. 1, p. 18-26, 2001.

BOENIGK, R.; BOWIEN, S.; GOTTSCHALK, G. Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol in continuous cultures of *Citrobacter freundii*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 4, p. 453-457, 1993.

BORZANI, W. **Fermentação Semi-contínua**. In: SCHIMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (Coord). Engenharia Bioquímica. 1ª Ed., v. 2: Edgard Blücher, p. 219-222, 2001.

BOSIO, M. **Produção de hidrogênio e metabólitos em reator anaeróbio de leito fluidizado e em reator de leito granular expandido a partir de glicerol**. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Engenharia Química, São Carlos, 2014.

BRIONES, A.; RASKIN, L. Diversity and dynamics of microbial communities in engineered environments and their implications for process stability. **Current Opinion in Biotechnology**, n. 14, p. 270 – 276, 2003.

CASTELLÓ, E.; GARCIA Y SANTOS, C.; IGLESIAS, T.; PAOLINO, G.; WENZEL, J.; BORZACCONI, L.; ETCHEBEHERE, C. Feasibility of biohydrogen production from cheese whey using a UASB reactor: links between microbial community and reactor performance. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, n. 14, p. 5674-5682, 2009.

CGEE - CENTRO DE GESTÃO E ESTUDOS ESTRATÉGICOS. **Hidrogênio energético no Brasil - Subsídios para políticas de competitividade: 2010 – 2025**; Tecnologias críticas e sensíveis em setores prioritários, Brasília, 72p, 2010.

CHEN, C. C.; LIN, C. Y. Using sucrose as a substrate in an anaerobic hydrogen-producing reactor. **Advances in Environmental Research**, v. 7, n. 3, p. 695-699, 2003.

CHEN, W. H. **Biological hydrogen production by anaerobic fermentation**. Tese (Doutorado). Iowa State University, Environmental Engineering, Iowa, 2006.

CHEN, W. H.; CHEN, S. Y.; KHANAL, S. K.; SUNG, S. Kinetic study of biological hydrogen production by anaerobic fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 31, n. 15, p. 2170-2178, 2006.

CHEONG, D. Y.; HANSEN, C. L. (2006) Acidogenesis characteristics of natural, mixed anaerobes converting carbohydrate-rich synthetic wastewater to hydrogen. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1736 – 1745.

CHI, Z.; PYLE, D.; WEN, Z.; FREAR, C.; CHEN, S. A laboratory study of producing docosahexaenoic acid from biodiesel-waste glycerol by microalgal fermentation. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 11, p. 1537-1545, 2007.

CHOOKAEW, T.; O-THONG, S.; PRASERTSAN, P. Biohydrogen production from crude glycerol by immobilized *Klebsiella sp. TR17* in a UASB reactor and bacterial quantification under non-sterile conditions. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 18, p. 9580-9587, 2014.

CHOW, P. S.; LANDHÄUSSER, S. M. A method for routine measurements of total sugar and starch content in woody plant tissues. **Tree Physiology**, v. 24, n. 10, p. 1129-1136, 2004.

COSTA, J. B.; ROSSI, D. M.; DE SOUZA, E. A.; SAMIOS, D.; BREGALDA, F.; PERALBA, M. C. R.; FLORES, S. H.; AYUB, M. A. The optimization of biohydrogen production by bacteria using residual glycerol from biodiesel synthesis. **Journal of Environmental Science and Health, Part A**, v. 46, n. 13, p. 1461-1468, 2011.

CUETOS, M.; GÓMEZ, X.; OTERO, M.; MORÁN, A. Anaerobic digestion of solid slaughterhouse waste: study of biological stabilization by Fourier Transform infrared spectroscopy and thermogravimetry combined with mass spectrometry. **Biodegradation**, v. 21, n. 4, p. 543–56, 2010.

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

DAS, D.; VEZIROGLU, T. N. Advances in biological hydrogen production processes. **International Journal of Hydrogen Energy**, n. 33, p. 6046 – 6057, 2008.

DAVILA-VAZQUEZ, G.; ALATRISTE-MONDRAGÓN, F.; LÉON-RODRÍGUEZ, A.; RAZO-FLORES, R. Fermentative hydrogen production in batch experiments using lactose, cheese whey and glucose: Influence of initial substrate concentration and pH. **International Journal of Hydrogen Energy**, n. 33, p. 4989 – 4997, 2008.

DAVILA-VAZQUEZ, G.; COSTA-NAVARRO, C. B.; ROSALES-COLUNGA, L. M.; LEÓN-RODRÍGUES, A.; RAZO-FLORES, E. Continuous biohydrogen production using cheese whey: improving the hydrogen production rate. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, n. 10, p. 4296-4304, 2009.

DE OLIVEIRA FABER, M.; FERREIRA-LEITÃO, V. S. Optimization of biohydrogen yield produced by bacterial consortia using residual glycerin from biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 219, p. 365-370, 2016.

DE SÁ, L. R. V. **Produção biológica de hidrogênio por bactérias fermentativas utilizando diferentes carboidratos ou glicerina como substrato**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, 2011.

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

DEMIRBAS, A. **Biohydrogen: For future engine fuel demands – Green Energy and Technology**. Ed. Springer-Verlag, Turkey, 275p, 2009.

DEMIREL, B.; SCHERER, P.; YENIGUN, O.; ONAY, T. T. Production of methane and hydrogen from biomass through conventional and high-rate anaerobic digestion processes. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, n. 40, p. 116 – 146, 2010.

DENNIS, P. G.; HARNISCH, F.; YEOH, Y. K.; TYSON, G. W.; RABAEY, K. Dynamics of cathode-associated microbial communities and metabolite profiles in a glycerol-fed bioelectrochemical system. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 13, p. 4008-4014, 2013.

DIAZ, E.E., STAMS, A.J.M., AMILS, R., SANZ, J.L. Phenotypic properties and microbial diversity of methanogenic granules from a full-scale upflow anaerobic sludge bed reactor treating brewery wastewater. **Applied and Environmental Microbiology**, n. 72, p. 4942–4949, 2006.

DINCER, I.; ACAR, C. Review and evaluation of hydrogen production methods for better sustainability. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 40, n. 34, p. 11094-11111, 2015.

DROZDZYNSKA, A.; LEJA, K.; CZACZYK, K. Biotechnological production of 1, 3-propanediol from crude glycerol. **BioTechnologia. Journal of Biotechnology Computational Biology and Bionanotechnology**, v. 92, n. 1, 2011.

DROZDZYNSKA, A.; PAWLICKA, J.; KUBIAK, P.; KOŚMIDER, A.; PRANKE, D.; OLEJNIK-SCHMIDT, A.; CZACZYK, K. Conversion of glycerol to 1, 3-propanediol by *Citrobacter freundii* and *Hafnia alvei* – newly isolated strains from the *Enterobacteriaceae*. **New Biotechnology**, v. 31, n. 5, p. 402-410, 2014.

DRUMMOND, A. J.; RAMBAUT, A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. **BMC evolutionary biology**, v. 7, n. 1, p. 1, 2007.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

EDGAR, R.C. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. **Nature Methods**, v. 10, p. 996–998, 2013.

EL MANSSOURI, M. **Influência da carga orgânica na produção de biohidrogênio em ASBBR com agitação tratando água residuária sintética**. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

ENGLIS, D. T.; WOLLERMAN, L. A. Spectrophotometric study of dichromate-chromic salt mixtures. **Analytical Chemistry**, v. 24, n. 12, p. 1983-1985, 1952.

FANG, H. H. P.; LI, C.; ZHANG, T. Acidophilic biohydrogen production from rice slurry. **International Journal of Hydrogen Energy**, n. 31, p. 683 – 692, 2006.

FERNANDES, B. S.; PEIXOTO, G.; ALBRECHT, F. R.; AGUILA, N. K. S.; ZAIAT, M. Potential to produce biohydrogen from various wastewaters. **Energy for Sustainable Development**, v. 14, n. 2, p. 143-148, 2010.

FERREIRA, J. S. **Produção de hidrogênio em reator anaeróbico de leito fluidizado a partir de glicerol bruto sob condições termofílicas**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Engenharia Química, São Carlos, 2014.

FLORES, A. **Avaliação da estabilidade e da eficiência de um AnSBBR aplicado ao tratamento de água residuária de indústria metalúrgica**. Dissertação (Mestrado), Instituto Mauá de Tecnologia, Escola de Engenharia Mauá, São Caetano do Sul, 2009.

FOGLIA, D.; WUKOVITS, W.; FRIEDL, A.; VRIJE, T.; CLAASSEN, P. A. M. Fermentative hydrogen production: influence of application of mesophilic and thermophilic bacteria on mass and energy balances. **Chemical Engineering Transactions**, v. 25, 2011.

FORSBERG, C. W. Production of 1, 3-propanediol from glycerol by *Clostridium acetobutylicum* and other *Clostridium* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 4, p. 639-643, 1987.

GALLARDO, R.; FARIA, C.; RODRIGUES, L. R.; PEREIRA, M. A.; ALVES, M. M. Anaerobic granular sludge as a biocatalyst for 1,3-propanediol production from glycerol in continuous bioreactors. **Bioresource Technology**, v. 155, p. 28-33, 2014.

GAVALA, H. N.; SKIADAS, I. V.; AHRING, B. K. Biological hydrogen production in suspended and attached growth anaerobic reactor systems. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 31, n. 9, p. 1164-1175, 2006.

GINKEL, S. V.; SUNG, S.; LAY, J. J. Biohydrogen production as a function of pH and substrate concentration. **Environmental Science & Technology**, v. 35, n. 24, p. 4726-4730, 2001.

GRUPE, H.; GOTTSCHALK, G. Physiological events in *Clostridium acetobutylicum* during the shift from acidogenesis to solventogenesis in continuous culture and presentation of a model for shift induction. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 12, p. 3896-3902, 1992.

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

HALLENBECK, P. C.; GHOSH, D. Advances in fermentative biohydrogen production: The way forward? **Trends in Biotechnology**, v. 27, n. 5, 2009.

HAMILTON, C.; HILIGSMANN, S.; BECKERS, L.; MASSET, J.; WILMOTTE, A.; THONART, P. Optimization of culture conditions for biological hydrogen production by *Citrobacter freundii* CWBI952 in batch, sequenced-batch and semicontinuous operating mode. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, n. 3, p. 1089-1098, 2010.

HAWKES, F. R.; DINSDALE, R.; HAWKES, D. L.; HUSSY, I. Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimisation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 27, n. 11, p. 1339-1347, 2002.

HAWKES, F. R.; HUSSY, I.; KYAZZE, G.; DINSDALE, R.; HAWKES, D. L. Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: principles and progress. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 32, n. 2, p. 172-184, 2007.

HOMANN, T.; TAG, C.; BIEBL, H.; DECKWER, W. D.; SCHINK, B. Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol by *Klebsiella* and *Citrobacter* strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 2, p. 121-126, 1990.

HONG, F.; BREITLING, R.; MCENTEE, C. W.; WITTNER, B. S.; NEMHAUSER, J. L.; CHORY, J. RankProd: a bioconductor package for detecting differentially expressed genes in meta-analysis. **Bioinformatics**, v. 22, n. 22, p. 2825-2827, 2006.

HUNG, C. H.; LEE, K. S.; CHENG, L. H.; HUANG, Y. H.; LIN, P. J.; CHANG, J. S. Quantitative analysis of a high-rate hydrogen-producing microbial community in anaerobic agitated granular sludge bed bioreactors using glucose as substrate. **Applied Microbiology Biotechnology**, n. 75, p. 693 – 701, 2007.

IEA – INTERNATIONAL ENERGY AGENCY. **World energy outlook 2016: Executive Summary**. OECD/IEA, 2016. Disponível em: <<https://www.iea.org/publications/freepublications/publication/WorldEnergyOutlook2016ExecutiveSummaryEnglish.pdf>>, acesso em 27/12/2016.

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

JITRWUNG, R.; YARGEAU, V. Biohydrogen and bioethanol production from biodiesel-based glycerol by *Enterobacter aerogenes* in a continuous stir tank reactor. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 5, p. 10650-10664, 2015.

JÚNIOR, A. D. N. F.; ETCHEBEHERE, C.; ZAIAT, M. Mesophilic hydrogen production in acidogenic packed-bed reactors (APBR) using raw sugarcane vinasse as substrate: Influence of support materials. **Anaerobe**, v. 34, p. 94-105, 2015.

KAWAGOSHI, Y.; HINO, N.; FUJIMOTO, A.; NAKAO, M.; FUJITA, Y.; SUGIMURA, S.; FURUKAWA, K. Effect of inoculum conditioning of hydrogen fermentation and pH effect on bacterial community relevant to hydrogen production. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 100, n. 5, p. 524 – 530, 2005.

KAPDAN, I. K.; KARGI, F. Bio-hydrogen production from waste materials. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, n. 5, p. 569-582, 2006.

KHANAL, S. K.; CHEN, W. H.; LI, L.; SUNG, S. Biological hydrogen production: effects of pH and intermediate products. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 29, n. 11, p. 1123-1131, 2004.

KIM, M. S.; OH, Y. K.; YUN, Y. S.; LEE, D. Y. Fermentative hydrogen production from anaerobic bacteria using a membrane bioreactor. In: **Proceedings of the 16th World Hydrogen Energy Conference**. Lyon, France. 2006.

KIM, S. H.; HAN, S. K.; SHIN, H. S. Optimization of continuous hydrogen fermentation of food waste as a function of solids retention time independent of hydraulic retention time. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 2, p. 213-218, 2008.

KIVISTÖ, A.; SANTALA, V.; KARP, M. Hydrogen production from glycerol using halophilic fermentative bacteria. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 22, p. 8671-8677, 2010.

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 fluidized-bed bioreactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 97, n. 4, 2007.

KRSEK, M.; WELLINGTON, E. M. H. Comparison of different methods for the isolation and purification of total community DNA from soil. **Journal of Microbiological Methods**, v. 39, n. 1, p. 1-16, 1999.

KUMAR, N.; DAS, D. Continuous hydrogen production by immobilized *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08 using lignocellulosic materials as solid matrices. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 29, n. 4, p. 280-287, 2001.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics**, v. 5, n. 2, p. 150-163, 2004.

LAING, M. **Investigating the performance of a novel Anaerobic Sequencing Batch Reactor (AnSBR) and optimisation of operational parameters to treat synthetic winery wastewater**. Tese (Doutorado). Stellenbosch: Stellenbosch University, 2016.

LEE, D. Y.; LI, Y. Y.; NOIKE, T. Influence of solids retention time on continuous H₂ production using membrane bioreactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, n. 1, p. 52-60, 2010.

LEE, K. S.; LIN, P. J.; CHANG, J. S. Temperature effects on biohydrogen production in a granular sludge bed induced by activated carbon carriers. **International Journal of Hydrogen Energy**, n. 31, p. 465 – 472, 2006.

LEE, K. S.; LIN, P. J.; FANGCHIANG, K.; CHANG, J. S. 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, 2007.

LEE, P. C.; LEE, W. G.; LEE, S. Y.; CHANG, H. N. Succinic acid production with reduced by-product formation in the fermentation of *Anaerobiospirillum succiniciproducens* using glycerol as a carbon source. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 72, n. 1, p. 41-48, 2001.

LEITE, J. A. C.; FERNANDES, B. S.; POZZI, E.; BARBOZA, M.; ZAIAT, M. Application of an anaerobic packed-bed bioreactor for the production of hydrogen and organic acids. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, n. 2, p. 579-586, 2008.

LETTINGA, G., HULSHOFF, POL, L.W.; ZEEMAN, G. **Biological Wastewater Treatment. Part I: Anaerobic Wastewater Treatment**. Lecture notes. Wageningen Agricultural University, 1996.

LEVIN, D. B.; PITT, L.; LOVE, M. (2004) Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. **International Journal of Hydrogen Energy**, n. 29, p. 173 – 185.

LI, C.; FANG, H. H. P. Fermentative hydrogen production from wastewater and solid wastes by mixed cultures. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 37, n. 1, p. 1-39, 2007.

LIMA, D. M. F.; ZAIAT, M. The influence of the degree of back-mixing on hydrogen production in an anaerobic fixed-bed reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.37, n. 12, p.9630-9635, 2012.

LIN, C. Y.; JO, C. H. Hydrogen production from sucrose using an anaerobic sequencing batch reactor process. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 78, n. 6, p. 678-684, 2003.

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

LIN, C. Y.; LEE, C. Y.; TSENG, I. C.; SHIAO, I. Z. Biohydrogen production from sucrose using base-enriched anaerobic mixed microflora. **Process Biochemistry**, n. 41, p. 915 – 919, 2006.

LIN, C. Y.; LAY, C. H.; SEM, B.; CHU, C. Y.; KUMAR, G.; CHEN, C. C.; CHANG, J. S. Fermentative hydrogen production from wastewaters: a review and prognosis. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 20, p. 15632-15642, 2012.

LIU, G.; SHEN, J. Effects of culture and médium conditions on hydrogen production from starch using anaerobic bacteria. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 98, n. 4, p. 251 – 256, 2004.

LIU, Z.; LV, F.; ZHENG, H.; ZHANG, C.; WEI, F.; XING, X. H. Enhanced hydrogen production in a UASB reactor by retaining microbial consortium onto carbon nanotubes (CNTs). **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 14, p. 10619-10626, 2012.

LO, Y. C.; CHEN, W. M.; HUNG, C. H.; CHEN, S. D.; CHANG, J. S. Dark H₂ fermentation from sucrose and xylose using H₂-producing indigenous bacteria: feasibility and kinetic studies. **Water Research**, v. 42, n. 4, p. 827-842, 2008.

LO, Y. C.; CHEN, X. J.; HUANG, C. Y.; YUAN, Y. J.; CHANG, J. S. Dark fermentative hydrogen production with crude glycerol from biodiesel industry using indigenous hydrogen-producing bacteria. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 35, p. 15815-15822, 2013.

LOGAN, B. E.; OH, S. E.; KIM, I. S.; VAN GINKEL, S. Biological hydrogen production measured in batch anaerobic respirometers. **Environmental Science & Technology**, v. 36, n. 11, p. 2530-2535, 2002.

LOPES, A. P.; CANESIN, E. A.; SUZUKI, R. M.; TONIN, L. T. D.; PALIOTO, G. F.; SEIXAS, F.L. Purificação de Glicerina Residual Obtida na Produção de Biodiesel a Partir de Óleos Residuais. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n. 6, p. 1564-1582, 2014.

LOVATO, G.; MONCAYO BRAVO, I. S.; RATUSZNEI, S. M.; RODRIGUES, J. A. D.; ZAIAT, M. The effect of organic load and feed strategy on biohydrogen production in an AnSBBR treating glycerin-based wastewater. **Journal of Environmental Management**, v. 154, p. 128-137, 2015.

LUO, G. L.; XIE, L.; ZOU, Z.; WANG, W.; ZHOU, Q.; SHIM, H. 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.

LUQUE, R.; MELERO, J. A. (Ed.). **Advances in biodiesel production: Processes and technologies**. Elsevier, 2012.

MAINTINGUER, S. I.; HATANAKA, R. R.; OLIVEIRA, J. E. **Glycerol as a Raw Material for Hydrogen Production**. In: BIERNAT, K. (Org.). *Biofuels - Status and perspective*. 1st Ed.: InTech, 2015, p. 477-497.

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, 2012.

MANSSOURI, M.; RODRIGUES, J. A. D.; RATUSZNEI, S. M.; ZAIAT, M. Effects of organic loading, influent concentration and feed time on biohydrogen production in a mechanically stirred ANSBBR treating sucrose-based wastewater. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 171, n. 7, p. 1832-1854, 2013.

MARQUES, P. A. S. S.; BARTOLOMEU, M. L.; TOMÉ, M. M.; NEVES, L.M. Bio-hydrogen production from glycerol by a strain of *Enrrobacter aerogenes*. **HYPOTHESIS VIII**, 2009.

MARU, B. T.; BIELEN, A. A. M.; CONSTANTINI, M.; MEDINA, F.; KENGEN, S. W. M. Glycerol fermentation to hydrogen by *Thermotoga maritima*: proposed pathway and bioenergetic considerations. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 14, p. 5563-5572, 2013.

METCALF, L.; EDDY, H. P. **Tratamento de efluentes e recuperação de recursos**. 5^a ed., McGraw Hill Brasil, 2008 p., 2015.

MEYER, F.; PAARMANN, D.; D'SOUZA, M.; OLSON, R.; GLASS, E. M.; KUBAL, M.; PACZIAN, T.; RODRIGUEZ, A.; STEVENS, R.; WILKE, A.; WILKENING, J.; EDWARDS, R. A. The metagenomics RAST server—a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. **BMC bioinformatics**, v. 9, n. 1, p. 1, 2008.

MME - MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA DO BRASIL. Roteiro para estruturação da economia do hidrogênio do Brasil. 2005. Disponível em <http://www.hytron.com.br/site/index.php?option=com_docman&task=cat_view&gid=54&Itemid=89&lang=pt>. Acesso em 3 de novembro de 2011.

MME - MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA; **Plano Decenal de Expansão de Energia 2024**. Brasília: Governo Federal. 2015. Disponível em: <<http://www.epe.gov.br/PDEE/PDE%202024.pdf>>. Acesso em: 27 de dezembro de 2016.

MOHAMMADSHIRAZI, A.; AKRAM, A.; RAFIEE, S.; KALHOR, E. B. Energy and cost analyses of biodiesel production from waste cooking oil. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.33, p. 44–49, 2014.

MOHAN, S. V. Fermentative hydrogen production with simultaneous wastewater treatment: influence of pretreatment and system operating conditions. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 67, p. 950 – 961, 2008.

MOHR, S. H.; WANG, J.; ELLEM, G.; WARD, J.; GIURCO, D. Projection of world fossil fuels by country. **Fuel**, v. 141. p. 120-135. 2015.

MONCAYO BRAVO, I. S.; LOVATO, G.; RODRIGUES, J. A. D.; RATUSZNEI, S. M.; ZAIAT, M. Biohydrogen Production in an AnSBBR Treating Glycerin-Based Wastewater: Effects of Organic Loading, Influent Concentration, and Cycle Time. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 175, n. 4, p. 1892-1914, 2015.

MONTEGGIA, L. O. Proposta de metodologia para avaliação do parâmetro Atividade Metanogênica Específica. In: **19º CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL**, ABES, Foz do Iguaçu, 1997.

MORIMOTO, M.; ATSUKO, M.; ATIF, A. A. Y.; NGAN, M. A.; FAKHRU'L-RAZI, A.; IYUKE, S. E.; BAKIR, A. M. (2004) Biological production of hydrogen from glucose by natural anaerobic microflora. **International Journal of Hydrogen Energy**, n. 29, p. 709 – 713.

MUHAMAD, N. S.; JOHAN, N. A.; ISA, M. H.; KUTTY, S. R. M. **Biohydrogen production using dark and photo fermentation: a mini review**. In: NATIONAL POSTGRADUATE CONFERENCE (NPC): ENERGY & SUSTAINABILITY: EXPLORING THE INNOVATIVE MINDS. Conference Publications, Malasya, p. 1 – 9, 2011.

NAZARETH, T. C. **Produção microbiológica de ácido propiônico, 1,3-propanodiol e hidrogênio a partir de glicerol bruto em reator anaeróbio de leito fluidizado**. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Engenharia Química, 2015.

NI, B. J.; LIU, H.; NIE, Y. Q.; ZENG, R. J.; DU, G. C.; CHEN, J.; YU, H. Q. Coupling glucose fermentation and homoacetogenesis for elevated acetate production: experimental and mathematical approaches. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 108, n. 2, p. 345-353, 2011.

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, 2011.

O'FLAHERTY, V.; COLLINS, G.; MAHONY, T. (2006) The microbiology and biochemistry of anaerobic bioreactors with relevance to domestic sewage treatment. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, n. 5, p. 39 – 55.

OBAJA, D.; MACÉ, S.; MATA-ALVAREZ, J. Biological nutrient removal by a sequencing batch reactor (SBR) using an internal organic carbon source in digested piggyery wastewater. **Biosource Technology**, n. 96, p. 7 – 14, 2005.

OEHMEN, A.; LEMOS, P. C.; CARVALHO, G.; YUAN, Z.; KELLER, J.; BLACKALL, L. L.; REIS, M. A. M. (2007) Advances in enhanced biological phosphorus removal: From micro to macro scale. **Water Research**, n. 41, p. 2271 – 2300.

OLIVEIRA, M. N. V. **Microbioma no trato gastrointestinal de bovino da raça Nelore**. Tese (Doutorado), Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Microbiologia, Viçosa, 2013.

PACHAPUR, V. L.; SARMA, S. J.; BRAR, S. K.; BIHAN, Y. L.; BUELNA, G.; VERMA, M. Biohydrogen production by co-fermentation of crude glycerol and apple pomace hydrolysate using co-culture of *Enterobacter aerogenes* and *Clostridium butyricum*. **Bioresource technology**, v. 193, p. 297-306, 2015.

PATTRA, S.; LAY, C. H.; LIN, C. Y.; O-THONG, S.; REUNGSANG, A. 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.

PEITER, G. C.; ALVES, H. J.; SEQUINEL, R.; BAUTITZ, I. R. Alternativas para o uso do glicerol produzido a partir do biodiesel. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, v. 5, n. 4, 2016.

PEIXOTO, G. SAAVEDRA, N. K.; VARESCHE, M. B. A.; ZAIAT, M. Hydrogen production from soft-drink wastewater in an upflow anaerobic packed-bed reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, n. 15, p. 8953-8966, 2011.

PERNA, V.; CASTELLÓ, E.; WENZEL, J.; ZAMPOL, C.; LIMA, D. M. F.; BORZACCONI, L.; VARESCHE, M. B.; ZAIAT, M.; EACHEBEHERE, C. Hydrogen production in an upflow anaerobic packed-bed reactor used to treat cheese whey. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.38, p. 54-62, 2013.

PETROBRÁS DISTRIBUIDORA S/A. Disponível em <http://www.petrobras.com.br/pt/energia-e-tecnologia/fontes-de-energia/biocombustiveis/> Acesso em 20 de dezembro de 2016.

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

QURESHI, N.; ANNOUS, B. A.; EZEJI, T. C.; KARCHER, P.; MADDOZ, I. S. Biofilm reactors for industrial bioconversion processes: employing potential of enhanced reaction rates. **Microbial Cell Factories**, v. 4, n. 1, p. 1, 2005.

RACHMAN, M. A.; FURUTANI, Y.; NAKASHIMADA, Y.; KAKIZONO, T.; NISHIO, N. Enhanced hydrogen production in altered mixed acid fermentation of glucose by *Enterobacter aerogenes*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 83, n. 4, p. 358-363, 1997.

REIS, C. M. **Efeito da velocidade ascensional na produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fluidizado**. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Engenharia Química, São Carlos, 2010.

REN, N. Q.; CHUA, H.; CHAN, S. Y.; TSANG, Y. F.; WANG, Y. J.; SIN, N. Assessing optimal fermentation type for bio-hydrogen production in continuous-flow acidogenic reactors. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 9, p. 1774-1780, 2007.

REN – RENEWABLE ENERGY POLICY NETWORK FOR THE 21st CENTURY. Energias Renováveis 2016 – Relatório da Situação Mundial. Disponível em <http://www.ren21.net/wp-content/uploads/2016/11/REN21_GSR2016_KeyFindings_port_02.pdf> Acesso em 27/12/2016.

REUNGSANG, A.; SITTIJUNDA, S.; O-THONG, S. Bio-hydrogen production from glycerol by immobilized *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 on heat-treated UASB granules as

affected by organic loading rate. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 17, p. 6970-6979, 2013.

RODRIGUES, C. V. **Produção biotecnológica de hidrogênio a partir do glicerol, bioproduto da produção do biodiesel**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química, Araraquara, 2016.

RODRIGUES, C. V.; SANTANA, K. O.; NESPECA, M. G.; OLIVEIRA, J. E.; MAINTINGUER, S. I. Crude glycerol by transesterification process from used cooking oils: Characterization and potentialities on hydrogen bioproduction. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, n. 33, p. 14641-14651, 2016.

RODRIGUES, J. A. R. Do engenho à biorrefinaria. A usina de açúcar como empreendimento industrial para a geração de produtos bioquímicos e biocombustíveis. **Química Nova**, v. 34, p. 1242-1254, 2011.

ROSSI, D. M.; COSTA, J. B.; SOUZA, E. A.; PERALBA, M. C. R.; SAMIOS, D.; AYUB, M. A. Z. 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, 2011.

ROSSI, D. M., COSTA, J. B.; SOUZA, E. A.; PERALBA, M. C. R.; AYUB, M. A. Z. Bioconversion of residual glycerol from biodiesel synthesis into 1, 3-propanediol and ethanol by isolated bacteria from environmental consortia. **Renewable Energy**, v. 39, n. 1, p. 223-227, 2012.

SANTOS, M. G. R. S.; MOTHÉ, C. G. Fontes Alternativas de Energia. **Analytica**, v. 32, p. 56-70, 2008.

SAKAI, S.; YAGISHITA, T. Microbial production of hydrogen and ethanol from glycerol containing wastes discharged from a biodiesel fuel production plant in a bioelectrochemical reactor with thionine. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 98, n. 2, p. 340-348, 2007.

SARATALE, G. D.; SARATALE, R. G.; CHANG, J. S. **Biohydrogen from renewable resources**. In: PANDEY, A.; CHANG, J. S.; HALLENBECK, P.; LARROCHE (Ed). *Biohydrogen*, 1st Ed, Elsevier, p. 185–221, 2013.

SARMA, S. J.; BRAR, S. K.; SYDNEY, E. B.; BIHAN, Y. L.; BUELNA, G.; SOCCOL, C. R. Microbial hydrogen production by bioconversion of crude glycerol: A review. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 8, p. 6473-6490, 2012.

SARMA, S. J.; BRAR, S. K.; BIHAN, Y. L.; BUELNA, G.; SOCCOL, C. R. Hydrogen production from meat processing and restaurant waste derived crude glycerol by anaerobic fermentation and utilization of the spent broth. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 88, n. 12, p. 2264-2271, 2013.

SARMA, S. J.; MAITI, S.; BRAR, S. K.; BIHAN, Y. L.; BUELNA, G.; VERMA, M. Low cost semi-continuous bioprocess and online monitoring of hydrogen production from crude glycerol. **RSC Advances**, v. 5, n. 109, p. 89809-89816, 2015.

SCHMIEDER R.; EDWARDS R. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. **Bioinformatics**, v. 27, p. 863-864, 2011.

SEENGENYOUNG, J.; O-THONG S.; PRASERTSAN, P. Comparison of ASBR and CSTR reactor for hydrogen production from palm oil mill effluent under thermophilic condition. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 5, n. 3, p. 177, 2014.

SEIFERT, K.; WALIGORSKA, M.; WOJTOWSKI, M.; LANIECKI, M. Hydrogen generation from glycerol in batch fermentation process. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, n. 9, p. 3671-3678, 2009.

SELEMBO, P. A.; PEREZ, J. M.; LLOYD, W. A.; LOGAN, B. E. Enhanced hydrogen and 1,3-propanediol production from glycerol by fermentation using mixed cultures. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 104, n. 6, p. 1098-1106, 2009.

SEQUINEL, R. **Caracterização físico-química da glicerina proveniente de usinas de biodiesel e determinação de metanol residual por CG com amostragem por headspace estático**. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Química de Araraquara, 2013.

SILVA, G. P.; MACK, M.; CONTIERO, J. Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. **Biotechnology advances**, v. 27, n. 1, p. 30-39, 2009.

SILVA-ILLANES, F.; TAPIA-VENEGAS, E.; MARONE, A.; TRABLY, E.; RUIZ-FILIPPI, G. Influence of pH and hydraulic retention time on hydrogen and ethanol co-production by dark fermentation in a CSTR with glycerol as substrate. In: **14TH WORLD CONGRESS ON ANAEROBIC DIGESTION**, Viña del Mar, 2015.

SIVAGURUNATHAN, P.; KUMAR, G.; BAKONYI, P.; KIM, S. H.; KOBAYASHI, T.; XU, K. Q.; LAKNER, G.; TÓTH, G.; NEMESTÓTHY, N.; BÉLAFI-BAKÓ, K. A critical review on issues and overcoming strategies for the enhancement of dark fermentative hydrogen production in continuous systems. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, n. 6, p. 3820-3836, 2016.

SOARES, R. A.; ROESCH, L. F. W.; ZANATTA, G.; CAMARGO, F. A. O.; PASSAGLIA, L. M. P. Occurrence and distribution of nitrogen fixing bacterial community associated with oat (*Avena sativa*) assessed by molecular and microbiological techniques. **Applied Soil Ecology**, v. 33, n. 3, p. 221-234, 2006.

SOLOMON, B. O.; ZENG, A. P.; BIEBL, H.; EJIOFOR, A. O.; POSTEN, C.; DECKWER, W. D. Effects of substrate limitation on product distribution and H₂/CO₂ ratio in *Klebsiella pneumoniae* during anaerobic fermentation of glycerol. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 42, n. 2-3, p. 222-226, 1994.

SRIKANTH, S.; MOHAN, S. V.; DEVI, M. P.; PERI, D.; SARMA, P. N. Acetate and butyrate as substrates for hydrogen production through photo-fermentation: process optimization and combined performance evaluation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, n. 17, p. 7513-7522, 2009.

STASIAK, L.; BLAZEJAK, S. Acetic acid bacteria-perspectives of application in biotechnology-a review. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 59, n. 1, 2009.

TEMUDO, M. F., POLDERMANS, R., KLEEREBEZEM, R., VAN LOOSDRECHT, M.C. Glycerol fermentation by (open) mixed cultures: a chemostat study. **Biotechnology and bioengineering**, v. 100, n. 6, p. 1088-1098, 2008.

THOLOZAN, J. L.; MEMBRÉ, J. M.; GRIVET, J. P. Physiology and development of *Pectinatus cerevisiiphilus* and *Pectinatus frisingensis*, two strict anaerobic beer spoilage bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 35, n. 1, p. 29-39, 1997.

TREVISAN, V. Proposta de metodologia para determinação da atividade hidrogênica específica. **Tese (doutorado em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental)**. Instituto de Pesquisas Hidráulicas – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

UCISIK, A. S.; HENZE, M. Biological hydrolysis and acidification of sludge under anaerobic conditions: The effect of sludge type and origin on the production and composition of volatile fatty acids. **Water Research**, n. 42, o. 3729 – 3738, 2008.

VALDEZ-VAZQUEZ, I.; RÍOS-LEAL, E.; ESPARZA-GARCÍA, F.; CECCHI, F.; POGGI-VARALDO, H. M. Semi-continuous solid substrate anaerobic reactors for H₂ production from organic waste: mesophilic versus thermophilic regime. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 30, n. 13, p. 1383-1391, 2005.

VAN GINKEL, S.; SUNG, S. Biohydrogen production as function of pH and substrate concentration. **Environmental Science and Technology**, n. 35, p. 4726 – 4730, 2001.

VAN LOOSDRECHT, M. C. M.; SMOLDERS, G. J.; KUBA, T.; HEIJNEN, J. J. Metabolism of microorganisms responsible for enhanced biological phosphorus removal from wastewater. **Antonie van Leeuwenhoek**, n. 71, p. 109, 1997.

VARRONE, C.; ROSA, S.; FIOCCHETTI, F.; GIUSSANI, B.; IZZO, G.; MASSINI, G.; MARONE, A.; SIGNORINI, A.; WANG, A. Enrichment of activated sludge for enhanced hydrogen production from crude glycerol. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 3, p. 1319-1331, 2013.

VASCONCELOS, I.; GIRBAL, L.; SOUCAILLE, P. Regulation of carbon and electron flow in *Clostridium acetobutylicum* grown in chemostat culture at neutral pH on mixtures of glucose and glycerol. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 5, p. 1443-1450, 1994.

VASCONCELOS, Y. **Resíduos bem-vindos**. Revista Pesquisa FAPESP, ed. 196, 2012. Disponível em: <<http://revistapesquisa.fapesp.br/2012/06/14/residuos-bem-vindos/>>. Acesso em: junho 2016.

WANG, D.; LI, X.; YANG, Q.; ZENG, G.; LIAO, D.; ZHANG, J. (2008) Biological phosphorus removal in sequencing batch reactor with single-stage oxic process. **Biosource Technology**, n. 99, p. 5466 – 5473.

WANG, J.; WAN, W. Factors influencing fermentative hydrogen production: a review. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, n. 2, p. 799-811, 2009.

WILLQUIST, K.; ZEIDAN, A. A.; VAN NIEL, E. W. J. Physiological characteristics of the extreme thermophile *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*: an efficient hydrogen cell factory. **Microbial Cell Factories**, v. 9, n. 89, 2010.

WU, X.; ZHU, J.; DONG, C.; MILLER, C.; LI, Y.; WANG, L.; YAO, W. Continuous biohydrogen production from liquid swine manure supplemented with glucose using an anaerobic sequencing batch reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, n. 16, p. 6636-6645, 2009.

XAFENIAS, N.; ANUNOBI, M. O.; MAPELLI, V. Electrochemical startup increases 1, 3-propanediol titers in mixed-culture glycerol fermentations. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 10, p. 1499-1508, 2015.

XIONG, H.; CHEN, J.; WANG, H.; SHI, H. Influences of volatile solid concentration, temperature and solid retention time for the hydrolysis of waste activated sludge to recover volatile fatty acids. **Bioresource Technology**, v. 119, p. 285-292, 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.

YU, H.; ZHU, Z.; HU, W.; ZHANG, H. Hydrogen production from rice winery wastewater in an upflow anaerobic reactor by using mixed anaerobic cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 27, n. 11, p. 1359-1365, 2002.

YU, H. Q.; FANG, H. H. P. Acidification of mid-and high-strength dairy wastewaters. **Water Research**, v. 35, n. 15, p. 3697-3705, 2001.

ZAHEDI, S.; SOLERA, R.; GARCÍA-MORALES, J. L.; SALES, D. Effect of the addition of glycerol on hydrogen production from industrial municipal solid waste. **Fuel**, v. 180, p. 343-347, 2016.

ZAIAT, M.; CABRAL, A. K. A.; FORESTI, E. Reator anaeróbico horizontal de leito fixo para tratamento de águas residuárias: concepção e avaliação preliminar de desempenho. **Revista Brasileira de Engenharia-Caderno de Engenharia Química**, v. 11, n. 2, p. 33-42, 1994.

ZHANG, H.; BRUNS, M. A.; LOGAN, B. E. Biological hydrogen production by *Clostridium acetobutylicum* in an unsaturated flow reactor. **Water Research**, n. 40, p. 728 – 734, 2006.

ZHANG, T.; LIU, H.; FANG, H. H. P. Biohydrogen production from starch in wastewater under thermophilic condition. **Journal of environmental management**, v. 69, n. 2, p. 149-156, 2003.

ZHANG, Z. P.; SHOW, K. Y.; TAY, J. H.; LIANG, D. T.; LEE, D. J.; JIANG, W. J. Rapid formation of hydrogen-producing granules in an anaerobic continuous stirred tank reactor induced by acid incubation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 96, n. 6, p. 1040-1050, 2007.