

LUAN VIEIRA ADAMES

Co-digestão de glicerol bruto e esgoto sanitário visando produção de biogás em reatores anaeróbios horizontais de leito fixo

Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Doutor em Biotecnologia

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Imaculada Maintinguer
Coorientadora: Profa. Dra. Lorena Oliveira Pires

Araraquara
2022

A197c Adames, Luan Vieira
Co-digestão de glicerol bruto e esgoto sanitário visando
produção de biogás em reatores anaeróbios horizontais de leito
fixo / Luan Vieira Adames. -- Araraquara, 2022
172 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Instituto de Química, Araraquara
Orientadora: Sandra Imaculada Maintinguer
Coorientadora: Lorena Oliveira Pires

1. Metano. 2. Hidrogênio. 3. Resíduos orgânicos. 4.
Fermentação. 5. Resíduos industriais. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do
Instituto de Química, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

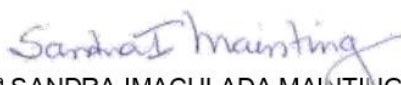
TÍTULO DA TESE: "Co-digestão de glicerol bruto e esgoto sanitário visando produção de biogás em reatores anaeróbios horizontais de leito fixo"

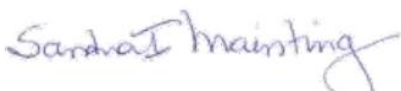
AUTOR: LUAN VIEIRA ADAMES

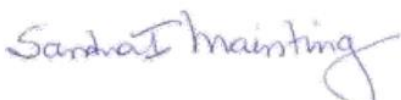
ORIENTADORA: SANDRA IMACULADA MAINTINGUER

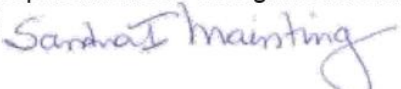
COORIENTADORA: LORENA OLIVEIRA PIRES

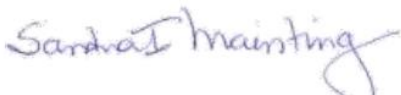
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em BIOTECNOLOGIA, pela Comissão Examinadora:


Prof^a Dr^a SANDRA IMACULADA MAINTINGUER (Participação Virtual)
Instituto de Pesquisa em Bioenergia - UNESP - Rio Claro

p/ 
Prof. Dr. MARCELO ZAIAT (Participação Virtual)
Departamento de Hidráulica e Saneamento / Escola de Engenharia - USP - São Carlos

p/ 
Prof^a. Dr^a. IOLANDA CRISTINA SILVEIRA DUARTE (Participação Virtual)
Departamento de Biologia / Universidade Federal de São Carlos - UFSCar - Sorocaba

p/ 
Prof. Dr. EDUARDO LUCENA CAVALCANTE DE AMORIM (Participação Virtual)
Centro de Tecnologia - UFAL - Maceió

p/ 
Prof. Dr. FABRICIO MOTTERAN (Participação Virtual)
Departamento de Engenharia Civil e Ambiental / Universidade Federal de Pernambuco - UFPE - Recife

Araraquara, 19 de agosto de 2022

Dados Curriculares

Nome: Luan Vieira Adames

Nome em citações bibliográficas: Adames, L. V.

Endereço profissional:

Avenida Alberto Toloi, 185, 14800-105, Araraquara-SP, Brasil.

Formação Acadêmica:

Bacharel e Licenciado em Ciências Biológicas

Mestre em Microbiologia Agropecuária

Produção Bibliográfica:

Adames, L.V., Jacobus, A.P., Sakamoto, I.K. *et al.* Bioenergy Recovery from Anaerobic Co-Digestion of Crude Glycerol and Domestic Sewage In-Series Reactor: Microbial Characterization and System Performance. *Bioenerg. Res.* (2022).

<https://doi.org/10.1007/s12155-022-10417-1>

Adames, Luan Vieira et al. Produção de hidrogênio em reator anaeróbico de fluxo contínuo utilizando glicerol bruto oriundo da produção de biodiesel. *Matéria* (Rio de Janeiro) [online]. 2021, v. 26, n. 02, e12968. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1590/S1517-707620210002.1268>>. Epub 24 Maio 2021. ISSN 1517-7076. <https://doi.org/10.1590/S1517-707620210002.1268>.

Rodrigues, Caroline Varella; Adames, Luan Vieira et al. Biosistemas integrados na codigestão do glicerol bruto em resíduos agroindustriais para a geração de H₂ e CH₄. *Matéria* (Rio de Janeiro) [online]. 2021, v. 26, n. 02, e12962. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1590/S1517-707620210002.1262>>. Epub 24 Maio 2021. ISSN 1517-7076. <https://doi.org/10.1590/S1517-707620210002.1262>.

Silva, Daiana Camila; Adames, Luan Vieira da et al. Aplicação de resíduo da agroindústria citrícola para a produção de hidrogênio utilizando culturas puras e mistas. *Matéria* (Rio de Janeiro) [online]. 2021, v. 26, n. 02, e12969. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1590/S1517-707620210002.1269>>. Epub 24 Maio 2021. ISSN 1517-7076. <https://doi.org/10.1590/S1517-707620210002.1269>.

Participação em eventos científicos:

21 a 24 de outubro de 2018 – Apresentação no formato de poster no XIII Latin American Workshop and Symposium on Anaerobic Digestion (DAAL XIII) com o trabalho intitulado: "Adsorption and Storage of Methane Produced from Anaerobic Digestion of Crude Glycerol in HKUST-1".

09 de novembro de 2018 - Participação no mini workshop “**University of Queensland (Austrália) e IPBEN (Unesp, Brasil)**”, promovido pelo Instituto de Pesquisa em Bioenergia – Laboratório Central – Rio Claro – SP.

02 a 04 de dezembro de 2018 – Participação no curso “**Molecular biology tools to understand the microbial processes involved in the production of bioenergy using wastes and wastewaters**”, ministrado pela Professora Dra. Claudia Etchebehere (Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable - Uruguai), realizado no IPBEN, Laboratório Central, com carga horária de 24 h.

6 de dezembro de 2018 – Participação no II Workshop de Bioenergia, P&D na Unesp/IPBEN – Rio Claro – SP - e apresentação do trabalho “**Adsorption and storage of methane produced from anaerobic digestion of crude glycerol in HKUST-1**”

07 de junho de 2019 – Participação no XI Fórum de Desenvolvimento Territorial e Meio Ambiente – Desafios do Saneamento Ambiental - Universidade de Araraquara – UNIARA, Araraquara/SP – e Apresentação do trabalho “**OPERAÇÃO DE REATORES RALF EM SERIE APLICADOS NA DIGESTÃO ANAERÓBIA DE GLICEROL BRUTO E ESGOTO SANITÁRIO E AUTOMAÇÃO NA QUANTIFICAÇÃO DA GERAÇÃO DE BIOGÁS**”

04 a 07 de novembro de 2019 – Apresentação na forma de pôster no VII Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia e Inovação de Biodiesel do trabalho “**Co-produtos da produção do biodiesel aplicados na geração de biogás em biorreatores de fluxo contínuo**”.

28 de novembro de 2019 – Participação no III Workshop de Bioenergia, P&D na Unesp/IPBEN e apresentação em forma de poster do trabalho “**Co-produtos da produção do biodiesel aplicados na geração de biogás em biorreatores de fluxo contínuo**.”

03 a 05 de dezembro de 2019 - Participação e apresentação no formato de pôster do trabalho “**GLICEROL RESÍDUAL DA PRODUÇÃO DE BIODIESEL UTILIZADO NA CONVERSÃO DE BIOGÁS POR PROCESSO BIOLÓGICO ANAERÓBIO**” durante o Simpósio Nacional de Instrumentação Agropecuária (Siagro 2019).

11 de dezembro 2020 – Apresentação do trabalho “**PCR-DGGE como ferramenta para identificação de modificações na comunidade microbiana em reatores anaeróbios**” durante o IV Workshop of Bioenergy, P&D em IPBEN/UNESP.

5 de agosto de 2021 – Apresentação do trabalho “**Produção de álcoois e ácidos graxos voláteis em reatores anaeróbios horizontais de leito fixo em série**” durante o 4º ENQBIOTEC – Encontro Nacional de Química Biotecnológica e Agroindustrial.

3 a 4 de novembro de 2021 – Apresentação de trabalho intitulado “Microbial conversion of crude glycerol to aggregated bio products and biofuels in horizontal anaerobic reactors installed in series” durante o VII SIGERA – International Symposium of Agricultural and Agro-industrial Waste Management.

Estágio internacional (Doutorado Sanduíche CAPES-PRINT)

15 de outubro de 2021 a 31 de março de 2022 – Pesquisa de efeito bioestimulante vegetal de microalgas realizada no Institute National de la Recherche Scientifique (INRS) na cidade de Quebec, QC, Canadá, sob supervisão da pesquisadora Dra. Pascale Champagne.

Dedico este trabalho a minha família,
especialmente meus pais Luis e Lucia que
continuam acreditando nos meus sonhos.

Agradecimentos

Agradeço ao ensino público gratuito que proporcionou a chance de continuar buscando conhecimento e fazer parte da ciência no Brasil. A CAPES pela minha bolsa de estudo e FAPESP e CNPq pelo fomento de meu experimento.

Agradeço a minha família, meus pais e irmão por sempre me ajudarem e estarem presente nas horas de necessidade e comemorarem comigo minhas vitórias.

Agradeço a minha orientadora Sandra e coorientadora Lorena, pela paciência, pelas inúmeras correções, pela oportunidade ímpar e por terem acreditado no meu trabalho.

Agradeço aos meus colegas de laboratório por lutarem ao meu lado, compartilharem conhecimento, pelos risos e choros e nossa rede de apoio pra enfrentar os momentos em que queríamos desistir, muito obrigado Daiana, Romário, Danieli, Carol, Matheus e Cintia.

Agradeço Luis Felipe por estar sempre ao meu lado nos momentos bons e ruins, pela paciência com os inúmeros problemas químicos, com apoio psicológico e técnico.

A special international thank you to Professor Pascale Champagne for receiving me in Canada and believing in my potential. A thank you to Gustavo for helping develop my research and adapt to a new university, country, and everything. A thank you to Gisell for being the best multilingual lab partner I ever had. Thank you to the good friends I have made in Quebec Anderson, Robin, David, and Michael, who made my stay unforgettable.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

“A tarefa não é apenas ver o que ninguém
ainda viu, mas pensar o que ninguém ainda
pensou sobre o que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer

Resumo

O aumento da demanda de energia e a diminuição da disponibilidade de combustíveis fósseis, juntamente com as crescentes preocupações com questões ambientais, impulsionaram a produção de biocombustíveis, como biodiesel e biogás. A viabilidade econômica da produção de biodiesel exige a valorização do glicerol bruto (GB), seu principal subproduto. A conversão anaeróbia do glicerol residual da produção de biodiesel tem se mostrado uma excelente opção para a produção de energia limpa a baixo custo. Devido a contaminantes presentes no GB, como metanol e sabões, e sua quantidade de matéria orgânica elevada, a co-digestão com outros resíduos é uma estratégia adotada para amenizar seu impacto na microbiota responsável pela digestão anaeróbia. Sendo constituído majoritariamente por água, o esgoto sanitário (ES) é uma excelente opção para diluir os efeitos tóxicos do GB. Neste sentido, o objetivo do presente estudo foi avaliar o emprego de diferentes proporções ($v \ v^{-1}$) de GB e ES em quatro reatores anaeróbios horizontais de leito fixo (RAHLF) instalados em série (R1, R2, R3 e R4), em 4 ensaios distintos; 1 (1% GB), 2 (1,5% GB), 3 (2% GB) e 4 (3% GB), referente a: (i) partida do sistema e estabilidade dos reatores; (ii) melhor relação na proporção glicerol bruto e esgoto sanitário para melhoria da produção de biogás (H_2 e CH_4); (iii) remoção da matéria orgânica; (iv) geração de produtos de valor agregado (ácidos graxos voláteis e 1,3-Propanodiol); (v) identificação das alterações no consórcio microbiano utilizado como inóculo. O aumento do tempo de detenção hidráulica (TDH) de 0,5 para 1 dia (R1), 2,1 para 4,2 dias (R2) e 4,02 para 8,04 dias (R3) resultou em melhores produções de hidrogênio no reator R1 e metano nos reatores R2 e R3. O aumento da proporção de GB resultou em carga orgânicas volumétricas (COV) de 13,05, 18,06, 26,75 e 37,85 g DQO ($L \ d^{-1}$), para os ensaios 1 (1% GB), 2 (1,5% GB), 3 (2% GB) e 4 (3% GB), respectivamente. A produção de hidrogênio mais elevada no reator R1 ($277,88 \ L \ H_2 \ (m^3 \ d^{-1})$) ocorreu durante o ensaio 2 e no reator R2 durante o ensaio 3 ($84,43 \ L \ H_2 \ m^3 \ d^{-1}$). A maior produção de metano foi de $312,0 \ L \ CH_4 \ (m^3 \ d^{-1})$ e ocorreu no reator R3 durante o ensaio 1. Nos ensaios 1 e 2 o sistema com três reatores obteve uma média de remoção de DQO de 93,6% e 98,2%, respectivamente. Após o aumento de GB para 2% no ensaio 3 a adição do reator R4 possibilitou o sistema manter uma média de remoção de 97,0% e no ensaio 4 com 3% de GB a média de remoção de DQO foi de 97,5%. Houve geração de 1,3-Propanodiol de até $4,1 \ g \ L^{-1}$ (R1 – 3% GB) e $4,8 \ g \ L^{-1}$ (R2 – 3% GB). A estratégia de co-digestão do glicerol bruto e esgoto sanitário evitou a inibição da microbiota. Além disso, houve uma mudança na abundância relativa de microrganismos entre R1, R2 e R3 e uma diminuição considerável no índice de diversidade no reator fermentativo (R1). A ordem *Selenomonadales* foi favorecida nos reatores R1 e R3 com o aumento do GB. A inibição das arqueias foi verificada nos reatores em série resultando na seleção da ordem *Methanosarcinales*. Os resultados mostraram o potencial da aplicação de reatores RAHLF em série para recuperação energética, geração de produtos de valor agregado e disposição alternativa do glicerol bruto.

Palavras-chave: Metano, Hidrogênio, Resíduos Orgânicos, Fermentação, Resíduos industriais

Abstract

Increasing energy demand and the decreasing availability of fossil fuels, along with growing concerns about environmental issues, have boosted the production of biofuels such as biodiesel and biogas. The economic viability of biodiesel production requires the valorization of crude glycerol (CG), its main by-product. The anaerobic conversion of residual glycerol from biodiesel production is an excellent option for producing clean energy at a low cost. Due to contaminants present in GB and its high amount of organic matter, co-digestion with other residues is a strategy adopted to mitigate its impact on the microbiota responsible for anaerobic digestion. Domestic sewage (DS) is an excellent option to dilute GB's toxic effects since its constitutions are most water. In this sense, the objective of the present study was to evaluate the use of different proportions (v v⁻¹) of CG and DS in four horizontal anaerobic fixed bed reactors (HARFB) installed in series (R1, R2, R3, and R4) referring to (i) system start-up and reactor stability; (ii) better ratio in the proportion of crude glycerol and sanitary sewage to improve biogas production (H₂ and CH₄); (iii) removal of organic matter; (iv) generation of value-added products (volatile fatty acids and 1,3-propanediol); (v) identification of changes in the microbial consortium used as inoculum. Increasing the hydraulic retention time (HRT) from 0.5 to 1 day (R1), 2.1 to 4.2 days (R2), and 4.02 to 8.04 days (R3) resulted in better hydrogen production and methane in all reactors. The increase in the proportion of CG resulted in volumetric organic loadings (OLR) of 13.05, 18.06, 26.75 and 37.85 g COD (L d)⁻¹, for assays 1 (1% CG), 2 (1.5% CG), 3 (2% CG) and 4 (3% CG), respectively. The highest hydrogen production in reactor R1 (277.88 L H₂ (m³ d)⁻¹) occurred during test 2 and in reactor R2 during test 3 (84.43 L H₂ m₃ d⁻¹). The highest methane production was 312.0 L CH₄ (m³ d⁻¹) and occurred in reactor R3 during test 1. In tests 1 and 2, the system with three reactors obtained an average COD removal of 93.6% and 98.2%, respectively. After increasing CG to 2% in test 3, reactor R4 allowed the system to maintain an average removal of 97.0%; in test 4, with 3% of CG, the average COD removal was 97.5%. There was a generation of 1,3-Propanediol of up to 4.1 g L⁻¹ (R1 – 3% GB) and 4.8 (R2 – 3% CG). The strategy of co-digestion of crude glycerol and domestic sewage avoided the inhibition of the microbiota. Furthermore, there was a change in the relative abundance of microorganisms between R1, R2, and R3 and a considerable decrease in the diversity index in the fermentation reactor (R1). After the increase in CG, the order Selenomonadales was favored in reactors R1 and R3. Archaea inhibition was verified in series reactors resulting in the selection of the order Methanosarcinales. The results showed the potential of applying HARFB reactors in series for energy recovery, generation of value-added products, and alternative disposal of crude glycerol.

Keywords: Methane, Hydrogen, Organic Waste, Fermentation, Industrial waste

Lista de Ilustrações

Figura 1 - Esquema das condições operacionais dos reatores RAHLF (R1, R2, R3 e R4) instalados em série durante a partida e ensaios de 1-4.	24
Figura I.1 - Esquema de um reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF)	I-30
Figura I.2 – Via de produção de 1,3-Propanodiol	I-32
Figura I.3 - Influência de diferentes cargas orgânicas de glicerol nas rotas metabólicas fermentativas.....	I-35
Figura II.1 - Reator Anaeróbio Horizontal de Leito Fixo (RAHLF)	II-43
Figura II.2 - Produção de Hidrogênio e variação no pH do efluente do reator RAHLF nas fases de: Partida, Ensaio 1 e Ensaio 2.	II-47
Figura II.3 - Produção de Ácidos Graxos Voláteis (AGV) no Afluente e Efluente do RAHLF	II-48
Figura II.4 - Quantificação de bactérias anaeróbias por técnica de <i>pour plate</i> em Unidades Formadoras de Colônias (UFC) no inóculo <i>in natura</i> (Inóculo) e pré-tratado (Ensaio 1)	II-51
Figura 1 - Fluxograma com os diferentes tratamentos com as culturas de microalgas <i>Chlorella vulgaris</i> e <i>Scenedesmus</i> sp. e controle com água e meio de cultura BBM ...	157
Figura 2 - Fotografias das placas para medição das radículas das sementes	158
Figura 3 – Índice de Germinação das sementes tratadas com as culturas de microalgas de <i>Chlorella vulgaris</i> (C.) e <i>Scenedesmus</i> sp. (S.) e controle após 4 dias de incubação, considerando o controle de água deionizada (100%).	160
Figura 4 - Tamanho da radícula das sementes tratadas com as culturas das microalgas <i>Chlorella vulgaris</i> (C.) e <i>Scenedesmus</i> sp. (S.) e controle após 4 dias de incubação..	161
Figura 5 - Índice de Germinação das sementes tratadas com as culturas de microalgas de <i>Chlorella vulgaris</i> (C.) e <i>Scenedesmus</i> sp. (S.) e controle após 4 dias de incubação, considerando o controle de água deionizada (100%).	163
Figura 6 - Tamanho da radícula das sementes tratadas com as culturas de microalgas de <i>Chlorella vulgaris</i> (C.) e <i>Scenedesmus</i> sp. (S.) e controle após 6 dias de incubação	164
Figure III.1 - Daily volumetric hydrogen and volatile fatty acids (VFA) Production in the reactor R1 during the start-up and phase 1	III-67
Figure III.2 - Daily volumetric methane production and organic loading rate (OLR) in the reactors R2 and R3 during the start-up and phase 1.....	III-72
Figure III.3 - Archaea and Bacteria Domain relative abundancy in the inoculum source and samples from R1, R2, and R3 at the end of Phase 1.	III-75

Figure III.4 - Scanning electron microscopy (SEM) of the sludge from reactors R1, R2, and R3: A) Interior of an R1 sludge granule; B) Interior of an R2 sludge granule: *Methanosaeta* (arrows); C) Interior of an R2 sludge granule: *Methanosarcina* (digitally colored); D) Interior of an R3 sludge granule: *Methanosarcina* (arrow).....III-85

Figure IV.1 - Total alkalinity (mg CaCO₃/L), Volatile Fatty Acids (VFA_{total} – mg/L), and pH in the influent and effluent of the reactors R1, R2, R3, and R4 during the phases 1 (1.5% CG), 2 (2% CG), and 3 (3% CG)..... IV-101

Figure IV.2 - Glycerol consumption and COD removal in the reactors R1, R2, R3, and R4 during the phases with 1.5%, 2%, and 3% of raw glycerol concentration IV-103

Figure IV.3 - Daily volumetric methane and hydrogen production and percentual of CH₄ e H₂ in the biogas of reactors R1, R2, R3, and R4 during the phases 1 (1.5% CG), 2 (2% CG), and 3 (3% CG)..... IV-105

Figure IV.4 - Alcohols, volatile fatty acids, and 1,3-Propanediol generation in the influent and effluents of reactors R1, R2, R3, and R4 during the phases 1 (1.5% CG), 2 (2% CG), and 3 (3% CG)..... IV-108

S. Figure III.1 - Schematic representation of three horizontal anaerobic reactors with fixed-bed (HARFB) in-series (R1, R2, and R3), Influent, Effluent, Biogas outlets, Sludge sampling points (P1, P2, and P3) III-61

S. Figure III.2 - Alkalinity (ALK – mg CaCO₃ L⁻¹), Volatile Fatty Acids (VFA – mg L⁻¹) and pH in the influent and effluent of the reactors R1, R2, and R3 during the start-up and phase 1III-70

S. Fig. III.3 - Glycerol consumption and COD removal in the reactors R1, R2, and R3 of the COD of their respective affluent and effluent during the start-up and phase1III-74

S. Figure III.4 - Distribution of relative abundance orders of Inoculum (INOC) and Reactors 1, 2, and 3 (R1, R2, and R3) at the end of Phase 1III-77

S. Figure III.5 - Dendrogram and similarity coefficient based on the Jaccard correlation of the samples from the 3 points (P1, P2, and P3) of each reactor (R1, R2, and R3) and inoculum (INOC) for the (a) Bacteria domain and (b) Archaea domain at the end of phase 1.III-80

S. Fig. IV.1 - Schematic representation of four horizontal anaerobic reactors with fixed-bed (HARFB) in-series (R1, R2, R3, and R4), Influent, Effluent, Biogas outlets, Sludge sampling points (P1, P2, and P3) IV-116

Lista de Tabelas

Tabela II.1 - Caracterização do glicerol bruto	II-42
Tabela II.2 - Parâmetros operacionais e características físico-químicas do afluente..	II-44
Table III.1 - Mean values ($\pm$ SD, n = number of samples) of OLR, COD, pH of the influent and effluents and HRT of reactors R1, R2, and R3 during the start-up and Phase 1.	III-62
Table III.2 - Sampling nomenclature according to the reactor sampling point and microbial Domain in the HARFB	III-64
Table III.3 - Comparative table showing the results of bioconversion of crude glycerol into biogas using different anaerobic reactors at mesophilic conditions.....	III-74
Table III.4. Shannon-Wiener index (H index) to Bacteria and Archaea domain.	III-84
Table IV.1 Operational parameters, proportions of Crude Glycerol (CG) and Domestic Sewage (DS) in the influent and mean values ($\pm$ SD) of organic loading rate (OLR), chemical oxygen demand (COD), nitrogen, and pH of the influent and effluents of reactors R1, R2, R3, and R4 during the phases of 1.5%, 2%, and 3% of crude glycerol proportions	IV-97
Table IV.2 - Alpha diversity in the sludge samples of reactors R1, R2, R3, and R4 during the phases 1 (1.5% CG) and 3 (3% CG)	IV-109
Table IV.3 - Relative abundance percentual of the main orders identified in the sludge samples of reactors R1, R2, R3, and R4 at the end of the phases with 1.5% and 3% of crude glycerol proportions	IV-112
Tabela V.1 - Valores médios da carga orgânica volumétrica (COV), demanda química de oxigênio total (DQO) no afluente e nos efluentes dos reatores anaeróbios horizontais de leito fixo (R1, R2, R3 e R4) instalados em série, durante as fases de: Partida (1% glicerol bruto), Ensaio 1 (1% Glicerol Bruto), Ensaio 2 (1,5% Glicerol Bruto), Ensaio 3 (2% Glicerol Bruto) e Ensaio 4 (3% Glicerol Bruto).	V-124
Tabela V.2 - Valores médios de pH, ácidos graxos voláteis totais (AGV), alcalinidade parcial (AP) e alcalinidade total (AT) no afluente e efluentes dos reatores anaeróbios horizontais de leito fixo (R1, R2, R3 e R4) instalados em série durante as fases de: Partida (1% glicerol bruto), Ensaio 1 (1% Glicerol Bruto), Ensaio 2 (1,5% Glicerol Bruto), Ensaio 3 (2% Glicerol Bruto) e Ensaio 4 (3% Glicerol Bruto).	V-125
Tabela V.3 - Valores médios da produção volumétrica específica, e conteúdo de CH ₄ e H ₂ no biogás nos reatores anaeróbios horizontais de leito fixo (R1, R2, R3 e R4) instalados em série durante as fases de: Partida (1% glicerol bruto), Ensaio 1 (1% Glicerol Bruto), Ensaio 2 (1,5% Glicerol Bruto), Ensaio 3 (2% Glicerol Bruto) e Ensaio 4 (3% Glicerol Bruto).	V-126
Tabela V.4 - Valores médios das eficiências de remoção de demanda química de oxigênio (DQO) e glicerol bruto nos reatores anaeróbios horizontais de leito fixo e alta taxa (R1, R2, R3 e R4) instalados em série durante as fases de: Partida (1% glicerol	

bruto), Ensaio 1 (1% Glicerol Bruto), Ensaio 2 (1,5% Glicerol Bruto), Ensaio 3 (2% Glicerol Bruto) e Ensaio 4 (3% Glicerol Bruto). V-127

Tabela V.5 - Valores médios de álcoois, ácidos e 1,3-Prapanodiol dos reatores anaeróbios horizontais de leito fixo e alta taxa (R1, R2, R3 e R4) instalados em série ao final das fases: Ensaio 1 (1% Glicerol Bruto), Ensaio 2 (1,5% Glicerol Bruto), e Ensaio 4 (3% Glicerol Bruto). V-128

Tabela V.6 - Abundância relativa (%) das principais ordens identificadas nas amostras de lodo dos reatores anaeróbios horizontais de leito fixo e alta taxa (R1, R2, R3 e R4) instalados em série ao final das fases: Ensaio 1 (1% Glicerol Bruto), Ensaio 2 (1,5% Glicerol Bruto), e Ensaio 4 (3% Glicerol Bruto). V-130

S. Table III.1 - Mean values and statistical data of the physical-chemical parameters and production of biogas were analyzed during the Start-up and Phase 1 in the influent, effluents, and reactors R1, R2, and R3III-68

S. Table IV.1 - Mean values and statistical data of the physical-chemical parameters measured during the 1.5%, 2%, and 3% crude glycerol phases in the influent and effluents of the HARFB reactors R1, R2, R3, and R4 IV-115

S. Table IV.2 - Mean values and statistical data of the Organic Loading Rate (OLR) applied and production of biogas measured during the 1.5%, 2%, and 3% crude glycerol phases in the influent and effluents of the HARFB reactors R1, R2, R3, and R4 IV-116

S. Table IV.3 - Mean values and statistical data of alcohols, Volatile Fatty Acids, and 1,3-Propenediol analyzed during the 1.5%, 2%, and 3% crude glycerol phases in the influent and effluents of the HARFB reactors R1, R2, R3, and R4..... IV-117

Lista de Abreviaturas e Siglas

Português

AGV - Ácidos graxos voláteis
COV - Carga orgânica volumétrica
DQO - Demanda química de oxigênio
ES - Esgoto sanitário
GB - Glicerol bruto
N - Nitrogênio
RAHLF - Reator anaeróbio horizontal de leito fixo
TDH - Tempo de detenção hidráulica

Inglês

Alk - Alkalinity
CG - Crude glycerol
CSRT - Continuous stirred tank
DGGE - Denaturing gradient gel electrophoresis
DS - Domestic sewage
GC - Gas chromatography
Hac - Acetic acid
HARFB - Horizontal anaerobic reactor with fixed bed
HPa - Propionic Acid
HRT - Hydraulic retention time
HVa - Valeric acid
OLR - Organic loading rate
SD - Standard deviation
UASB - Upflow anaerobic sludge blanket
VFA - Volatile fatty acids

Sumário

Resumo	ix
Abstract	x
Lista de Ilustrações	xi
Lista de Tabelas	xiii
Lista de Abreviaturas e Siglas	xv
1 Introdução.....	19
2 Objetivos.....	22
2.1 Geral.....	22
2.2 Específicos	22
3 Formato de Apresentação da tese.....	22

Capítulo I.....I-25

1 Revisão Bibliográfica.....	I-25
1.1 Geração de Resíduos.....	I-25
1.1.1 Produção de Biodiesel e Glicerol	I-25
1.1.2 Esgoto Sanitário	I-28
1.2 Reatores Anaeróbios Horizontais de Leito Fixo (RAHLF)	I-29
1.3 Digestão Anaeróbia de Glicerol.....	I-32
1.3.1 Produção de 1,3-Propanodiol e Ácidos Graxos Voláteis.....	I-33
1.3.2 Co-digestão Anaeróbia e reatores em série	I-36

Capítulo II.....II-38

Produção de hidrogênio em reator anaeróbio de fluxo contínuo utilizando glicerol bruto oriundo da produção de biodiesel.....	II-38
Resumo	II-38
abstract	II-39
1 INTRODUÇÃO.....	II-40
2 MATERIAIS E MÉTODOS	II-41
2.1 Constituição do afluente	II-41
2.1.1 Glicerol bruto	II-41
2.1.2 Esgoto sanitário.....	II-42
2.1.3 Tamponamento	II-42
2.2 Fonte de inóculo.....	II-42
2.3 Parâmetros operacionais do Reator Anaeróbio Horizontal de Leito Fixo (RAHLF) ..	II-43
2.4 ANÁLISES físico-químicas e microbiológicas.....	II-44
2.5 Quantificação do Biogás.....	II-45
3 RESULTADOS e discussão	II-45

3.1 Evolução do pH e Produção de H ₂	II-45
3.2 Produção de Ácidos Graxos Voláteis (AGV)	II-48
3.3 Análise microbiológica.....	II-49
conclusões.....	II-51
agradecimentos.....	II-51
Bibliografia.....	II-51

Capítulo III.....III-57

Bioenergy recovery from anaerobic co-digestion of crude glycerol and domestic sewage in-series reactor: microbial characterization and system performance	III-57
Abstract	III-57
1 Introduction	III-58
2 Material and methods	III-60
2.1 Inoculum and Inoculation Strategies	III-60
2.2 Substrates	III-60
2.3 Experimental set-up and operating conditions.....	III-61
2.4 Physico-chemical and Chromatographic Analysis.....	III-62
2.5 Microbial Diversity Analysis	III-63
2.5.1 DNA Sequencing	III-63
2.5.2 Library Preparation for NGS	III-63
2.5.3 PCR-DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) analysis	III-64
2.6 Statistical Analysis.....	III-65
3 Results and discussion	III-66
3.1 First Stage – Fermentative Reactor (R1).....	III-66
3.2 Second Stage: Methanogenesis Reactor (R2)	III-70
3.3 Third Stage: Methanogenesis (R3).....	III-71
3.4 Microbial Diversity Analysis	III-75
3.4.1 Microbial Relative Abundance	III-75
3.4.2 Microbial Community Structure - DGGE.....	III-79
3.4.2.1 Bacteria Domain	III-79
3.4.2.2 Archaea Domain.....	III-82
3.4.3 Scanning electron microscopy.....	III-84
Conclusions.....	III-85
References	III-87

Capítulo IV.....IV-92

Continuous long-term anaerobic co-digestion of crude glycerol and domestic sewage: Plug-flow in-series reactors performance and microbiota acclimatization	IV-92
Abstract.....	IV-92

1 Introduction	IV-93
2 Materials and Methods.....	IV-95
2.1 Substrates	IV-95
2.2 Inoculum source	IV-95
2.3 In-series system timeline operation	IV-96
2.4 Operational conditions.....	IV-96
2.5 Physico-chemical and Chromatographic Analysis.....	IV-97
2.6 DNA Sequencing.....	IV-98
2.7 Statistical Analyses	IV-99
3 Results	IV-99
3.1 In-series reactors performance.....	IV-99
3.2 Hydrogen and Methane Production.....	IV-103
3.3 Volatile Fatty Acids and 1,3-Propanediol generation.....	IV-106
3.4 Microbial Characterization	IV-108
Conclusion.....	IV-113
SUPPLEMENTARY MATERIALS	IV-114
References	IV-118

Capítulo V..... V-124

1 Resultados complementares.....	V-124
1.2 Carga Orgânica Volumétrica (COV)	V-124
1.2 Parâmetros operacionais.....	V-125
1.3 Produção de biogás	V-126
1.4 Remoção de matéria orgânica e glicerol livre.....	V-127
1.5 Produção de álcoois, ácidos e 1,3-Prapanodiol	V-128
1.6 Biologia Molecular	V-130
2 Discussão	V-131
2.1 Reator R1	V-131
2.2 Reator R2.....	V-133
2.3 Reator R3	V-136
2.4 Reator R4.....	V-137
Conclusões	V-139
Perspectivas futuras	V-140
Bibliografia.....	V-141
Apendice A – Atividades desenvolvidas durante doutorado sanduíche.....	153
Anexo 1 – Licença para reprodução de artigo publicado	170

1 INTRODUÇÃO

A produção de biodiesel vem crescendo mundialmente, graças a políticas de incentivo e a busca por combustíveis renováveis. Cada tonelada de biodiesel produzido através da transesterificação de triglicerídeos, gera aproximadamente 100 kg de glicerol bruto; principal subproduto da sua produção (MAINTINGUER *et al.*, 2015). Este glicerol bruto gerado contém impurezas, tais como álcoois, ácidos graxos, ésteres, álcalis na forma de sabões, hidróxidos alcalinos e metais pesados (RIVERO *et al.*, 2014; RODRIGUES *et al.*, 2020). Apesar das amplas aplicações de glicerol puro na indústria farmacêutica, alimentícia e cosmética, a sua purificação gera custo, especialmente para os pequenos e médios produtores de biodiesel (PACHAURI; HE, 2006). Nesse sentido, alternativas de manejo do glicerol bruto vem sendo pesquisadas e vantagens como seu valor calorífico elevado, capacidade de ser estocado por longos períodos e sua biodegradabilidade o torna perfeito para utilização em processos de bioconversão anaeróbia de hidrogênio e metano (KAUR *et al.*, 2020; MEIER *et al.*, 2020; RODRIGUES *et al.*, 2019, 2020; SAWASDEE *et al.*, 2019).

O glicerol bruto, apesar de ser uma excelente fonte de carbono para os microrganismos, é um resíduo considerado pobre em nutrientes como nitrogênio e fósforo. Tais macronutrientes podem ser encontrados no esgoto sanitário doméstico, que em co-digestão, por ser constituído em sua maior parte por água, proporciona diluição do glicerol bruto e seus possíveis compostos tóxicos que possam inibir os microrganismos (LI *et al.*, 2020; RODRIGUES *et al.*, 2020).

O Brasil possui o maior número de reatores anaeróbios de tratamento de esgoto no mundo, contabilizando 1.667 Estações de Tratamento de Esgoto (ETE) de base anaeróbia (PASSOS *et al.*, 2020). No entanto, a maioria dessas ETES não possuem sistema para recuperar o CH₄ produzido. Silva *et al.* (2021) relataram que, em cálculos teóricos, essas ETES possuem potencial energético de biogás variando de 3 GJ d⁻¹ a 380 GJ d⁻¹. Considerando um rendimento de conversão de 30% pelo gerador de energia, poderia produzir 677 MWh d⁻¹ de energia elétrica utilizando apenas o biogás gerado pelo tratamento de esgoto, o que é suficiente para suprir a demanda energética de uma cidade com cerca de 111.000 habitantes, aproximadamente (SILVA *et al.*, 2021).

O processo anaeróbio para tratamento de resíduos e produção de biogás ocorre em complexo sinergismo entre microrganismos do domínio Archaea e Bacteria, que interagem na conversão de compostos orgânicos complexos em substratos mais simples como ácidos orgânicos voláteis, álcoois, hidrogênio e metano, com diversas reações acontecendo sequencialmente ou paralelamente (AYDIN *et al.*, 2015). Portanto, é de extrema importância verificar as modificações na microbiota de reatores, para entender a sua dinâmica espacial e temporal em diferentes condições operacionais e concentrações de substrato.

Os microrganismos dos reatores biológicos constituem a parte viva e mais ativa da matéria orgânica, podendo atuar como indicadores capazes de refletir mudanças sutis nas propriedades de reatores de tratamento, bem antes que alterações nos teores de matéria orgânica possam ser observadas. Apesar da digestão anaeróbia ser considerada por alguns, uma tecnologia consolidada, o consórcio microbiano e as relações entre as espécies que participam da decomposição de elementos complexos até o biogás, ainda não é bem estabelecida, o que torna o estudo da microbiologia dos reatores anaeróbios a chave para melhorias no processo como uma produção estável e maiores taxas de conversão da matéria orgânica (AYDIN *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2015). Portanto, sabendo-se que os microrganismos são parte integrante da qualidade desse tratamento, é necessário o melhor entendimento da dinâmica e da estrutura das comunidades microbianas.

Além da produção do biogás, a fermentação do glicerol gera produtos de valor agregado como ácidos graxos voláteis e 1,3-Propanodiol (1,3-PD). O 1,3-PD é um importante produto químico aplicado em polímeros, cosméticos, alimentos, adesivos, lubrificantes, laminados, solventes, anticongelantes e na medicina (WISCHRAL *et al.*, 2016; YUN *et al.*, 2018). As bactérias dos gêneros *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Lactobacillus* e algumas espécies de *Clostridium* já são descritas pela capacidade de fermentar glicerol ou misturas de glicerol e açúcares, em 1,3-PD (BARBIRATO *et al.*, 1997; ROSSI *et al.*, 2012; VERAS *et al.*, 2019).

Técnicas de Biologia Molecular como a eletroforese em gel com gradiente desnaturante (denaturation gradient gel electrophoresis – PCR-DGGE) é uma importante ferramenta para detecção rápida de mudanças em comunidades microbianas,

oferecendo informações mais precisas sobre a distribuição de espécies em um determinado ambiente (AYDIN *et al.*, 2015; MALIN; ILLMER, 2008; PACHIEGA *et al.*, 2018). Além disso, o sequenciamento molecular para identificação de espécies presentes nos reatores anaeróbios são ferramentas importantes para o entendimento e o avanço da implementação da biotecnologia de produção de biogás como biocombustível.

A configuração do reator e a abordagem de operação influenciam fortemente o ambiente da microbiota, o que pode ajudar a superar possíveis efeitos tóxicos ou sobrecargas na carga orgânica volumétrica (COV) aplicada no reator. Reatores horizontais têm sido utilizados com sucesso para maximizar a conversão de biogás e remover compostos tóxicos e resíduos com alta carga orgânica (BARALDI *et al.*, 2008; MAZARELI *et al.*, 2016). Zhou *et al.*, (2022) alcançaram excelentes taxas de produção volumétrica de metano de 4,58 e 5,37 L CH₄ (L d)⁻¹ em COVs de 10,80 e 13,80 kg-VS (m³ d)⁻¹ de resíduos alimentares. Oliveira *et al.*, (2009) atingiram a remoção de 75% do antimicrobiano veterinário sulfametazina. Sendo assim, o reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF), é uma opção viável na busca pela superação dos efeitos tóxicos do GB em reatores anaeróbios.

Nesse sentido, o objetivo desse estudo foi avaliar o consumo de glicerol bruto co-digerido em esgoto sanitário em quatro reatores anaeróbios horizontais de leito fixo (RAHLF), operados em série, com consequente produção de hidrogênio e de metano, além de verificar as alterações temporais ocorridas nas comunidades de microrganismos anaeróbios presentes.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Analisar o desempenho dos reatores anaeróbios horizontais de leito fixo (RAHLF), operados em série, na conversão de glicerol bruto co-digerido com esgoto sanitário em diferentes proporções para a produção de H_2 no primeiro estágio fermentativo (Reator R1) e CH_4 nos reatores metanogênicos (R2, R3 e R4).

2.2 Específicos

- Avaliar a influência da carga orgânica volumétrica na partida dos RAHLF;
- Avaliar a composição do biogás gerado nos RAHLFs e verificar como as diferentes proporções de glicerol e esgoto sanitário podem alterar os níveis de produção no sistema e em cada reator;
- Avaliar a produção de ácidos graxos voláteis (AGV) e 1,3-Propanodiol;
- Avaliar diversidade microbiana dos consórcios microbianos colonizados nos RAHLFs e suas alterações ao longo da operação, em técnicas de Biologia Molecular.

3 FORMATO DE APRESENTAÇÃO DA TESE

A tese foi estruturada no modelo de discussão de artigos, com a apresentação em capítulos dos artigos publicados e submetidos referente ao projeto de doutorado, seguindo a normativa Nº 01, de 29 de abril de 2022, do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia do Instituto de Química de Araraquara – Unesp.

A **Figura 1** apresenta um esquema da operação do RAHLH instalado em série de reatores, com as principais características de cada ensaio realizado.

A partida dos reatores ocorreu com alimentação de 100% de esgoto sanitário durante o período de 15 dias. A seguir foi adicionado 1% de glicerol bruto co-digerido com 99% de esgoto sanitário por período de 185 dias.

O ensaio 1 foi mantido por 66 dias e continha 1,0% glicerol bruto, co-digerido com 99% de esgoto sanitário.

O ensaio 2 foi montado com 1,5% de glicerol bruto e 98,5% de esgoto sanitário, durante o período de 152 dias.

O ensaio 3 ocorreu por período de 72 dias, com alimentação nos RAHLFs em 2% de glicerol bruto e 98% de esgoto sanitário.

Finalmente, no ensaio 4 os reatores foram operados por 57 dias com 3% de glicerol bruto e 97% de esgoto sanitário. Vale ressaltar ainda que tanto na partida quanto nos ensaios 1 e 2 os RAHLFS eram compostos por 3 reatores em série (R1, R2 e R3) e nos ensaios 3 e 4 foi adicionado mais um reator totalizando quatro (R1, R2, R3 e R4.)

O **Capítulo I** contempla a revisão bibliográfica realizada, com enfoque para o biodiesel, a geração de glicerol bruto, aplicação de reatores anaeróbios de leito fixo instalados em série e demais aspectos da digestão anaeróbia e geração de produtos de valor agregado como 1,3-Propanodiol, além do biogás hidrogênio e metano.

No **Capítulo II** foi apresentada uma versão modificada dos resultados parciais referentes ao reator R1 durante a fase de partida e nos ensaios 1 e 2, publicados na Revista Matéria de 2021, após pré-seleção de trabalho apresentado no I Congresso Brasileiro do Hidrogênio em 2019.

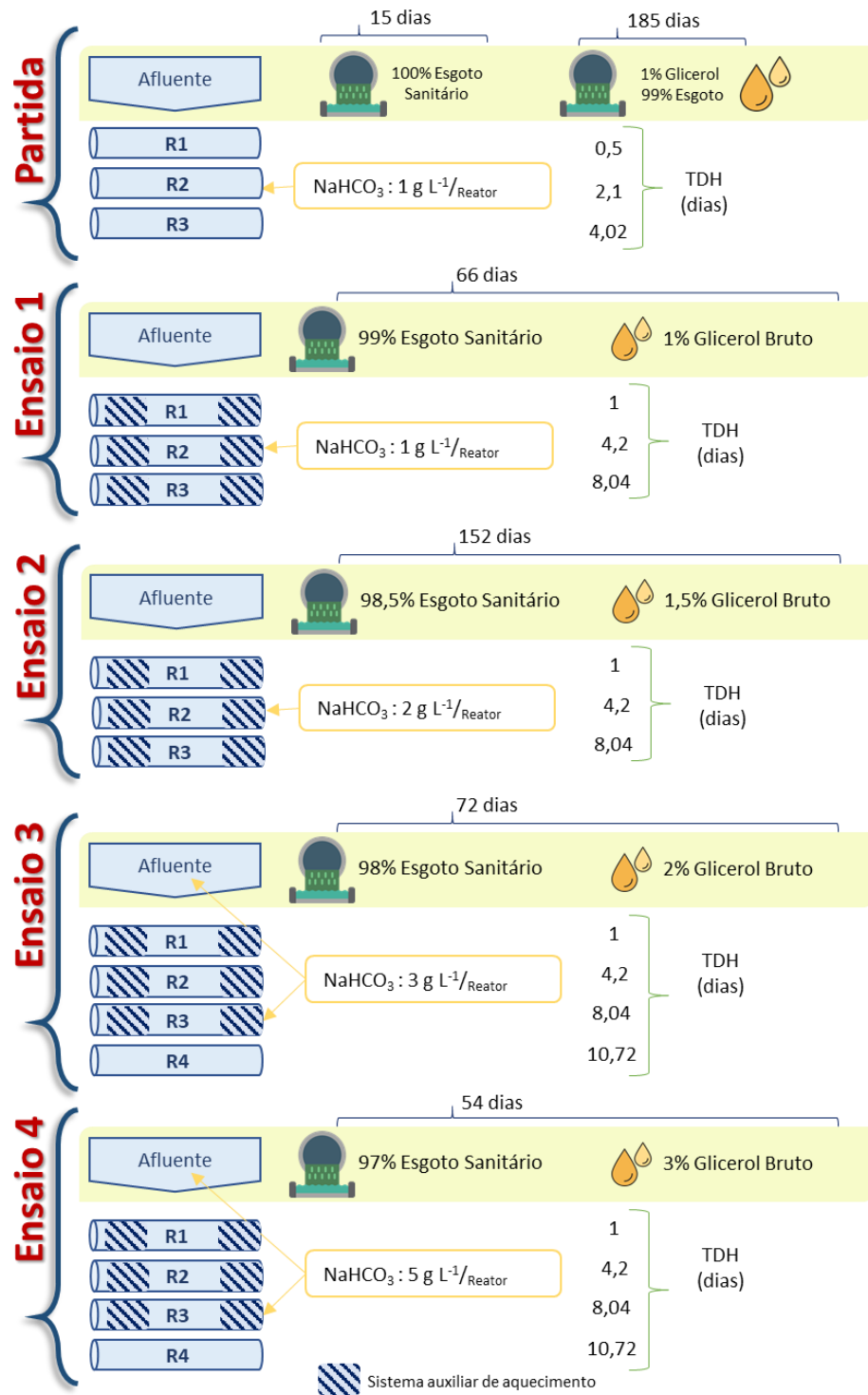
O conteúdo do **Capítulo III** é referente à versão modificada do artigo publicado na revista Bioenergy Research, em 2022, com dados obtidos durante a fase de partida e ensaio 1, contemplando análises de biologia molecular em Larga Escala e alterações temporais nas populações microbianas, ao longo dos reatores RAHLF, em análises de DGGE.

O **Capítulo IV** contempla o artigo submetido, com modificações, à publicação na revista Bioenergy Research em julho/2022 e apresenta os dados finais referentes aos ensaios 2, 3 e 4, realizados com proporções crescentes de glicerol bruto, co-digeridos em esgoto sanitário.

O **Capítulo V** discute os principais resultados obtidos durante a operação do RAHLF instalado em série, numa visão geral de todos os dados obtidos, durante o projeto de doutorado.

No **Apêndice A** foram apresentados os resultados obtidos durante o doutorado sanduiche realizado em Quebec, QC, Canada, no período de outubro de 2021 a março de 2022.

Figura 1 - Esquema das condições operacionais dos reatores RAHLF (R1, R2, R3 e R4) instalados em série durante a partida e ensaios de 1-4.



CAPÍTULO I

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Geração de Resíduos

1.1.1 Produção de Biodiesel e Glicerol

Em 2017, a produção mundial de biodiesel foi em cerca de 36 bilhões de litros, com a União Europeia (UE) na primeira posição, gerando 13,5 bilhões de litros, seguida pelos EUA com 6,9 bilhões de litros e o Brasil com 4,3 bilhões de litros de biodiesel produzidos (ANP, 2021; REN21, 2019). Em 2018, a produção global aumentou, chegando a cerca de 41,3 bilhões de litros, dos quais a UE produziu cerca de 15 bilhões de litros e o Brasil aumentou 13% em 2018 para 5,3 bilhões e em 2019 para 5,9 bilhões de litros produzidos (ANP, 2021; REN21, 2019).

O biodiesel é gerado em todo o mundo sob a proteção de leis, regulamentos específicos e benefícios fiscais, (DA SILVA CÉSAR *et al.*, 2019). No Brasil, o biodiesel tem sido adicionado ao óleo diesel de forma gradativa. Os países com maior percentual mandatório de concentração de biodiesel no diesel comercial, são Costa Rica, Indonésia e Índia com 20%, seguidos por Brasil e Colômbia com 10% (REN21, 2019).

A mistura do biodiesel ao diesel fóssil no Brasil teve início em 2004, em caráter experimental e, entre 2005 e 2007, no teor de 2%. A obrigatoriedade veio no artigo 2º da Lei nº 11.097/2005, que introduziu o biodiesel na matriz energética brasileira. Em janeiro de 2008, entrou em vigor a mistura legalmente obrigatória de 2% (B2), em todo o território nacional. Com o amadurecimento do mercado brasileiro, esse percentual foi sucessivamente ampliado pelo CNPE (Conselho Nacional de Política Energética) até o percentual de 13%, introduzido a partir de março de 2021 (ANP, 2020). Com a pandemia de COVID-19, em setembro de 2021 o CNPE adotou a redução do percentual do Biodiesel para 10% em 2021, medida que será mantida durante todo ano de 2022 (CNPE, 2021).

A produção de biodiesel foi estimulada no Brasil pelo Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel. Este programa tem os objetivos de garantir a produção e o consumo interno de biodiesel, e a promoção da diversificação das fontes de matéria-

prima, inclusão social e desenvolvimento regional por meio da geração de emprego e renda para pequenos agricultores rurais (DA SILVA CÉSAR *et al.*, 2019).

Biodiesel, denominação popular do composto éster metílico de ácidos graxos de cadeia longa, é basicamente derivado do processo denominado transesterificação de triglicerídeos (óleos vegetais, sebo / gorduras animais, resíduos de óleos de cozinha, plantas comestíveis, biomassa, microalgas) com um álcool (metanol ou etanol) usando um catalisador básico ou ácido adequado (CHOUHAN; SARMA, 2011; KONG *et al.*, 2016). Durante o processo de produção, são formadas duas fases, a superior (sobrenadante) denominada biodiesel e a fase inferior (sedimentável) denominada glicerol bruto (GB), as quais são então separadas facilmente após repouso da mistura de reação por algumas horas em pH neutro (KAUR *et al.*, 2020).

O glicerol, também conhecido como 1,2,3-propanotriol, e comumente chamado de glicerina, é um composto e recurso da indústria oleoquímica e farmacêutica. É co-produto primário da indústria de biodiesel, e sua produção é de cerca de 10% em peso da quantidade de biodiesel produzida. A produção de glicerol mundial gira em torno de 41,9 bilhões de litros, e 66% é gerada na cadeia produtiva do biodiesel (MONTEIRO *et al.*, 2018).

Em 2018 a geração de GB pelas indústrias brasileiras de biodiesel foi de 440 milhões de litros, havendo aumento de 12,3% em 2019, atingindo a marca de 494 milhões de litros de glicerol produzido (ANP, 2021). Em 2020 este número subiu para 580 milhões de litros, sendo as regiões centro-oeste e sul as maiores produtoras atingindo 245,3 e 226,7 m³ de glicerol bruto, respectivamente.

O aumento gradativo na produção de biodiesel vem criando um excedente de glicerol, resultando em uma queda dramática nos preços do GB, desestimulando o processo de refinaria (MARAGKAKI *et al.*, 2017; PAN *et al.*, 2019). Quando a produção de glicerol é maior do que a demanda, o GB se torna um resíduo ao invés de um produto (BADIA-FABREGAT *et al.*, 2019). Portanto, novas tecnologias de valorização do glicerol são muito importantes para aumentar o valor deste composto, convertê-lo em produtos de valor agregado, mantendo a sustentabilidade da cadeia de produção do biodiesel.

Uma vez que a principal fonte de produção do glicerol é através das usinas de biodiesel, o preço do GB vem sendo determinado pela demanda e produção de biodiesel.

Até o ano de 1999 a indústria de produção de ácidos graxos era responsável por 47% da produção mundial de glicerol, sendo gradualmente substituída com o aumento da produção de biodiesel (AYOUB; ABDULLAH, 2012). Esta superprodução de GB deu início a pesquisas de novas aplicações para a destinação do glicerol bruto excedente no mercado. O GB começou ser utilizado na indústria química na formação de produtos químicos resistentes a manchas, uso para lubrificação e amaciamento de fios e tecidos; na indústria alimentícia no desenvolvimento de adoçantes seguros, preservação e agente espessante; na alimentação de vacas, porcos e aves; como combustível líquido na conversão em etanol ou hidrogênio, queima como *pellets* de combustível, combustão em incineradores e caldeiras; e na biotecnologia na produção de ácidos graxos orgânicos, ômega-3, produção de ácido succínico e ácido eicosapentaenóico (ANITHA *et al.*, 2016; KUMAR *et al.*, 2019; MOTA *et al.*, 2017).

Além da produção excessiva de GB, outro fator crítico para diminuição de seu valor de mercado é devido a seu baixo teor de glicerina e presença de contaminantes como umidade, metanol, cinzas, sabão, ácidos graxos, sais e catalisadores. O glicerol bruto da indústria de biodiesel contém cerca de 25% de carbono e elementos como Na, Ca, K, Mg, Na, P e S (KUMAR *et al.*, 2019). A concentração desses elementos geralmente está na faixa de 4 a 163 ppm, exceto Na e K, que podem exceder a concentração de 1% (p/v). Além dos elementos químicos, o glicerol bruto também contém proteínas (0,06–0,44%), gorduras (1–13%) e carboidratos (75–83%) (AYOUB; ABDULLAH, 2012).

A composição do GB é diretamente alterada com as modificações dos parâmetros operacionais de cada indústria e a matéria prima utilizada na produção do biodiesel. A transesterificação de matéria-prima com teor de ácidos graxos livres acima de 2% (p/p), como gordura animal ou óleos de cozinha residuais com catálise alcalina resulta na formação de sabão (SANFORD *et al.*, 2009). A água presente durante a reação também pode causar hidrólise de triglicerídeos a ácidos graxos livres, o que resulta na formação de sabão, que pode existir na forma de oleato de sódio ou oleato de potássio. O glicerol bruto também pode apresentar alto teor de metanol, pois o excesso de metanol (razão molar álcool:óleo > 3:1) é usado durante a reação de transesterificação e o metanol não reagido entra na fase de GB após a separação de fases (KUMAR *et al.*, 2019).

O potencial efeito tóxico do GB pode se tornar um fator limitante do sucesso em sua aplicação em biorreatores (KUMAR *et al.*, 2019; RODRIGUES *et al.*, 2020). A ação combinada de sabão do excesso em altas concentrações de oleato de sódio pode causar efeitos negativos no crescimento celular. Diversos problemas podem ser causados por altas concentrações de sais inorgânicos presentes no GB, que se originam do catalisador utilizado para a produção de biodiesel. Esses sais podem se acumular no reator e têm um impacto negativo na atividade dos microrganismos metanogênicos. O efeito inibitório dos sais pode ser ignorado durante experimentos de batelada, devido à sua baixa concentração (HUTŇAN *et al.*, 2013). Porém, ainda há necessidade de mais estudos em diferentes configurações de reatores com alimentação contínua de GB, durante longos períodos para determinar o impacto causado à microbiota exposta.

1.1.2 Esgoto Sanitário

Os esgotos sanitários municipais são um problema no mundo todo. De acordo com Rajasulochana e Preethy (2016) aproximadamente 1,1 bilhão de pessoas no mundo utilizam água de fontes contaminadas. O esgoto sanitário é constituído em quase sua totalidade por água (99,9%) e sólidos (0,1%). Além da matéria orgânica solubilizada, os sólidos presentes no esgoto podem ser divididos em orgânicos (proteínas, carboidratos, lipídios e micro-organismos) e inorgânicos (amônia, nitratos, ortofosfatos, etc.) (VON SPERLING, 1996). As maiores populações microbianas encontradas nos esgotos sanitários e nos sistemas de tratamento de águas residuais são bactérias, protozoários, algas, fungos, vírus e helmintos, organismos estes que podem levar à propagação de doenças.

A quantidade de matéria orgânica é um dos principais parâmetros para a análise do esgoto doméstico, sendo a DQO utilizada como medida indireta da matéria orgânica. Na literatura os valores da DQO do esgoto sanitário é relatado entre 200 a 800 mg L⁻¹ (JORDÃO; PESSOA, 1995). Variações deste valor podem acordo com a região e concentração populacional, Silva *et. al.* (1997) quantificaram a DQO de esgotos sanitários, que variou de 455 a 1021 mg L⁻¹, em cinco estações de tratamento do município de Vitória – ES, e mostraram que apesar da constituição das águas residuárias serem similares, elas variam de acordo com as características socioeconômicas,

medição do sistema de distribuição de água, hábitos culturais e alimentares, comprimentos de redes, entre outros.

Quando comparado a outros efluentes industriais ou resíduos, como o glicerol bruto oriundo da produção do biodiesel, que pode chegar em torno de 2 kg de DQO L⁻¹; os esgotos sanitários podem ser considerados pobres em matéria orgânica (RODRIGUES *et al.*, 2019), por possuírem DQO em torno de 350 mg L⁻¹ (ADAMES *et al.*, 2021). O que o torna vantajoso para co-digestão, por propiciar diluição na DQO de um resíduo de maior concentração, além de outras vantagens como possuir nutrientes como nitrogênio e fósforo, que são importantes para a microbiota dos reatores anaeróbios.

1.2 Reatores Anaeróbios Horizontais de Leito Fixo (RAHLF)

As técnicas de digestão anaeróbia vêm sendo aperfeiçoadas no intuito de melhorar a qualidade do efluente tratado, a produção e o aproveitamento do biogás. Os sistemas anaeróbios de alta taxa caracterizam-se pela capacidade de grande retenção de biomassa microbiana, permitindo baixos tempos de detenção hidráulica (TDH) e altas cargas orgânicas volumétricas (COV) (KUCZMAN *et al.*, 2014).

Os reatores de alta taxa permitem a digestão de compostos orgânicos complexos em menores tempos, em virtude da retenção de biomassa microbiana no leito fixo pela criação de biofilmes permitindo a sua operação com menores TDHs (SINGH; PRERNA, 2009). Na literatura observa-se que reatores de alta taxa têm capacidade de operar com 4 a 15% sólidos, TDHs de 0,5 a 12 dias (NIZAMI; MURPHY, 2010), o que os torna adequados para o tratamento de resíduos ricos em matéria orgânica, como glicerol bruto oriundo da produção de biodiesel.

Os tratamentos anaeróbios de esgotos que outrora eram considerados inviáveis, em virtude das falhas na aplicação de projetos, atualmente vem sendo cada vez mais empregados (SPEECE, 2008). A retenção da biomassa dentro dos reatores anaeróbios de alta taxa é um dos atrativos, pois melhora a qualidade do efluente. Os reatores anaeróbios de leito fixo, por exemplo, têm essa capacidade de retenção em virtude da imobilização no material suporte da biomassa e da formação de biofilmes. O uso de reatores anaeróbios de alta taxa vem sendo bem aceito, em países com baixo poder

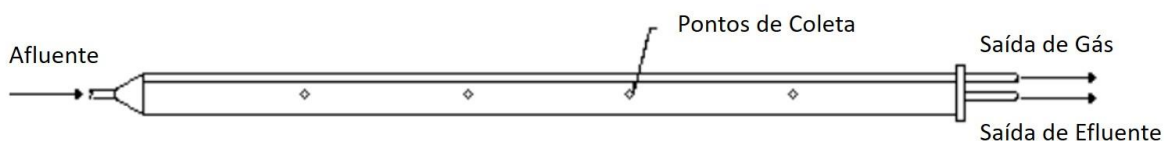
aquisitivo e nações desenvolvidas, graças a sua viabilidade e bons resultados nos tratamentos de esgotos sanitários (ABREU; ZAIAT, 2008).

Zaiat; Cabral; Foresti, (1994), desenvolveram os reatores anaeróbios horizontais de leito fixo (RAHLF) que como característica principal possui material suporte para a imobilização da biomassa dentro do reator, permitindo TDHs menores e tempos de retenção de sólidos (TRS) maiores. O meio suporte inicial utilizado foi a espuma de poliuretano. Porém, SARTI (1998) observou uma perda da hidrodinâmica no leito do reator em virtude da colmatagem, gerando entupimentos. Mas pode-se utilizar outros tipos de materiais suporte para imobilizar a biomassa, como anéis de bambu (MAZARELI *et al.*, 2016), e eletrodutos (conduítes) (DUDA *et al.*, 2015), buscando-se sempre materiais que tenham uma grande área superficial para a aderência da biomassa.

A baixa mistura longitudinal esperada em reatores de leito fixo é ainda facilitada pelo desacoplamento do fluxo de líquido (longitudinal) e do fluxo de biogás (radial). O RAHLF é capaz de manter elevadas concentrações de biomassa e altos tempos de retenção celular e se espera que promova a distribuição axial da diversidade microbiana devido à espacialização das etapas metabólicas da digestão anaeróbia (OLIVEIRA *et al.*, 2017).

As principais características do reator anaeróbio horizontal de leito fixo (**Figura I.1**) foram projetadas para o tratamento de águas residuárias com uma configuração próxima ao escoamento pistonado e desenvolvimento de modelos matemáticos mais simples para análise e aumento de escala (ZAIAT, 2003). Inicialmente no tratamento de água residuária de indústria de papel, Foresti *et al.*, (1995) trabalharam com um TDH de 9,2 horas, temperatura ambiente média de 23°C, e COV de 5,0 g DQO (m³ d)⁻¹ obtiveram remoções de DQO de 82%.

Figura I.1 - Esquema de um reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF)



Fonte: ZAIAT *et al.*, (1997)

Em trabalhos posteriores, os RAHLFs foram avaliados no tratamento de águas residuárias sintéticas simples, à base de glicose (ZAIAT *et al.*, 1997), no tratamento de águas residuária contendo pentaclorofenol, onde Damianovic (1997) relatou o grande potencial dos RAHLFs no tratamento de composto tóxicos, e também estudos com esgoto sanitário (ZAIAT *et al.*, 1998). Estes reatores vem sendo aplicados com sucesso no tratamento de uma ampla gama de compostos tóxicos e xenobióticos, como benzeno, tolueno, etil-benzeno e xileno (DE NARDI *et al.*, 2002), fenol (BOLAÑOS *et al.*, 2001). , pentaclorofenol (SAIA *et al.*, 2007), surfactantes (OLIVEIRA *et al.*, 2009) e formaldeído (OLIVEIRA *et al.*, 2004), bem como águas residuais recalcitrantes, como efluente de branqueamento de celulose (CHAPARRO *et al.*, 2010), drenagem ácida de mina (RODRIGUEZ *et al.*, 2016) e outras águas residuais ricas em sulfato (ZAMARIOLLI DAMIANOVIC *et al.*, 2016).

Os RAHLFs também foram estudados no tratamento de água residuária de suinocultura. Santos e Oliveira (2011) trataram as águas residuárias de suinocultura em sistema combinado anaeróbio-aeróbio com concentrações médias de sólidos suspensos totais (SST) de 18.624 e 11.395 mg L⁻¹. Foram utilizados quatro reatores anaeróbios horizontais com volume total de 49,5 L cada, um com manta de lodo (RAHML) e três de leito fixo (RAHLF), instalados em série, com meio suporte constituído por anéis de bambu, anéis plásticos de eletroduto corrugado e anéis de bucha (*Luffa cylindrica*), respectivamente. Os pesquisadores utilizaram neste estudo COV aplicadas no R1 de 53 e 61 g DQO (L d)⁻¹, e obtiveram eficiências médias de remoção de DQO_{total} de 96 e 99% e remoção de SST de 96 e 95%. Os valores médios de produção volumétrica de metano, nos RAHFL foram de até 0,744 m³ CH₄ (m³ reator d)⁻¹.

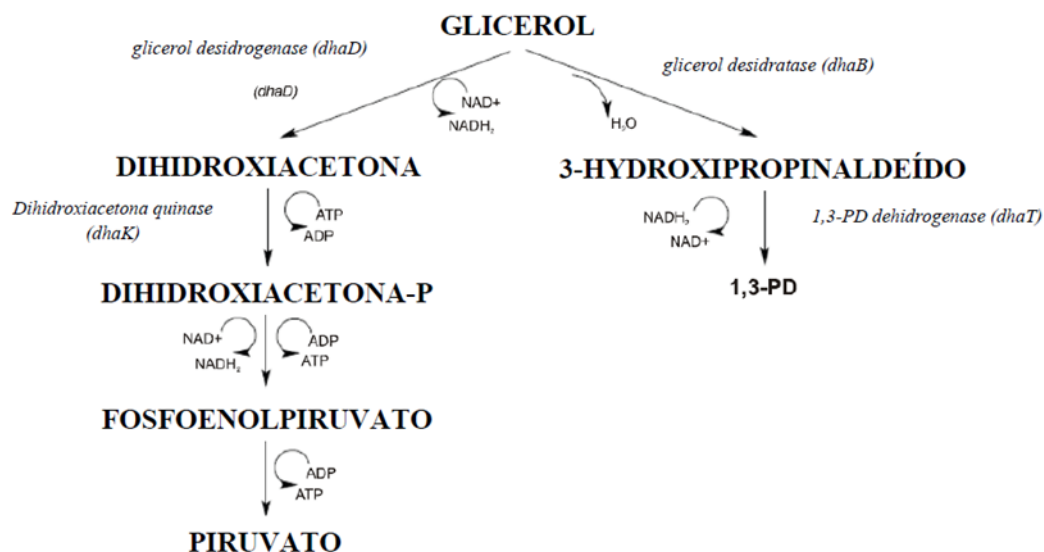
O trabalho de Mazareli *et al.* (2016), empregando a co-digestão de água residuária de suinocultura com resíduos sólidos vegetais, em RAHLF em série, foi promissor. Os autores obtiveram melhorias na qualidade do efluente com remoções de 99,99% de coliformes totais e termotolerantes, assim como remoções máximas de 95% de DQO_{total}, 86% de DQO dissolvida, 97% de SST e 98% de SSV. Estudos empregando novos substratos utilizando os RAHLFs para digestão anaeróbia podem contribuir para a melhoria na adaptação e desenvolvimento destes reatores.

1.3 Digestão Anaeróbia de Glicerol

Dentre as diferentes alternativas de valorização do glicerol, a digestão anaeróbia é uma forma interessante de tratar o glicerol bruto e converter sua matéria orgânica em produtos de valor agregado como álcoois, ácidos graxos voláteis e biogás (RODRIGUES *et al.*, 2020); sem a necessidade de purificação, com baixo custo para produção de biogás para aplicações como combustível para caldeiras de geração de calor, úteis para a própria indústria de biodiesel (FONTENELLE *et al.*, 2017).

Existem duas vias metabólicas conhecidas de decomposição do glicerol: oxidativa e redutiva. Na oxidativa, o glicerol é convertido a piruvato e posteriormente para formiato, etanol, butirato e acetato. Na via redutiva, o glicerol é reduzido a 3-hidroxi propionaldeído e depois a 1,3-propandiol (1,3-PD) (Figura I.2). Esta via é ativa porque o estado reduzido do carbono no glicerol é menor do que na biomassa. Portanto a geração de nova biomassa a partir do glicerol resulta em maior quantidade de NADH, utilizado na transformação do glicerol em 1,3-PD (YAZDANI; GONZALEZ, 2007). Temudo *et al.* (2008), utilizando cultura mista na degradação de glicerol, observaram que o aumento da concentração de glicerol no meio resulta em diminuição gradual da produção de etanol, enquanto há aumento na produção de 1,3-PD e de ácido acético.

Figura I.2 – Via de produção de 1,3-Propanodiol



Fonte: Adaptado de Drozdzyńska *et al.*, (2011)

A conversão do glicerol no intermediário metabólico piruvato gera o dobro de equivalentes redutores produzidos durante o metabolismo de açúcares lignocelulósicos, como glicose ou xilose (CLOMBURG; GONZALEZ, 2013). Esses equivalentes redutores adicionais fornecem ao glicerol a vantagem natural de maiores rendimentos teóricos. O uso de glicerol permite a coprodução de etanol e ácido fórmico (ou etanol e hidrogênio), enquanto a fermentação de açúcares como a glicose determina que cerca de metade de seu peso seja perdido como CO₂, reduzindo o rendimento do produto (CLOMBURG; GONZALEZ, 2013).

1.3.1 Produção de 1,3-Propanodiol e Ácidos Graxos Voláteis

Mais de cem mil toneladas de 1,3-propanodiol (1,3-PD) são produzidos anualmente (preço de mercado de 1,8 €/kg) e a maioria é gerada através de processos fermentativos de açúcares ou glicerol (BURNIOL-FIGOLS *et al.*, 2018). O 1,3-PD é amplamente utilizado na produção e formulação de diversos produtos, dentre eles polímeros, como o polítrimetileno tereftalato (PTT), que apresenta vantagens e preço competitivo em relação ao polietileno tereftalato (PET) e butileno politereftalato (PBT) (ZENG; SABRA, 2011). Ele também pode ser usado como aditivo pela indústria alimentícia e farmacêutica; como aditivo para melhorar as propriedades de solventes e na produção de adesivos, resinas de poliéster, tintas, lubrificantes, anticongelantes, cosméticos e biocidas (SUN *et al.*, 2018).

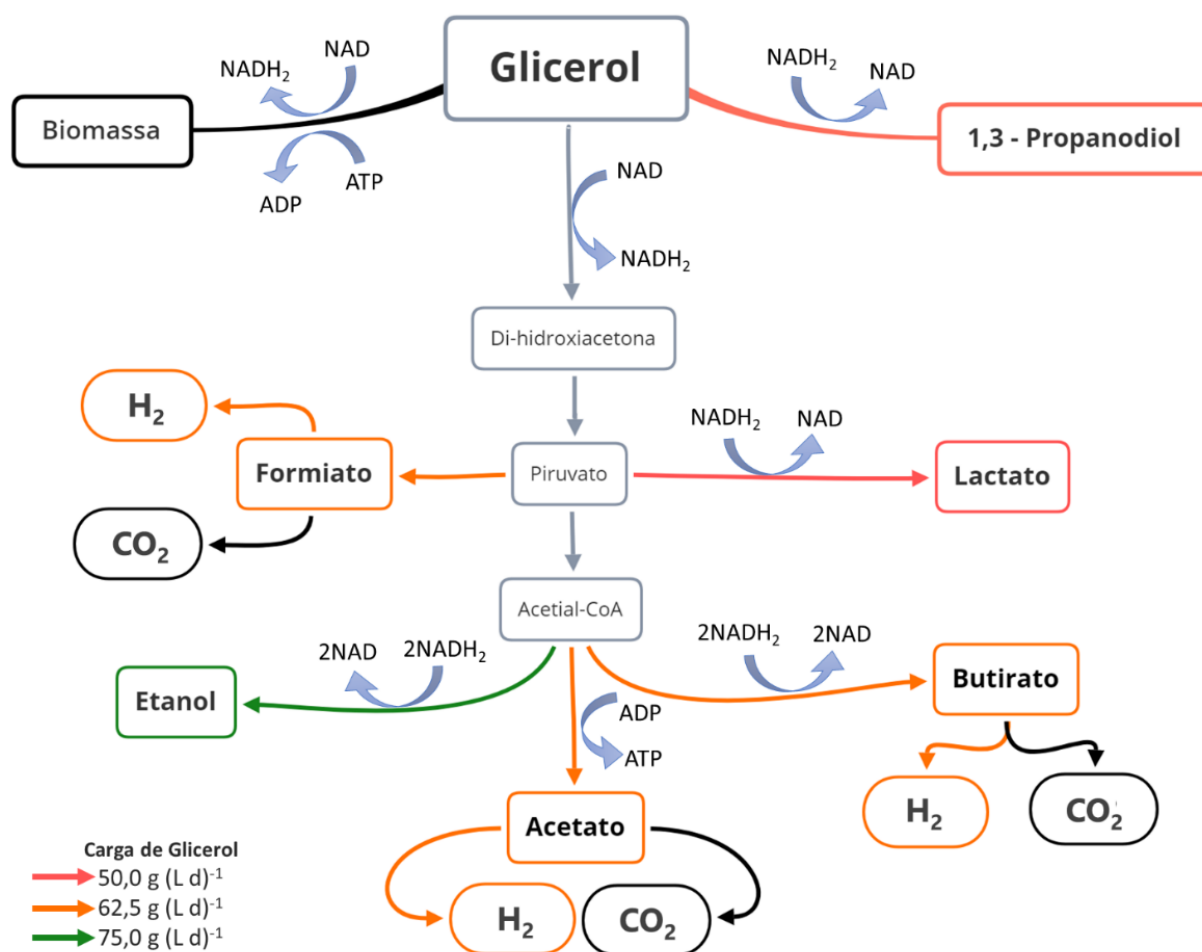
O glicerol é o substrato mais estudado para a produção biológica de 1,3-PD. Além disso, 1,3-PD é formado por via redutiva durante a fermentação. Como cada carbono do glicerol possui um grupo hidroxila, há uma tendência natural de redução (VERAS *et al.*, 2019). Diversos microrganismos já foram relatados como produtores de 1,3-PDO, como *Klebsiella pneumoniae* (LEE *et al.*, 2018), *Clostridium butyricum* (YUN *et al.*, 2018), *C. acetobutylicum* (FORSBERG, 1987), *C. pasteurianum* (LUERS *et al.*, 1997), *C. beijerinckii* (WISCHRAL *et al.*, 2016), *Escherichia coli* (PRZYSTAŁOWSKA *et al.*, 2015), *Citrobacter freundii* and *Hafnia alvei* (DROZDZYŃSKA *et al.*, 2014), *Lactobacillus brevis*

(VIVEK *et al.*, 2016), *L. diolivorans* (PFLÜGL *et al.*, 2014), and *L. reuteri* (RICCI *et al.*, 2015).

A bioconversão de 1,3-PD é um processo mais atrativo e ambientalmente seguro, quando comparada com as rotas químicas. Além disso, a fim de tornar a produção biológica de 1,3-PD mais economicamente viável, diferentes estratégias de fermentação foram desenvolvidas, tais como: fermentação em estágio único ou em duas etapas; co-digestão; utilização de culturas mistas, dentre outras. Uma vantagem importante da utilização de culturas mistas é a operação dos reatores sob condição não esterilizada, o que pode reduzir significativamente o investimento e os custos operacionais (DIETZ; ZENG, 2014; ZHOU *et al.*, 2017). Um reator de manta de lodo granular expandido foi inoculado com culturas mistas provenientes de lodo granular e operado continuamente para produzir 1,3-PD a partir de glicerol com um rendimento máximo de 1,3-PD de 0,52 mol/mol⁻¹ e produtividade de 57 g L⁻¹ d⁻¹ em tempos de retenção hidráulica de 12 e 3 h, respectivamente. Não foi observada produção de metano durante a fermentação conduzida em condições não estéreis (GALLARDO *et al.*, 2014).

A carga orgânica volumétrica (COV) aplicada nos reatores anaeróbios pode ser um grande determinante para definir rotas metabólicas da degradação do glicerol, e quais produtos serão gerados, graças a consequente inibição ou favorecimento de condições para microrganismos específicos. Sittijunda and Reungsang (2020), aplicando diferentes COVs em um reator UASB alimentado com glicerol, conseguiram documentar mudanças nas vias metabólicas. Ao aplicar uma COV de 50 g (L d)⁻¹, notaram que a via redutiva prevaleceu, resultando em uma concentração elevada de 1,3-propanodiol (1,3-PD) e produções de ácido láctico. Com COV aumentada para 62,5 g (L d)⁻¹, a via metabólica alterou de redutiva para oxidativa, acarretando na obtenção de elevada produção de hidrogênio. Quando aumentaram a COV para 75 g (L d)⁻¹, a via oxidativa continuou sendo favorecida, porém tendo como principal produto o etanol (**Figura I.3**).

Figura I.3 - Influência de diferentes cargas orgânicas de glicerol nas rotas metabólicas fermentativas



Fonte: Adaptado de Sittijunda e Reungsang, (2020)

Uma ferramenta para controle de COV, além do tempo de detenção hidráulica (TDH), é a diluição do glicerol bruto com outro efluente que apresente como característica carga orgânica reduzida. No tratamento anaeróbico o termo co-digestão é utilizado no processo de digestão anaeróbia com dois ou mais tipos de resíduos orgânicos, tendo como vantagem as características complementares destes diferentes substratos, na busca por uma maior produção de biogás (BELLE *et al.*, 2015; LINKE *et al.*, 2013; YAO *et al.*, 2014). Segundo Xie *et al.*, (2011) além da vantagem do aumento na produção de biogás, a co-digestão pode também diminuir a inibição por potenciais tóxicos e proporcionar relação C/N adequada para o processo, que são fatores primordiais para melhoria na estabilidade do processo de digestão anaeróbia.

A produção de ácido propiônico (HPa), um produto químico amplamente utilizado em plásticos de celulose, herbicidas e perfumes, tem sido estudada com anaeróbios Gram-positivos, não formadores de esporos do gênero *Propionibacterium*, que apresentam capacidade de utilizar glicerol em condições fermentativas (BARBIRATO *et al.*, 1997; CAVERO-OLGUIN *et al.*, 2021; HIMMI *et al.*, 2000). *Propionibacterium* produzem HPa através do ciclo Wood-Werkman a partir de diferentes açúcares ou glicerol (ROGERS *et al.*, 2014). O glicerol, sendo uma fonte de carbono mais reduzida que os açúcares, proporciona maior rendimento de ácido propiônico, que é teoricamente 1 mol/mol (BARBIRATO *et al.*, 1997; CORAL *et al.*, 2008; ROGERS *et al.*, 2014). Em condições experimentais, entretanto, o rendimento pode variar entre 0,6 e 0,9 mol/mol, sendo o ácido succínico, ácido acético e n-propanol os principais subprodutos (BARBIRATO *et al.*, 1997). Utilizando cultura de *Propionibacterium acidipropionici* na digestão de glicerol na concentração de 90 g L⁻¹ Dishisha *et al.* (2015) obtiveram uma concentração de 32,10 g L⁻¹, mantendo um rendimento de 0,68 mol de HPa por mol de glicerol.

1.3.2 Co-digestão Anaeróbia e reatores em série

Há estudos bem sucedidos, realizados com o intuito de aumentar a produção de biogás, com a adição do glicerol bruto na co-digestão com esterco suíno (VERONEZE *et al.*, 2019), glucose (SAWASDEE *et al.*, 2019), ácido acético (HAOSAGUL *et al.*, 2019), lodo de esgoto (ATHANASOULIA *et al.*, 2014), fração orgânica do lixo municipal (SILVA *et al.*, 2017) e até amostras de glicerol com diferentes níveis de impureza (SCHWINGEL *et al.*, 2019), entre outros. No trabalho de Rodrigues *et al.* (2020) a co-digestão do glicerol bruto em esgoto sanitário facilitou sua degradação, graças a vantagens que o esgoto trouxe, como a diluição de compostos potencialmente tóxicos como metanol, e a suplementação de micro e macronutrientes como nitrogênio e fósforo, evitando assim a inibição dos microrganismos.

O emprego da co-digestão em reatores anaeróbios de alta taxa com alimentação contínua, também apresenta vantagem de menores TDH e maiores COV quando

comparados a biodigestores. Mazareli et al., (2016) estudando a co-digestão de água residuária de suinocultura com resíduos vegetais na proporção de 70:30 em reatores anaeróbios horizontais (RAHLF) com alimentação contínua, com TDH de 2 dias e COV 11 g DQO (L d^{-1}) relataram uma taxa de produção média de metano de 1,08 L CH_4 por g DQO removida, evidenciando a viabilidade do emprego da co-digestão em reatores RAHLF.

Aliada à co-digestão, a separação de fases em reatores anaeróbios é outra estratégia utilizada para aprimorar a performance da digestão anaeróbia. Kanchanasuta e Sillaparassamee (2017), compararam a energia recuperada em sistemas de reatores batelada operados em dois estágios e estágio único alimentados com GB e resíduo do beneficiamento de óleo de palma. Os autores relataram nos sistemas operados em dois estágios o aumento da produção de metano em 1,6 vez e 6,2 vezes na produção de hidrogênio quando comparados a digestão em um estágio, atingindo uma recuperação energética de 0,056 kWh por sólidos totais adicionados.

O conceito de separação de um sistema anaeróbio em diferentes estágios é idealizado para fornecer condições adequadas para as etapas sequenciais de hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese em cada biorreator. Para alcançar sucesso nesta separação, o projeto do sistema deve fornecer uma proporção volumétrica adequada para cada biorreator, para corresponder às diferentes taxas de crescimento de cada etapa da digestão anaeróbia. Além de proporcionar a separação da produção de hidrogênio e metano, sistemas de reatores em série propiciam a aplicação de maiores COV ($15 \text{ kg DQO m}^3 \text{ d}^{-1}$) quando comparados a sistemas operados em um estágio, onde a faixa ótima de operação é de 5 a 7 $\text{kg DQO m}^3 \text{ d}^{-1}$ (RÁDULY *et al.*, 2016; TANGKATHITIPONG *et al.*, 2017). Jiraprasertwong *et al.* (2020) obtiveram sucesso no tratamento de água residuária da produção de etanol em três reatores UASB instalados em série, conseguindo aplicar COV de $25 \text{ kg DQO m}^3 \text{ d}^{-1}$, atingindo remoções de DQO de até 95%.

Até a realização do presente estudo, a aplicação de glicerol bruto em reatores RAHLF com mais de dois estágios ainda não havia sido relatada.

CAPÍTULO II

Este capítulo apresenta uma versão modificada do artigo publicado na Revista Matéria ISSN 1517-7076, Qualis A4, aceito em 11/01/2021, contendo os dados parciais do reator R1 referente a partida do reator e os ensaios 1 e 2.

ADAMES, L. V.; PIRES, L. O.; ADORNO, M. Â. T.; MAINTINGUER, S. I. Hydrogen production in anaerobic continuous flow reactor using crude glycerol from biodiesel production. **Revista Matéria**, v. 26, n. 2, 2021.

PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO EM REATOR ANAERÓBIO DE FLUXO CONTÍNUO UTILIZANDO GLICEROL BRUTO ORIUNDO DA PRODUÇÃO DE BIODIESEL

Hydrogen production in anaerobic continuous flow reactor using crude glycerol from biodiesel production

Luan Vieira Adames^{1,2}, Lorena Oliveira Pires¹, Maria Ângela Tallarico Adorno³, Sandra Imaculada Maintinguer^{2,4}

¹ Instituto de Química/UNESP, Rua Prof. Francisco Degni, n. 55, Araraquara, SP, Brasil.

² IPBEN/UNESP, Rua 10, n. 2527, Rio Claro, SP, Brasil

³ Universidade de São Paulo, USP, Laboratório de Processos Biológicos - LPB (Av. João Dagnone, 1100, Jd. Santa Angelina), São Carlos, São Paulo, Brasil.

⁴ Universidade de Araraquara, Uniara - Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento Territorial e Meio Ambiente, (Rua Carlos Gomes, 1338, Centro), Araraquara, São Paulo, Brasil
e-mail: lvadames@gmail.com, Sandra.i.maintinguer@unesp.br

RESUMO

O esgotamento das reservas de petróleo e a crescente preocupação com as mudanças climáticas têm acelerado novas pesquisas para obtenção de energias renováveis. A produção de biogás através da digestão anaeróbia vem se mostrando uma ótima opção, não só para produção de energia, como também para manejo adequado de resíduos orgânicos. O biodiesel teve sua produção aumentada em diversos países por ser um combustível renovável e biodegradável. Entretanto, é largamente obtido da transesterificação de óleos vegetais e animais, onde seu rendimento é 9 litros de biodiesel para 1 litro de glicerol. O glicerol bruto possui grau reduzido de pureza, se tornando uma matéria-prima barata com potencial para produção de energia renovável, principalmente gás hidrogênio (H₂) e metano (CH₄). Nesse sentido, os objetivos deste estudo foram: operar um reator horizontal de leito fixo (RAHLF), com alimentação contínua e determinar a partida do mesmo na produção de H₂ a partir de glicerol bruto residual de biodiesel, co-digerido em esgoto sanitário nas fases de: partida, ensaio 1 e ensaio 2. Durante a fase de partida e Ensaio 1, o afluente foi constituído de 99% esgoto 1% glicerol bruto (v/v) e

1,5% de glicerol bruto no Ensaio 2. Na partida e ensaio 1 foram verificadas médias de produção de $1 \text{ mol H}_2 \text{ m}^3 \text{ d}^{-1}$ e $3,2 \text{ mols H}_2 \text{ m}^3 \text{ d}^{-1}$, respectivamente. A maior produção diária atingida foi $11,34 \text{ mols H}_2 \text{ m}^3 \text{ d}^{-1}$ no Ensaio 2 com geração média de ácidos graxos voláteis (AGV) de $3414,0 \text{ mg L}^{-1}$. Tais resultados foram promissores e novos avanços com proporções mais elevadas do glicerol bruto e agentes tamponantes poderão evitar grandes variações de pH, viabilizando assim gerações mais elevadas e mais estáveis de H_2 , em reatores contínuos.

Palavras-chave: Biogás. Esgoto Sanitário. Reator Contínuo.

ABSTRACT

The depletion of oil reserves and the growing concern about climate change have accelerated new research to obtain renewable energy. The production of biogas through anaerobic digestion has proved to be a great option, not only for energy production, but also for the proper management of organic waste. Biodiesel had its production increased in several countries as it is a renewable and biodegradable fuel; moreover, it does not require major modifications for its use in diesel engines. However, it is largely obtained from the transesterification of vegetable oils and animal fat, where its yield is 9 volumes of biodiesel to 1 volume of glycerol. The crude glycerol has a low degree of purity, becoming an inexpensive raw material with the potential to produce renewable energy, mainly hydrogen gas (H_2) and methane (CH_4). In this sense, the objectives of this study were: to operate a horizontal anaerobic reactor with fixed bed (HARFB), with continuous feeding and to determine its start in the production of H_2 from residual biodiesel glycerol co-digested in sanitary sewage in the phases from: Startup, Test 1 and Test 2. During the Startup and Test 1 assay, the affluent was constituted by 99% sewage 1% crude glycerol (v/v) and 1.5% crude glycerol in Test 2. At Startup and Test 1, production averages of $1 \text{ mol H}_2 \text{ m}^3 \text{ d}^{-1}$ and $3.2 \text{ moles H}_2 \text{ m}^3 \text{ d}^{-1}$ were verified, respectively. The highest daily production achieved was $11.34 \text{ moles H}_2 \text{ m}^3 \text{ d}^{-1}$ in Test 2 with an average generation of volatile fatty acids (VFA) of 3414.0 mg L^{-1} . Such results were promising and new advances with higher proportions of crude glycerol and buffering agents could avoid large pH variations, thus enabling higher and more stable generations of H_2 in continuous reactors.

Keywords: Biogas. Sanitary sewage. Continuous Reactor.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil está entre os maiores produtores e consumidores de biodiesel, com uma capacidade de produção de mais de 8500 milhões de litros [1]. Cada tonelada de biodiesel produzido gera aproximadamente 100 kg de glicerol bruto; principal coproduto da sua produção. No entanto, a quantidade de glicerol bruto gerado na produção de biodiesel pode variar, dependendo das condições de operação das plantas de transesterificação [2].

O glicerol bruto é obtido a partir da produção de biodiesel, que usualmente ocorre pela transesterificação de óleos vegetais e/ou animais. Além disso, o glicerol em sua forma bruta contém várias impurezas, tais como álcoois, ácidos graxos, ésteres, sabões e metais pesados [3]. Apesar das amplas aplicações de glicerol puro na indústria farmacêutica, alimentar e cosmética, a sua purificação gera custo, especialmente para os pequenos e médios produtores de biodiesel, pois a ampla demanda de glicerol fez o custo de venda baixar nos últimos anos [4], [5]. Nesse sentido, alternativas de manejo do glicerol bruto têm sido estudada tais como combustão, compostagem, inserção na alimentação animal, conversão térmica e biológica [6]–[8].

Dentre as alternativas de manejo, a biodigestão do glicerol tem como vantagem a conversão da matéria orgânica à hidrogênio e metano que podem ser utilizados como biocombustíveis [3], [9]. Para melhorar estas taxas de conversão, vem se estudando o emprego de sua co-digestão com outros resíduos como lodo de esgoto, resíduos da suinocultura, resíduos vegetais e água residuária de cervejaria [9]–[12].

A co-digestão anaeróbia é a utilização combinada de dois ou mais tipos diferentes de resíduos. Tal abordagem vem sendo utilizada para aumentar a capacidade de tamponamento dos reatores anaeróbios e assim diluir compostos químicos potencialmente tóxicos [13]. Além disso, tal estratégia pode suprir a deficiência de nutrientes requeridos pelos micro-organismos anaeróbios [14] e, conseqüentemente, melhorar a produção de biogás a partir de resíduos orgânicos como o glicerol.

A utilização de esgotos sanitários, em virtude da disponibilidade de grandes volumes e da proximidade dos grandes centros consumidores, é uma proposta viável para a co-digestão. De acordo com PEDROZA *et al.* [15], a produção de esgoto doméstico por habitante no Brasil gira em torno de 80 a 200 litros por dia. Segundo

pesquisa do Instituto Trata Brasil [16] apenas 40% do esgoto doméstico gerado no Brasil é tratado. Além disso, a média de esgoto tratado nas 100 maiores cidades brasileiras foi de 40,93% e somente as capitais do país lançaram 1,2 bilhão de m³ de esgotos na natureza em 2013. O uso de reatores anaeróbios para o tratamento de esgotos sanitários é viável para a remoção de matéria orgânica, mas pouco estudado para produção energética de biogás, em virtude da baixa carga orgânica deste efluente [17], [18]. A co-digestão anaeróbia do esgoto sanitário com o glicerol bruto pode proporcionar o aumento da produção de biogás e, conseqüentemente, de energia.

A configuração dos reatores é parte crucial para o sucesso da digestão anaeróbia, bem como as condições operacionais (carga orgânica volumétrica, alcalinidade, pH, composição do substrato) [19]. O foco dos estudos da produção biológica de H₂ são reatores operados em regime de batelada. Entretanto, reatores anaeróbios horizontais de leito fixo (RAHLF) têm sido aplicados com sucesso na co-digestão de resíduos vegetais e águas residuárias de suinocultura [20]. Nenhum estudo foi realizado com o glicerol bruto nessa configuração de reatores, que pode contribuir para consumo de maiores cargas orgânicas de glicerol, uma vez que uma quantidade mais elevada de microrganismos fica aderida ao meio suporte.

Alcançar condições propícias para uma produção biológica contínua de H₂ a partir do glicerol bruto gerado na produção do biodiesel seria um grande avanço para área de biocombustíveis, beneficiando também questões ambientais. Nesse sentido, o objetivo desse estudo foi preencher esta lacuna, realizando o estudo da produção de H₂ em um reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF), alimentado continuamente com glicerol bruto, advindo da produção do biodiesel, co-digerido com esgoto sanitário, em diferentes proporções.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Constituição do afluente

Glicerol bruto foi a principal fonte de matéria orgânica, co-digerido com esgoto sanitário bruto, em diferentes proporções durante os ensaios, conforme descrito a seguir.

2.1.1 Glicerol bruto

O glicerol bruto foi obtido a partir de transesterificação de óleos vegetais e sebo

animal, cedido por empresa de purificação de glicerol (Brotas – SP). O glicerol (**Tabela II.1**) e armazenado em galões polietileno escuro e mantidos em temperatura ambiente até sua utilização.

Tabela II.1 - Caracterização do glicerol bruto

Parâmetro	Resultado	Metodologia
DQO (kg L^{-1})	1,92	APHA 3113-B
Densidade ($\text{g cm}^{-3} - 25^{\circ}\text{C}$)	1,241	ASTM D4052
Umidade (%)	11,41	ASTM E203
Cloretos (%)	5,30	Mohr
Glicerol (%)	80,63	Titulométrico
Cinzas (%)	5,11	ASTM D874
MONG (%)	2,84	ISSO - 2464
pH	4,35	Potenciométrico

DQO: demanda química de oxigênio; MONG: Matéria orgânica não glicerol.

2.1.2 Esgoto sanitário

O esgoto foi concedido pela empresa BRK Ambiental, responsável pela estação de tratamento de esgotos do município de Rio Claro – SP; foi coletado após sua passagem pelo tratamento preliminar (caixa de areia + gradeamento), com DQO (demanda química de oxigênio) média de 350 mg L^{-1} , sólidos totais de 150 mg L^{-1} e pH 7,0. Sua foi realizada semanalmente e foi armazenado em galões de polietileno escuro, mantido em temperatura ambiente.

2.1.3 Tamponamento

Foi adicionado ao afluente bicarbonato de sódio (NaHCO_3) durante o ensaio 1 (1g L^{-1}) e ensaio 2 (3g L^{-1}) para a manutenção da faixa de pH adequada para os microrganismos, além de evitar alterações com a aplicação de elevadas cargas orgânicas volumétricas (COV).

2.2 Fonte de inóculo

Lodo granular metanogênico de um reator UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) utilizado para o tratamento de resíduos do abate de aves, foi cedido pela avícola

Dacar (Tiete – SP), denominado inoculo *in natura*. Com objetivo de inativar os microrganismos metanogênicos, os quais consomem gás hidrogênio para produção de metano, foi realizado o pré-tratamento ácido [21], denominado inoculo pré-tratado. O lodo anaeróbico foi inserido em frascos Duran (2L) contendo 1 L de volume reacional preenchido com meio de cultivo (Extrato de levedura 10g L^{-1} , Peptona 10g L^{-1} , Glicerina 5g L^{-1}) sob pH 3,0, mantido por 24 h e a 37°C . Após esse período o pH do lodo foi ajustado em 5,5 e inserido no reator junto com o meio suporte.

2.3 Parâmetros operacionais do Reator Anaeróbico Horizontal de Leito Fixo (RAHLF)

O RAHLF foi instalado na parte externa do Instituto de Pesquisa em Bioenergia (IPBEN), Rio Claro – SP. Foi confeccionado com cano de PVC, possuindo 3 saídas superiores interconectadas para a coleta de biogás, 3 saídas laterais para coleta de efluentes, pontos de amostragem na entrada e saída, e 3 pontos de coleta localizados na parte inferior do reator, para coleta da biomassa microbiana (lodo anaeróbico). O reator tubular possuía 2 metros de comprimento e 5 cm de diâmetro, preenchido com meio suporte (eletroduto corrugado cortado em anéis de 2 cm de comprimento e 2 cm de diâmetro), resultando em um volume útil do reator de 3,8 litros (Figura II.1).

Figura II.1 - Reator Anaeróbico Horizontal de Leito Fixo (RAHLF)



O reator foi mantido com sistema auxiliar de controle de temperatura, que consistia em mangueiras de silicone enroladas por todo a sua extensão, onde a água aquecida em

um banho maria (37°C) era recirculada de acordo com a temperatura do termostato acoplado na superfície do reator.

Na fase de partida do reator a alimentação foi realizada apenas com esgoto bruto, em velocidade de 6,33 ml min⁻¹ por 15 dias, em seguida foi adicionado 1% (v/v) de glicerol bruto ao afluente por um período de operação de 200 dias. Nos experimentos seguintes (ensaios 1 e 2) a velocidade do afluente foi reduzida para 2,64 mL min⁻¹, o que proporcionou aumento no tempo de detenção hidráulica (TDH) de 10h para 24h. Os ensaios foram operados até a estabilidade nos resultados das análises no efluente e biogás. Durante os ensaios 1 e 2 o afluente foi mantido refrigerado a 4°C e bombeado diretamente para o reator.

Os parâmetros operacionais dos reatores nas fases de partida, ensaio 1 e ensaio 2 estão especificados na **Tabela II.2**.

Tabela II.2 - Parâmetros operacionais e características físico-químicas do afluente

	Duração (dias)	Composição do afluente (v/v)	COV (g DQO (L d) ⁻¹)	DQO (g L ⁻¹)	pH	Adição de NaHCO ₃ (g L ⁻¹)	TDH (horas)
Partida	200	1% Glicerol 99% Esgoto	25,4	10,6	6,34	-	10
Ensaio 1	66	1% Glicerol 99% Esgoto	13,1	13,0	7,18	1	24
Ensaio 2	106	1,5% Glicerol 98,5% Esgoto	18,1	17,9	7,41	3	24

2.4 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS

O afluente e efluente do reator foi monitorado mediante análises físico-químicas semanais de: pH [22], alcalinidade [23], ácido graxos voláteis (AGV) [24], demanda química de oxigênio (DQO) [22].

A quantificação de culturas anaeróbias geradoras de H₂ foi realizada com o inóculo *in natura* (sem pré-tratamento) e no inóculo pré-tratado ao final da operação do ensaio 1, com 266 dias de operação por técnica de plaqueamento *Pour Plate* [25]. O inóculo pré-tratado do ensaio 1 foi coletado nos 3 registros da parte inferior do reator (

Figura I.1) e misturado em partes iguais para a obtenção de amostra composta do reator.

2.5 Quantificação do Biogás

O método de deslocamento de água foi utilizado para as medidas da produção de biogás [26]. A leitura da produção foi automatizada com o deslocamento da água em tubos em “U” e registro em tempo real através de sensores ligado a um microprocessador Arduino, adaptado de [27].

O teor de hidrogênio no biogás foi determinado semanalmente por cromatografia em fase gasosa em um cromatógrafo Shimadzu GC-2014, equipado com um Coluna Carboxen 1010 PLOT (30 m de comprimento 0,53 mm diâmetro), equipado com detector de condutividade térmica (TCD), e argônio como gás de arraste. As temperaturas do injetor e do detector foram de 220°C e 230°C, respectivamente. O programa com rampa de temperaturas da coluna foi de 120°C (1 min), 40°C min⁻¹ até 200°C (3 min), 50°C min⁻¹ até 230°C (0,5 min).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Evolução do pH e Produção de H₂

As condições de operação do reator, como o controle de pH, são cruciais para o sucesso na produção biológica de H₂. Na fase de partida do reator o afluente apresentou média de pH de 6,34, não havendo inicialmente a necessidade da adição de bicarbonato de sódio (NaHCO₃) como alcalinizante. Durante os ensaios 1 e 2, o reator RAHLF apresentou dificuldade no controle de estabilidade do pH, resultando médias de coeficientes de variação de até 18%. Devido à natureza de seu fluxo pistonado, onde a faixa inicial não possui as mesmas características da região central e final, uma vez que o afluente vai sendo degradado ao longo do reator, fez com que a porção final tivesse uma maior quantidade de ácidos. A faixa de pH ideal para as bactérias acidogênicas é entre 5 e 6 [28]. Dessa forma, no Ensaio 1 foi adicionado 1 g L⁻¹ de NaHCO₃, o que resultou numa média de pH do afluente de 7,18 (±0,44).

A produção de H₂ foi observada a partir do 89º dia de operação na fase de partida do reator, com média diária de produção de 1,0 mol H₂ m³ d⁻¹ (± 2,1) e média de pH de 4,48 (± 0,73) (**Figura II.2**). A eficiência do pré-tratamento do inóculo foi comprovada pela

ausência de metano na composição do biogás, com gerações de somente H_2 e CO_2 .

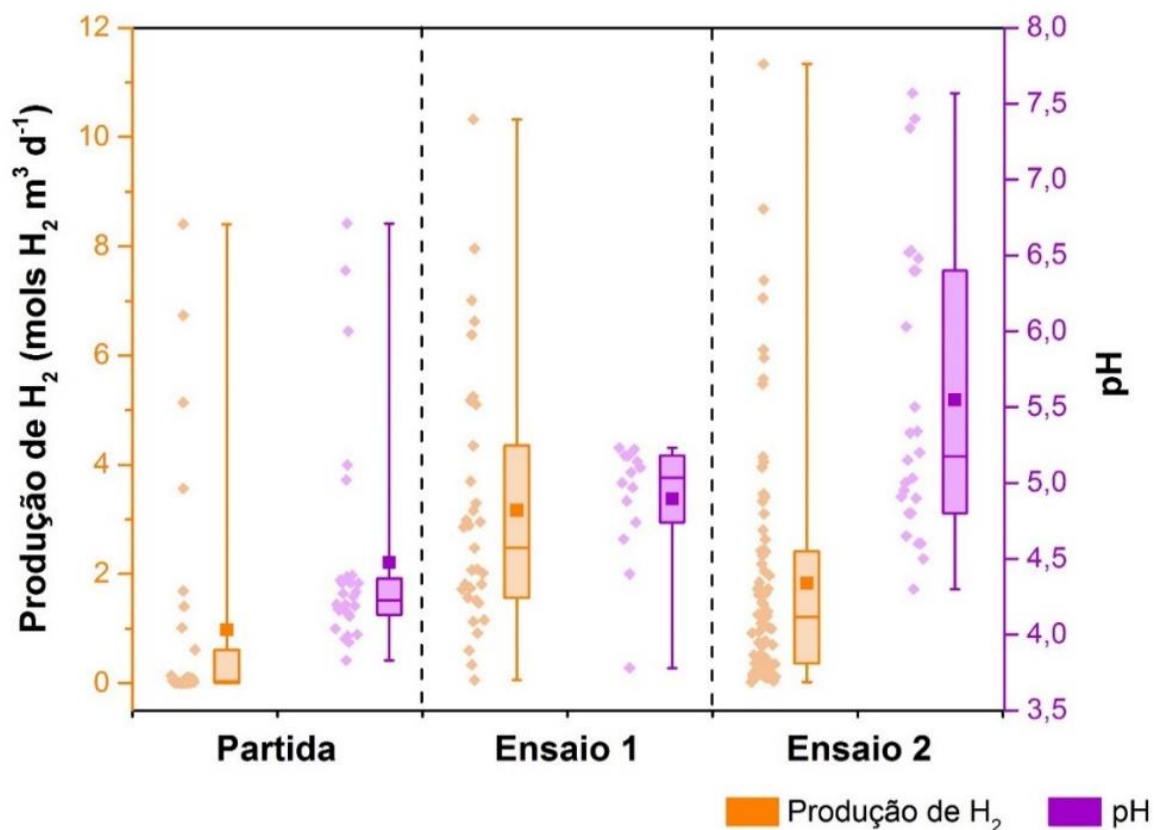
Com a alteração no TDH de 10h para 24h, na fase de partida, foram observadas conversões mais elevadas de glicerol livre em H_2 com produção diária de até $0,42 \text{ mol } H_2 \text{ mol}^{-1} \text{ glicerol}$. Tais eficiências foram superiores às verificadas por Vasconcelos et al. (2019) [29], em reator UASB com COV de $54,5 \text{ Kg DQO (m}^3 \text{ d)}^{-1}$ que foram de $0,096 \text{ mol } H_2 \text{ mol}^{-1} \text{ glicerol}$. Tais fatos indicaram que a microbiota pode apresentar dificuldades da conversão do glicerol para H_2 em altas cargas orgânicas. Os reatores RAHLF se mostraram eficientes na conversão para H_2 , se aproximando até das maiores conversões de trabalhos que utilizaram culturas puras como *Enterobacter aerogenes* e atingiram conversões de $0,69$ a $1,12 \text{ mol } H_2 \text{ mol}^{-1} \text{ glicerol}$ em reatores anaeróbios em batelada [30], [31].

No Ensaio 2, com o aumento do percentual de glicerol bruto no afluente para 1,5%, a quantidade de $NaHCO_3$ no afluente foi elevada para 3 g L^{-1} , conferindo uma média de pH de $7,47 (\pm 0,28)$. A média de pH do efluente foi de $5,87$, porém com um desvio padrão de $1,08$. Essas variações do pH podem ter interferido diretamente no rendimento da produção de H_2 durante o Ensaio 2. Em 24h de operação, utilizando apenas 1,5% de glicerol, sem outra fonte principal de matéria orgânica, foi verificada produção volumétrica diária de $1 \text{ L de } H_2 \text{ L}^{-1}$. Silva et al. [32] obtiveram produção de H_2 , mais elevada em reatores operados em batelada que no presente estudo de $291 \text{ L de } H_2 \text{ L}^{-1}$ em 36h de operação. Entretanto os autores adicionaram porcentagens mais elevadas de glicerol (3%) (v/v) e os mesmos foram co-digeridos com resíduos de alimentos que possuem maior variabilidade nutricional do que o esgoto sanitário que foi usado no presente estudo. Ou seja; para melhoria da conversão do glicerol bruto em H_2 , outros resíduos orgânicos adicionados ao afluente poderiam ser aplicados, como solução para a utilização de maiores percentuais de glicerol nas próximas fases de operação.

Os picos máximos de produção de hidrogênio registrados foram excelentes resultados, corroborando a potencialidade inexplorada de produção de H_2 em RAHLF com alimentação contínua. O ponto de maior geração ocorreu no ensaio 2, no qual foram verificadas gerações de $11,34 \text{ mols de } H_2 \text{ por m}^3 \text{ de reator d}^{-1}$. Durante a partida e Ensaio 1 as gerações mais elevadas de produção foram $8,41$ e $10,32 \text{ mols } H_2 \text{ m}^3 \text{ d}^{-1}$, respectivamente (**Figura II.2**).

A média de produção foi de 1,8 mol de H_2 por $m^3 d^{-1}$ ($\pm 2,2$) no ensaio 2. Além disso, a média de pH neste ensaio foi de 5,87 ($\pm 1,08$) com um coeficiente de variação de 18%. A instabilidade no pH pode ter contribuído para a diminuição na produção de hidrogênio, onde por vários períodos o efluente do reator não se manteve na faixa ótima para a microbiota do reator. Diversos trabalhos buscam a resposta para qual seria a faixa de pH mais adequada para se atingir maiores produções de H_2 , porém além de fatores como constituição do substrato que compõe seu afluente, é muito importante estudar quais são os microrganismos que compõem o lodo do reator. MIRZOIAN *et al.* [33] comprovou isto ao comparar uma espécie de *Escherichia coli* selvagem (BW25113) e uma mutante (JW0955), na co-digestão anaeróbia de glicerol ($10 g L^{-1}$) com lactose ($1 g L^{-1}$); a espécie selvagem atingiu sua maior produção de $20 mmols H_2 L^{-1}$ em faixa de pH 7,5-8 e, com a espécie mutante foram verificadas produções de $9 mmols H_2 L^{-1}$, em pH 6,5. Isso comprova a necessidade de se adequar a faixa de pH ideal para cada tipo de inóculo e fonte de matéria orgânica.

Figura II.2 - Produção de Hidrogênio e variação no pH do efluente do reator RHALF nas fases de: Partida, Ensaio 1 e Ensaio 2.

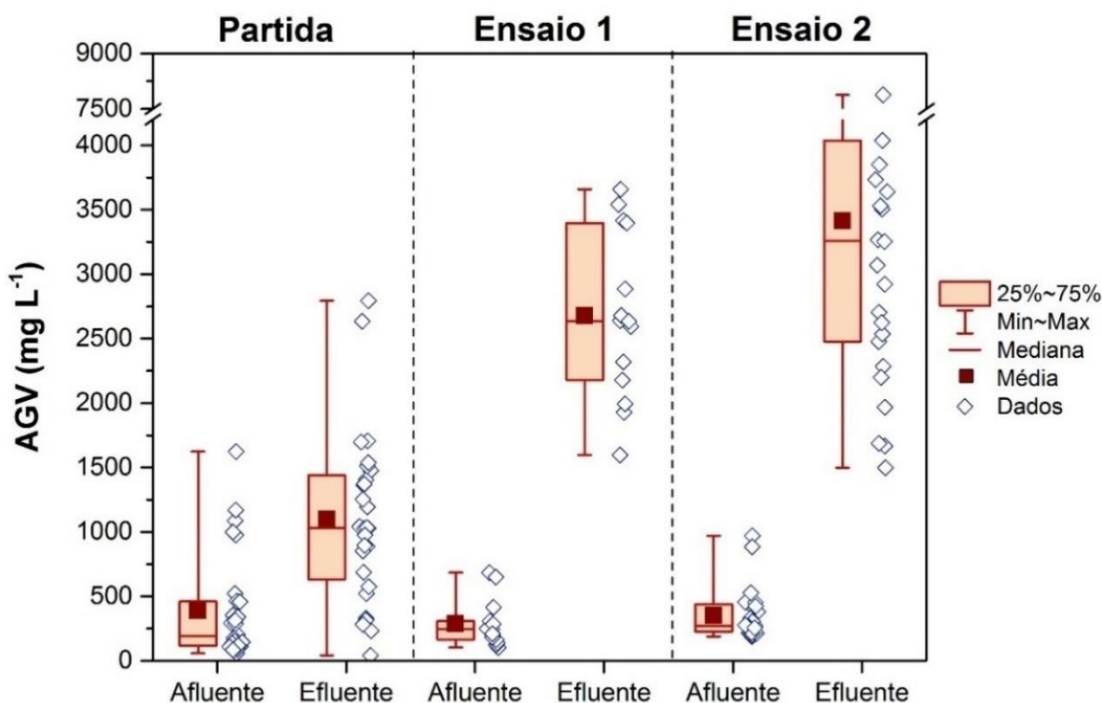


3.2 Produção de Ácidos Graxos Voláteis (AGV)

Os AGV são gerados na digestão anaeróbia, durante a etapa de acidogênese, acetogênese sintrófica e homoacetogênese [34]. As médias de AGV totais na partida, Ensaio 1 e Ensaio 2 foram, respectivamente, de 386 (± 405), 289 (± 181) e 353 (± 195) mg L^{-1} . Tais resultados evidenciaram que não houve inibição nas gerações de AGV no reator (**Figura II.3**). O acondicionamento do afluente a 4°C, durante os Ensaios 1 e 2, ajudaram evitar a sua acidificação prévia, o que conferiu valores mais estáveis de AGV, quando comparados à fase de partida onde o afluente foi mantido em temperatura ambiente.

Obteve-se a maior média de produção de AGV de 3,4 g L^{-1} ($\pm 1,4$), durante o ensaio 2. Concentrações de AGV elevadas no reator podem inibir a atividade microbiana e levar o sistema à falência. Na co-digestão de glicerol bruto com água residuária de suinocultura, He *et al.* [35] ao atingirem a proporção de 8% de glicerol (v/v), constataram a falência do reator devido ao acúmulo de AGV ($4,2 \text{ g L}^{-1}$). A suplementação de alcalinidade com a adição de NaHCO_3 durante os ensaios 1 e 2 foram essenciais para evitar a inibição do processo fermentativo.

Figura II.3 - Produção de Ácidos Graxos Voláteis (AGV) no Afluente e Efluente do RAHLF



O pH é um fator crucial na produção de AGV. Determinadas faixas de pH podem

influenciar não só na quantidade de ácido total produzido, como também sua variabilidade [36]. Na fermentação da glicose em reatores operados em batelada, ATASOY *et al.* [36] estudando diferentes pH (5, 8 e 10), obteve uma melhor produção de AGV em pH 10, devido a capacidade de tamponamento que esta condição forneceu. Entretanto, os autores verificaram, para reatores operados continuamente em pH neutro (7,0) a melhor opção para favorecer microrganismos fermentativos na produção de AGV. Porém, para produção de H₂ e evitar a atividade das arqueias metanogênicas consumidoras de hidrogênio, pH mais ácidos (5,5) são mais eficazes para produção de H₂ [37].

Os ácidos e álcoois resultantes do metabolismo das bactérias fermentativas podem ser utilizados como substrato para a produção de H₂, graças a bactérias como *Rhodopseudomonas* spp. que possuem afinidade por AGV e o utilizam como substrato [38]. TAO *et al.* [39] isolaram e identificaram uma espécie de bactéria fotossintética (PNSB, ZX-5), capaz de proporcionar conversões de AGV até 71,5% de H₂. Os AGV possuem valor agregado, podendo não somente ser utilizados como fonte de carbono para produção de CH₄ em reatores metanogênicos, mas também serem explorados para maiores produções de H₂.

3.3 Análise microbiológica

O lodo *in natura* apresentou diversidade, com crescimento de colônias em todos os meios específicos utilizados (**Figura II.4**). Entretanto, na quantificação destes microrganismos foram observadas alterações no inóculo e após o ensaio 1.

No inóculo *in natura* foram verificadas contagens mais elevadas de colônias para *Bacteroides* sp. ($5,4 \times 10^4$ UFC mL⁻¹), seguido por *Veillonella* sp. ($2,0 \times 10^4$ UFC mL⁻¹); ambos reconhecidos como bactérias fermentativas, gram negativas, não formadoras de esporos, envolvidas principalmente na conversão de propionato [40] e de Hidrogênio [41]. Após 260 dias de operação do reator, ao final do Ensaio 1, houve aumento na contagem de indivíduos destes gêneros, com $8,00 \times 10^4$ UFC mL⁻¹ para *Bacteroides* sp. e $2,90 \times 10^4$ UFC mL⁻¹ para *Veillonella* sp. Na fermentação de sacarose, SONG *et al.* [25] observaram o mesmo comportamento do presente estudo para *Veillonella* sp. depois do 5º dia de fermentação, que elevou de $1,1 \times 10^5$ UFC mL⁻¹ para $8,0 \times 10^6$ UFC mL⁻¹. Semelhantemente

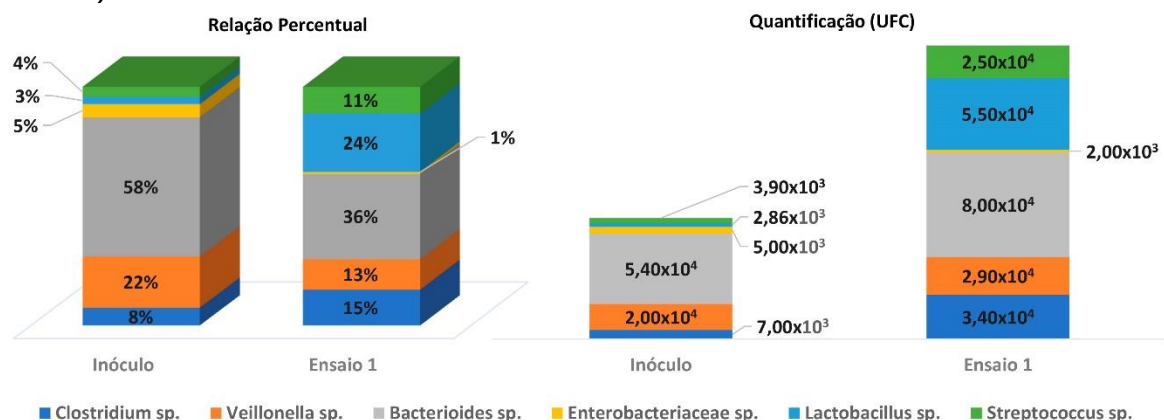
foi verificado em contagens elevadas do gênero *Bacteroides* sp. de $7,7 \times 10^5$ UFC mL⁻¹.

No inóculo *in natura* utilizado neste trabalho *Bacteroides* sp. e *Veillonella* sp. representaram, respectivamente 58% e 22% da população de bactérias quantificadas no inoculo. Entretanto, ao final do Ensaio 1 foi verificado 36% de *bacteroides* sp. e 13% de *Veillonella* sp. mostrando que o pré-tratamento ácido do inoculo aliado à condição operacional do reator, principalmente com adições de glicerol bruto, contribuíram para a alteração desses gêneros, além de propiciar condições adequadas para o estabelecimento de outros.

Foram verificados no inoculo *in natura* $7,0 \times 10^3$ UFC mL⁻¹ de *Clostridium* sp., apresentando aumento para $3,4 \times 10^4$ UFC mL⁻¹ no Ensaio 1. Os indivíduos desta ordem obtiveram aumento não apenas em número, mas também em relação a população microbiana, onde no inóculo representavam 8%, e ao final do Ensaio 1 já perfaziam 15%. O gênero *Clostridium* possui morfologias de bacilos Gram+ formadores de endósporos e reconhecidos como produtores de hidrogênio [42], são também geradores de outros metabólitos de valor agregado, como o 1,3-propanodiol [43], o que pode favorecer sua adaptação no reator alimentado com glicerol bruto [37].

Com exceção do gênero *Enterobacter* sp., os demais microrganismos apresentam crescimento ao final do Ensaio 1, como *Streptococcus* sp., e *Lactobacillus* sp., que são microrganismos anaeróbios, comumente observados durante a operação de reatores anaeróbios geradores de Hidrogênio [25]. É importante destacar a elevada quantidade de *Lactobacillus* sp. na população microbiana onde foram verificados 3% ($7,0 \times 10^3$ UFC mL⁻¹) 24% ($5,5 \times 10^4$ UFC mL⁻¹) no inoculo *in natura*. Bactérias lácticas do gênero *Lactobacillus*, são em sua maioria conhecidas como maléficas à produção de H₂. Entretanto, tais microrganismos suportam elevadas cargas orgânicas, como no presente estudo, além de serem produtores de biocinas, capazes de inibir outros microrganismos produtores de H₂ [44], [45]. O aumento desta população pode ter prejudicado o alcance de melhores índices de produção no Ensaio 2, com o aumento do percentual de glicerol e consequente elevação da carga orgânica no efluente para 1,5%, que pode ter favorecido outras rotas metabólicas contrárias a produção de H₂. As espécies *Lactobacillus brevis* [46], *Lactobacillus diolivorans* [47] e *Lactobacillus panis* [48] já são relatadas como produtoras de 1,3-propanodiol a partir de glicerol.

Figura II.4 - Quantificação de bactérias anaeróbias por técnica de *pour plate* em Unidades Formadoras de Colônias (UFC) no inóculo *in natura* (Inóculo) e pré-tratado (Ensaio 1)



CONCLUSÕES

A co-digestão com esgoto sanitário foi eficiente para diluição da elevada carga orgânica do glicerol bruto, e seus contaminantes, evitando a inibição da microbiota por falência dos reatores. O pré-tratamento no lodo inativou os microrganismos metanogênicos, com geração de apenas H_2 e CO_2 na composição do biogás. O reator RAHLF atingiu excelentes picos de produção de H_2 de até 11,34 mols de H_2 por m^3 de reator d^{-1} , mostrando a viabilidade de aplicação de reatores contínuos, porém para sua estabilidade, melhorias como o controle de pH e suplementação de alcalinizante precisa ser mais bem implementada. A quantificação de bactérias indicou que outras rotas metabólicas podem estar sendo favorecidas, na qual não há apenas produção de H_2 como também outros compostos como 1,3-propanodiol.

AGRADECIMENTOS

À Capes pelo suporte da bolsa de doutorado. À FAPESP (Proc 2017/16795-3) pelo suporte na manutenção das análises laboratoriais. Ao Laboratório didático do curso de Engenharia Química do IQ Unesp Araraquara pelo apoio na construção do reator.

BIBLIOGRAFIA

- [1] BiodieselBR, "Usinas de Biodiesel no Brasil," 2017. [Online]. Available: <http://www.biodieselbr.com/usinas/>. [Accessed: 20-May-2017].

- [2] S. I. Maintinguer, R. R. Hatanaka, and J. E. de Oliveira, "Glycerol as a Raw Material for Hydrogen Production," in *Biofuels - Status and Perspective*, no. November 2014, InTech, 2015, p. 580.
- [3] M. Rivero, R. Solera, and M. Perez, "Anaerobic mesophilic co-digestion of sewage sludge with glycerol: Enhanced biohydrogen production," *Int. J. Hydrogen Energy*, vol. 39, no. 6, pp. 2481–2488, 2014, doi: 10.1016/j.ijhydene.2013.12.006.
- [4] N. Pachauri and B. He, "Value-added Utilization of Crude Glycerol from Biodiesel Production : A Survey of Current Research Activities," *Am. Soc. Agric. Biol. Eng.*, vol. 0300, no. 06, pp. 1–16, 2006, doi: 10.1080/15422119.2013.851696.
- [5] FAO (Food and Agriculture Organization), "OECD-FAO Agricultural Outlook," Paris, 2015.
- [6] G. P. da Silva, M. Mack, and J. Contiero, "Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology," *Biotechnol. Adv.*, vol. 27, no. 1, pp. 30–39, 2009, doi: 10.1016/j.biotechadv.2008.07.006.
- [7] M. Hájek and F. Skopal, "Treatment of glycerol phase formed by biodiesel production," *Bioresour. Technol.*, vol. 101, no. 9, pp. 3242–3245, 2010, doi: 10.1016/j.biortech.2009.12.094.
- [8] N. Rahmat, A. Z. Abdullah, and A. R. Mohamed, "Recent progress on innovative and potential technologies for glycerol transformation into fuel additives: A critical review," *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 14, no. 3, pp. 987–1000, 2010, doi: 10.1016/j.rser.2009.11.010.
- [9] K. O. Santana, C. V. Rodrigues, M. G. Nespeca, J. E. de Oliveira, and S. I. Maintinguer, "Hydrogen bioproduction from crude glycerol and wastewater," *Ciência Tecnol. Fatec-JB*, vol. 8, pp. 1–14, 2016.
- [10] J. C. Costa, J. V Oliveira, and M. M. Alves, "Biochemical Methane Potential of Brewery Wastes and Co- Digestion With Glycerol," *2nd Int. Conf.*, no. Cd, pp. 221–226, 2013.
- [11] E. Athanasoulia, P. Melidis, and A. Aivasidis, "Co-digestion of sewage sludge and crude glycerol from biodiesel production," *Renew. Energy*, vol. 62, no. PA, pp. 73–78, Feb. 2014, doi: 10.1016/j.renene.2013.06.040.
- [12] M. S. Fountoulakis and T. Manios, "Enhanced methane and hydrogen production from municipal solid waste and agro-industrial by-products co-digested with crude glycerol," *Bioresour. Technol.*, vol. 100, no. 12, pp. 3043–3047, 2009, doi: 10.1016/j.biortech.2009.01.016.
- [13] S. Xie, P. G. Lawlor, J. P. Frost, Z. Hu, and X. Zhan, "Effect of pig manure to grass silage ratio on methane production in batch anaerobic co-digestion of concentrated pig manure and grass silage," *Bioresour. Technol.*, vol. 102, no. 10,

pp. 5728–5733, 2011, doi: 10.1016/j.biortech.2011.03.009.

- [14] W. Wu, “Anaerobic co-digestion of biomass for methane production: recent research achievements,” *Optimization*, pp. 1–10, 2007.
- [15] M. Pedroza, G. Vieira, J. Sousa, A. Pickler, E. Leal, and C. Milhomen, “Produção e tratamento de lodo de esgoto—uma revisão,” *Rev. Lib.*, vol. 11, no. 16, pp. 89–188, 2010.
- [16] Instituto Trata Brasil, “Saneamento no Brasil,” 2019. [Online]. Available: <http://www.tratabrasil.org.br/saneamento/principais-estatisticas/no-brasil/esgoto>. [Accessed: 20-Jan-2020].
- [17] M. Abreu, S. B., Zaiat, “Desempenho de reator anaeróbio-aeróbio de leito fixo no tratamento de esgoto sanitário,” *Eng. Sanit. Ambient.*, vol. 13, no. 2, 2008.
- [18] N. Zhai *et al.*, “Effect of initial pH on anaerobic co-digestion of kitchen waste and cow manure,” *Waste Manag.*, vol. 38, pp. 126–131, 2015, doi: 10.1016/j.wasman.2014.12.027.
- [19] S. Sittijunda and A. Reungsang, “Valorization of crude glycerol into hydrogen, 1,3-propanediol, and ethanol in an up-flow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor under thermophilic conditions,” *Renew. Energy*, vol. 161, pp. 361–372, 2020, doi: 10.1016/j.renene.2020.07.053.
- [20] R. C. da S. Mazareli, R. M. Duda, V. D. Leite, and R. A. de Oliveira, “Anaerobic co-digestion of vegetable waste and swine wastewater in high-rate horizontal reactors with fixed bed,” *Waste Manag.*, vol. 52, pp. 112–121, 2016, doi: 10.1016/j.wasman.2016.03.021.
- [21] D. M. Rossi, J. Berne Da Costa, E. Aquino De Souza, M. D. C. R. Peralba, D. Samios, and M. A. Záchia Ayub, “Comparison of different pretreatment methods for hydrogen production using environmental microbial consortia on residual glycerol from biodiesel,” *Int. J. Hydrogen Energy*, vol. 36, no. 8, pp. 4814–4819, 2011, doi: 10.1016/j.ijhydene.2011.01.005.
- [22] APHA, AWWA, and WEF, *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 21st ed. Washington DC, USA.: American Public Health Association, 2005.
- [23] S. R. Jenkins, J. M. Morgan, and C. L. Sawyer, “Measuring anaerobic sludge digestion and growth by a simple alkalimetric titration,” *J. Water Pollut.*, vol. 55, no. 5, pp. 448–453, 1983.
- [24] R. DiLallo and O. E. Albertson, “Volatile acids by direct titration,” *J. Water Pollut.*, vol. 33, no. 4, p. 356, 1961.
- [25] Z. X. Song, Y. Dai, Q. L. Fan, X. H. Li, Y. T. Fan, and H. W. Hou, “Effects of

- pretreatment method of natural bacteria source on microbial community and bio-hydrogen production by dark fermentation,” *Int. J. Hydrogen Energy*, vol. 37, no. 7, pp. 5631–5636, 2012, doi: 10.1016/j.ijhydene.2012.01.010.
- [26] X. Zuo *et al.*, “The relationships among sCOD, VFAs, microbial community, and biogas production during anaerobic digestion of rice straw pretreated with ammonia,” *Chinese J. Chem. Eng.*, no. xxxx, pp. 1–7, 2019, doi: 10.1016/j.cjche.2019.07.015.
- [27] J. G. Neto *et al.*, “Quantificação de biogás em reatores anaeróbios através do método de deslocamento de volume de água,” *Rev. Estud. Ambient.*, vol. 16, no. 1, pp. 45–53, 2014.
- [28] K. Seifert, M. Waligorska, M. Wojtowski, and M. Laniecki, “Hydrogen generation from glycerol in batch fermentation process,” *Int. J. Hydrogen Energy*, vol. 34, no. 9, pp. 3671–3678, 2009, doi: 10.1016/j.ijhydene.2009.02.045.
- [29] E. A. F. Vasconcelos, S. T. Santaella, M. B. Viana, A. B. dos Santos, G. C. Pinheiro, and R. C. Leitão, “Composition and ecology of bacterial and archaeal communities in anaerobic reactor fed with residual glycerol,” *Anaerobe*, vol. 59, pp. 145–153, 2019, doi: 10.1016/j.anaerobe.2019.06.014.
- [30] P. A. Selembo, J. M. Perez, W. A. Lloyd, and B. E. Logan, “Enhanced hydrogen and 1,3-propanediol production from glycerol by fermentation using mixed cultures,” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 104, no. 6, pp. 1098–1106, 2009, doi: 10.1002/bit.22487.
- [31] T. A. Ngo, M. S. Kim, and S. J. Sim, “High-yield biohydrogen production from biodiesel manufacturing waste by *Thermotoga neapolitana*,” *Int. J. Hydrogen Energy*, vol. 36, no. 10, pp. 5836–5842, 2011, doi: 10.1016/j.ijhydene.2010.11.057.
- [32] F. M. S. Silva, L. B. Oliveira, C. F. Mahler, and J. P. Bassin, “Hydrogen production through anaerobic co-digestion of food waste and crude glycerol at mesophilic conditions,” *Int. J. Hydrogen Energy*, vol. 42, no. 36, pp. 22720–22729, 2017, doi: 10.1016/j.ijhydene.2017.07.159.
- [33] S. Mirzoyan, A. Trchounian, and K. Trchounian, “Hydrogen production by *Escherichia coli* during anaerobic utilization of mixture of lactose and glycerol: Enhanced rate and yield, prolonged production,” *Int. J. Hydrogen Energy*, vol. 44, no. 18, pp. 9272–9281, 2019, doi: 10.1016/j.ijhydene.2019.02.114.
- [34] T. Amani, M. Nosrati, and T. R. Sreekrishnan, “Anaerobic digestion from the viewpoint of microbiological, chemical, and operational aspects - A review,” *Environ. Rev.*, vol. 18, no. 1, pp. 255–278, 2010, doi: 10.1139/A10-011.
- [35] J. Fierro, E. J. Martinez, J. G. Rosas, R. A. Fernández, R. López, and X. Gomez, “Co-Digestion of Swine Manure and Crude Glycerine: Increasing Glycerine Ratio Results in Preferential Degradation of Labile Compounds,” *Water. Air. Soil Pollut.*,

vol. 227, no. 3, 2016, doi: 10.1007/s11270-016-2773-7.

- [36] M. Atasoy, O. Eyice, A. Schnürer, and Z. Cetecioglu, "Volatile fatty acids production via mixed culture fermentation: Revealing the link between pH, inoculum type and bacterial composition," *Bioresour. Technol.*, vol. 292, no. July, p. 121889, 2019, doi: 10.1016/j.biortech.2019.121889.
- [37] C. V. Rodrigues, M. G. Nespeca, I. K. Sakamoto, J. E. de Oliveira, M. B. Amâncio Varesche, and S. I. Maintinguer, "Bioconversion of crude glycerol from waste cooking oils into hydrogen by sub-tropical mixed and pure cultures," *Int. J. Hydrogen Energy*, pp. 144–154, 2019, doi: 10.1016/j.ijhydene.2018.02.174.
- [38] G. Strazzera, F. Battista, N. H. Garcia, N. Frison, and D. Bolzonella, "Volatile fatty acids production from food wastes for biorefinery platforms: A review," *J. Environ. Manage.*, vol. 226, no. August, pp. 278–288, 2018, doi: 10.1016/j.jenvman.2018.08.039.
- [39] Y. Tao *et al.*, "Characteristics of a new photosynthetic bacterial strain for hydrogen production and its application in wastewater treatment," *Int. J. Hydrogen Energy*, vol. 33, no. 3, pp. 963–973, 2008, doi: 10.1016/j.ijhydene.2007.11.021.
- [40] M. H. Gerardi, *The Microbiology of Anaerobic Digesters*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2003.
- [41] R. Pachiega, I. K. Sakamoto, M. B. Varesche, R. R. Hatanaka, J. E. de Oliveira, and S. I. Maintinguer, "Obtaining and Characterization of Mesophilic Bacterial Consortia from Tropical Sludges Applied on Biohydrogen Production," *Waste and Biomass Valorization*, 2018, doi: 10.1007/s12649-017-0185-6.
- [42] I. R. Citelli, L. O. Pires, S. I. Maintinguer, and N. M. Ruocco, "Avaliação da geração de metano por biomassa anaeróbia utilizando glicerol bruto como substrato Resultados e Discussão Material e Métodos," p. 2011, 2011.
- [43] R. Jitrwung, J. Verrett, and V. Yargeau, "Optimization of selected salts concentration for improved biohydrogen production from biodiesel-based glycerol using *Enterobacter aerogenes*," *Renew. Energy*, vol. 50, no. 3, pp. 222–226, 2013, doi: 10.1016/j.renene.2012.06.049.
- [44] B. C. Gomes, P. R. F. Rosa, C. Etchebehere, E. L. Silva, and M. B. Amâncio Varesche, "Role of homo-and heterofermentative lactic acid bacteria on hydrogen-producing reactors operated with cheese whey wastewater," *Int. J. Hydrogen Energy*, vol. 40, no. 28, pp. 8650–8660, 2015, doi: 10.1016/j.ijhydene.2015.05.035.
- [45] P. R. F. Rosa, B. C. Gomes, M. B. A. Varesche, and E. L. Silva, "Characterization and antimicrobial activity of lactic acid bacteria from fermentative bioreactors during hydrogen production using cassava processing wastewater," *Chem. Eng. J.*, vol. 284, pp. 1–9, 2016, doi: 10.1016/j.cej.2015.08.088.

- [46] N. Vivek, A. Pandey, and P. Binod, "Biological valorization of pure and crude glycerol into 1,3-propanediol using a novel isolate *Lactobacillus brevis* N1E9.3.3," *Bioresour. Technol.*, vol. 213, pp. 222–230, 2016, doi: 10.1016/j.biortech.2016.02.020.
- [47] S. Pflügl, H. Marx, D. Mattanovich, and M. Sauer, "Heading for an economic industrial upgrading of crude glycerol from biodiesel production to 1,3-propanediol by *Lactobacillus diolivorans*," *Bioresour. Technol.*, vol. 152, pp. 499–504, 2014, doi: 10.1016/j.biortech.2013.11.041.
- [48] D. A. S. Grahame, T. S. Kang, N. H. Khan, and T. Tanaka, "Alkaline conditions stimulate the production of 1,3-propanediol in *Lactobacillus panis* PM1 through shifting metabolic pathways," *World J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 29, no. 7, pp. 1207–1215, 2013, doi: 10.1007/s11274-013-1283-7.

CAPÍTULO III

Este capítulo apresenta a versão modificada do artigo publicado na revista *Bioenergy Research* ISSN 1939-1234, contendo dados referente a partida dos reatores R1, R2 e R3 e ensaio 1.

ADAMES, L. V.; JACOBUS, A. P.; SAKAMOTO, I. K.; LAZARO, C. Z.; PIRES, L. O.; MAINTINGUER, S. I. Bioenergy Recovery from Anaerobic Co-Digestion of Crude Glycerol and Domestic Sewage In-Series Reactor: Microbial Characterization and System Performance. **Bioenergy Research**, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12155-022-10417-1>.

Bioenergy recovery from anaerobic co-digestion of crude glycerol and domestic sewage in-series reactor: microbial characterization and system performance

Luan Vieira Adames¹; Ana Paula Jacobus²; Isabel Sakamoto³; Carolina Zampol Lazaro⁴; Lorena Oliveira Pires¹; Sandra Imaculada Maintinguer^{1,2,5}.

¹UNESP, São Paulo State University, Institute of Chemistry, postgraduate program in biotechnology. Araraquara, SP, 14800-060, Brazil. luan.adames@unesp.br

²UNESP, São Paulo State University, IPBEN – Bioenergy Research Institute. Rio Claro, SP, 13500-230, Brazil.

³USP, University of São Paulo, Department of Hydraulics and Sanitation, São Carlos School of Engineering, São Carlos, SP, 13563-120, Brazil.

⁴Université de Montréal, Department of Microbiology and Immunology, Montréal, QC, H3C 3J7, Canada.

⁵UNIARA, University of Araraquara, Araraquara, SP, 14801-320, Brazil.

ABSTRACT

Experiments in series horizontal anaerobic reactors with fixed bed (HARFB) were conducted to evaluate the co-digestion of crude glycerol (CG) from biodiesel production and domestic sewage (DS) concerning the start-up strategy and best organic loading rate (OLR) to improve biogas production as well as to analyze the dynamic changes in the anaerobic microbial consortium during their operation. This approach can be used to increase the buffering capacity of anaerobic reactors as well as dilute toxic compounds. The reactor configuration applied at the present research is a novelty about CG and DS co-digestion and biogas production. The highest hydrogen generation was 10.3 moles H₂ (m³ d⁻¹) in reactor R1, and the highest methane yield was 312.0 and 283.9 L CH₄ (m³ d⁻¹) in R2 and R3, respectively. These values, obtained with mixed culture, agree with previous co-digestion research. The three-stage system showed high efficiency in removing crude

glycerol and Chemical Oxygen Demand (COD), with consumptions of 99.9%, both. The strategy of co-digestion is positive to avoid substrate inhibition. In addition, there was a change in the relative abundance of microorganisms amongst R1, R2, and R3 and a considerable decrease in the diversity index in the fermentation reactor (R1). The results have shown the potential of applying HARFB reactors for energy recovery and alternative waste disposal.

Keywords: Biodiesel, domestic sewage, bioenergy, co-digestion, PCR-DGGE.

1 INTRODUCTION

Biodiesel production has grown worldwide thanks to incentive policies for expanding renewable energy production; this has been triggered by the economic and environmental aspects of the current fossil fuels energy-based system [1]. Brazil's biodiesel production has doubled in the last decade, reaching 5.9 million m³ in 2019 [2]. Nevertheless, biodiesel has been considered an exciting biofuel; through triglycerides transesterification, each ton of its production generates around 100 kg of crude glycerol, its main by-product. Crude glycerol contains impurities, such as alcohols, fatty acids, esters, alkalis in the form of soaps, alkali hydroxides, and heavy metals. Pure glycerol is widely used in the pharmaceutical, food, and cosmetic industry; however, its purification is costly. Therefore, the valorization of crude glycerol into value-added products has been the focus of research [1].

Rivero et al. [3] observed the OLR effect on H₂ and CH₄ generation from co-digestion of crude glycerol and sewage sludge in a semi-continuous stirred-tank reactor. Tangkathitipong et al. [4] evaluated the performance of a two-stage anaerobic sequencing batch reactor at different organic loads for hydrogen and methane production from biodiesel wastewater supplemented with glycerin, nitrogen, and phosphorus. Hydrogen production from crude glycerol in anaerobic batch reactors using mixed pretreated and pure cultures was studied by Rodrigues et al. [5], while Sawasdee et al. [6] evaluated CH₄ production from co-digestion of crude glycerol and glucose. Glycerol's high calorific capacity, long-term stability, and biodegradability make it a good candidate for its usage as a substrate for Anaerobic Digestion (AD) [7], although it is a nutrient-limited waste.

In contrast, domestic sewage (DS) contains macronutrients, such as nitrogen and phosphorus, making it a possible nutrient source for microorganisms [8]. The anaerobic sewage treatment has been applied worldwide; Brazil has the most significant number of anaerobic reactors treating sewage in the world, accounting for 1667 anaerobic-based sewage treatment plants (STP) [9]. However, most of these STP has no system to recover the CH_4 produced. Silva et al. [10] related that, in theoretical calculations, these STPs have a biogas energy potential varying from 3 GJ d^{-1} to 380 GJ d^{-1} . Considering a conversion yield of 30% by the power generator, it could produce 677 MWh d^{-1} of electricity using only biogas generated by sewage treatment, which is enough to supply the energy demand of a city with around 111.000 inhabitants, approximately [10].

Considering the large volumes of DS produced constantly, and its availability close to consumer centers, its use for co-digestion would avoid the organic shock during the mono digestion process [11]. Therefore, feeding bioreactors with a blend of crude glycerol and domestic sewage is an exciting approach to recover energy as biogas. Furthermore, DS can simultaneously dilute toxic compounds present in crude glycerol and provide macronutrients to microbial communities.

The AD is a complex process involving the synergism of several microbial species, including Bacteria and Archaea Domains, which interact sequentially and simultaneously to convert the complex organic matter into simpler compounds, i.e., volatile organic acids, alcohols, hydrogen, and methane. This complex process starts with hydrolysis and acidogenesis, culminating with the generation of organic acids and H_2 . The acid-rich liquid effluent from AD's initial steps is a potential methanogen substrate. Although fermentative hydrogen-producing bacteria and methanogenic Archaea could co-exist, allowing acidogenesis and methanogenesis in different reactors could improve the overall system's performance [12].

Studies of in-series reactors allowing the spatial establishment of different microbial communities in separate reactors, but that operated sequentially as the effluent of a first step is used as substrate in the second or third stages seems a fascinating strategy. Horizontal anaerobic reactors with fixed-bed (HARFB) have shown promising results in diverse wastewaters treatments. This reactor's configuration prevents shock loads,

promotes horizontal microbial selection, and increases the cell's density as it adheres to the support material [13].

Active microorganisms can act as indicators capable of reflecting subtle changes in the operation of biological reactors. Although AD has been considered a well-established technology, the microbial diversity and the interspecies relations seem to vary widely depending on the type of residue/inoculum source, operational conditions, and reactor configurations [14]. Therefore, molecular genetic techniques such as denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and DNA-sequencing are valuable tools for rapidly detecting changes in the microbial community [14, 15] and identifying microbial species in bioreactors, providing a better understanding, controlling, and consequently improving bioreactor's outputs.

To our knowledge, there is no study reported in the literature evaluating the co-digestion of crude glycerol and domestic sewage in three-stage horizontal anaerobic fixed-bed reactors for the simultaneous production of hydrogen and methane. That said, the aim of the present study was to evaluate: (1) the consumption of crude glycerol, (2) the production of hydrogen and methane, and (3) the microbial diversity throughout the operational period in three-stage horizontal anaerobic fixed-bed reactors (HARFB).

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Inoculum and Inoculation Strategies

An up-flow anaerobic sludge blanket (UASB) granular methanogenic sludge treating slaughterhouse wastewater, with and without pretreatment, was used as inoculum. First, fermentative Reactor (R1) was inoculated with pretreated acid inoculum (pH 3.0 for 24h at 37°C) as per Rossi et al. [16]. After that, the sludge's pH was adjusted to 5.5, and it was inserted in R1 along with the support material. Then, for the Methanogenic Reactors (R2 and R3), the sludge without pretreatment, named inoculum *in natura*, was mixed with the support material and used to fill the reactors.

2.2 Substrates

Crude glycerol (CG) from biodiesel production was provided by Biobrotas company located in Brotas, SP/Brazil. Dark polyethylene gallons were used to store the feedstock.

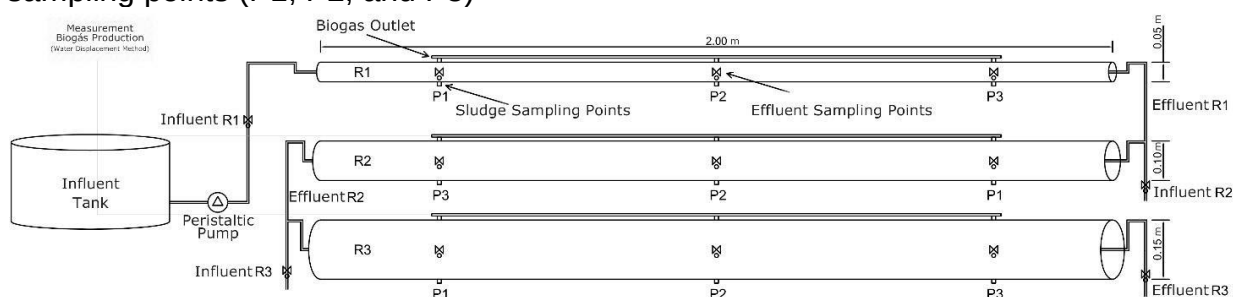
The gallons were kept at room temperature until their usage. The company provided the glycerol physico-chemical characteristics, and they were as follows: COD 1.92 kg L^{-1} , 80.6% glycerol content, pH 4.35, 5.3% of chlorines, 11.4% humidity, 5.1% ashes, and 2.84% non-glycerol organic matter.

BRK Ambiental Company, located in Rio Claro (SP- Brazil), provided the Domestic Sewage (DS), collected weekly and stored in dark polyethylene gallons, was kept at room temperature. The collect point was after the preliminary treatment phase (coarse solid removal). Its average composition was as follows: $350 \text{ mg COD L}^{-1}$ (± 188), 150 mg TS L^{-1} (± 73), pH $7.0 (\pm 0.3)$.

2.3 Experimental set-up and operating conditions

Three horizontal reactors were operated sequentially in this study. They were made of 2 meters long PVC tubes with entry and exit ports (Influent and Effluent) (**S. Figure III.1**). The reactor's diameters were 5cm, 10cm, and 15cm for R1, R2, and R3, respectively, to favor shorter fermentation times and longer methanogenesis. The aim of the first reactor (R1) was the fermentation of organic matter into organic acids and hydrogen, being the biogas collected and the liquid by-products used as the carbon source for the two subsequential bioreactors (R2 and R3). The effluent of R1 was used as the substrate for R2 without any pretreatment as the system was operated sequentially. The third reactor was provided to consume the volatile fatty acids produced in the first two reactors. The main aim was to remove the remaining organic matter transforming it into CH_4 and CO_2 .

S. Figure III.1 - Schematic representation of three horizontal anaerobic reactors with fixed-bed (HARFB) in-series (R1, R2, and R3), Influent, Effluent, Biogas outlets, Sludge sampling points (P1, P2, and P3)



The support material used to allow microorganisms aggregation, increasing biomass concentration inside bioreactors, was a corrugated conduit (2 cm diameter x 2 cm long). The reactors were kept at room temperature without temperature control systems for 250 days. After this period, an external temperature controlling system, consisting of silicone tubes filled with water kept at 37°C and involving the bioreactors, was installed.

This study was performed in 2 different phases: Start-up and Phase 1. During the Start-up Phase, the system was fed with DS (6.33 mL min⁻¹ and 350 mg COD L⁻¹) for 20 days. After this period, the influent consisted of a blend of DS and CG (1%, v/v), increasing the influent COD concentration to an average of 10.6 (±4.2) g L⁻¹ for 200 days. In this phase, the influent was fed at 2.64 mL min⁻¹, increasing the HRT from 0.5 to 1 day in R1, 2.1 to 4.2 days in R2, and 4 to 8 days. **Table III.1** summarizes operational conditions (influent and effluent COD, OLR, and HRT) during Start-up and Phase 1. In addition, NaHCO₃ (1 g L⁻¹ per liter of the reactor) was added to the reactor's influent during Start-up and Phase 1. Throughout the experiment, the influent consisting of crude glycerol (CG) (1% v/v) and DS (99%v/v) was prepared and kept refrigerated at 4°C.

Table III.1 - Mean values (±SD, n = number of samples) of OLR, COD, pH of the influent and effluents and HRT of reactors R1, R2, and R3 during the start-up and Phase 1

Parameters	Influent		R1		R2		R3	
	Start-up	Phase 1	Start-up	Phase 1	Start-up	Phase 1	Start-up	Phase 1
OLR	-	-	25.4 ±10.2	13.1 ±1.3	6.2 ±2.5	3.1 ±0.3	3.2 ±1.3	1.6 ±0.2
COD	10.6 ±4.2	13.0 ±1.3	9.7 ±3.9	10.7 ±1.2	8.9 ±3.9	8.9 ±1.9	6.6 ±3.2	0.8 ±0.9
pH	6.3 ±0.9	7.2 ±0.4	4.5 ±0.7	4.9 ±0.4	6.4 ±1.1	7.3 ±0.6	6.7 ±1.2	8.4 ±0.1
HRT	-	-	0.50	1.00	2.10	4.20	4.02	8.04

OLR: Organic Loading Rate (kg COD (m³ d)⁻¹); COD: Chemical Demand of Oxygen (g L⁻¹); HRT: Hydraulic Retention Time (day).

2.4 Physico-chemical and Chromatographic Analysis

The influent and effluent of reactors R1, R2, and R3 were analyzed weekly for pH, alkalinity, Volatile Fatty Acids (VFA), and Chemical Oxygen Demand (COD) [13]. Total biogas volumetric production was measured by water displacement, and real-time biogas

production was recorded using an adapted Arduino microcontroller [17]. Biogas composition was performed by gas chromatography using a Shimadzu GC-2014, equipped with column 1010 PLOT (30 m x 0.53 mm), thermal conductivity detector (TCD), and using Argon as a gas carrier. Injector and detector temperature were set as 220°C and 230°C, respectively. Column temperature ramp was: 120°C (1 min), 40°C/min up to 200°C (3 min), 50°C/min up to 230°C (0.5 min) [18].

2.5 Microbial Diversity Analysis

Samples taken from R1, R2, and R3 were analyzed by Scanning Electron Microscope (SEM). The samples were fixed in hexamethyldisilazane following the methodology described by Nation [19].

2.5.1 DNA Sequencing

Samples from each reactor collected at Phase 1 start were named INOC. At the end of the same phase, after 260 days of operation, samples taken from the three sampling points (P1, P2, and P3) of each reactor (Supplementary Fig 1 of Online Resource 1) were homogenized, and this composite sample was used for analysis.

DNA extraction was carried out by the phenol-chloroform modified method [20]. Extracted DNA integrity was verified by a 260/280 ratio using an ND-2000 spectrophotometer (Nanodrop Inc., Wilmington, DE). DNA was dried out at room temperature for 24 hours and then stored at -20°C until its analysis at GenONE- (Rio de Janeiro-RJ, Brazil) using the NGS Illumina MiSeq platform.

2.5.2 Library Preparation for NGS

The 16S rRNA / 18S rRNA / ITS regions (16SV4 / 16SV3 / 16SV3-V4 / 16SV4-V5, 18S V4 / 18S V9, ITS1 / ITS2, Arco V4) were amplified using specific primers (16S V4: 515F-806R, 18S V4: 528F-706R, 18S V9: 1380F-1510R). PCR reactions were performed using Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix (New England Biolabs).

PCR products were mixed in equal proportional densities and purified using Qiagen Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany). Genomic libraries were generated with NEBNext® Ultra™ DNA Library Prep Kit and quantified using Qubit® qPCR for Illumina sequencing platform.

Paired-end reads were merged using FLASH Algorithm (V1.2.7, <http://ccb.jhu.edu/software/FLASH/>), and raw sequences were filtered using Qiime (V1.7.0, http://qiime.org/scripts/split_libraries_fastq.html) to obtain high-quality data for further analysis. The filtered sequences were then compared to the ones deposited in Genome OnLine Database – GOLD (http://drive5.com/uchime/uchime_download.html) using UCHIME Algorithm (http://www.drive5.com/usearch/manual/uchime_algo.html) and chimeric sequences and noise (<https://drive5.com/usearch/manual/chimeras.html>) were then removed. Then, sequences with a length at least equal to or higher than 403 bp and a quality score Q30 equal to or higher than 92% (sequence error rate is less than 0.1%).

Sequences were deposited in NCBI genetic sequence database, Project name PRJNA531496, Bioproject PRJNA531496, Inoculum: Biosample SAMN15438363 (SRA: SRR12192782); R1: Biosample SAMN15438259 (SRA: SRR12192195); R2: Biosample SAMN15438265 (SRA: SRR12192464); R3: Biosample SAMN15438362 (SRA: SRR12192644).

2.5.3 PCR-DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) analysis

Biomass samples taken from 3 sampling points (P1, P2, and P3) from reactors 1, 2, and 3 (**S. Figure III.1**) at the end of Phase 1 (260° day) were analyzed individually by DGGE. **Table III.2** describes the nomenclature used for each reactor, sampling point, and microbial Domain analyzed to facilitate result's presentation and discussion.

Table III.2 - Sampling nomenclature according to the reactor sampling point and microbial Domain in the HARFB

Domain		Bacteria			Archaea		
Reactor		R1	R2	R3	R1	R2	R3
Sampling point	Initial	R1P1b	R2P1b	R3P1b	R1P1a	R2P1a	R3P1a
	Central	R1P2b	R2P2b	R3P2b	R1P2a	R2P2a	R3P2a
	Final	R1P3b	R2P3b	R3P3b	R1P3a	R2P3a	R3P3a
Inoculum		INOCb			INOCa		

The 16S rDNA sequences were amplified by PCR using the primer 968FGC - 1401R for Bacteria Domain and primer 1100FGC – 1400R for Archaea Domain [15]. The PCR cycle was as follows: initial denaturation 95°C for 7 min, denaturation phase 94°C for 0.45 min, annealing at 56°C for 0.45 min, extension at 72°C for 1.0 min, final extension at 72°C for 10 min and 4°C for 35 cycles for Bacteria domain and Archaea: initial denaturation 94°C for 5 min, denaturation phase 94°C for 1 min, annealing at 55°C for 1 min, extension at 72°C for 1.0 min, final extension at 72°C for 7 min and 4°C for 35 cycles [14].

PCR-amplified fragments were separated by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) prepared and run using TAE 1X solution (Buffer Tris-Acetate - Tris 40mM, Acetic Acid 20mM, EDTA 1mM) at 75 V and 65°C for 16 h in polyacrylamide gel with denaturant gradient ranging from 45 to 65%. The gel was soaked in Fluorescent dye Diamond™ Nucleic Acid Dye (Promega) (1:10,000) for 20 min, and gel band patterns were observed using Eagle Eye TMIII (Stratagene) with UV at 254 nm, connected to a computer and analyzed using Eagle Sight software (L.PixTouch - Loccus Biotechnology).

Band-based Jaccard similarity coefficient was used for dendrogram construction using BioNumerics software (Applied Biomath, Belgic). The Shannon-Wiener diversity index was calculated based on gel band intensities. Pick height was analyzed according to densitometric curves and Eq. (1).

The Shannon-Wiener diversity indices were calculated based on the intensities of the bands in the gel. Peak heights were assessed on densitometric curves, according to Eq. (1).

$$H = -\sum(P_i \ln(P_i)) \quad (1)$$

where H is Shannon's diversity index, and P_i is the proportion of each species in the sample ($P_i = n_i / N$, where n_i is the height of an individual peak and N is the sum of all peak heights).

2.6 Statistical Analysis

Statistical analyses through ANOVA and Tukey's test were performed, considering the completely randomized design, with 2 treatments for reactors R1, R2, and R3 (start, Assays 1). The repetition number evaluated in the start-up were 28 for COD, OLR, pH,

Alkalinity, VFA, 19 for glycerol, 30 for H₂ production; 84 for CH₄ production; and in Phase 1 were 14 for COD, OLR, pH, Alkalinity, VFA, 12 for glycerol, 33 for H₂ production; 39 for CH₄ production. The analysis of variance (ANOVA, $p < 0.05$) was used to assess whether there are statistically significant differences per se among various parameters due to differences in treatments and expressed as mean values $\pm$ SD. Tukey's test ($p < 0.05$) and F -statistic as shown in **S. Table III.1**.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 First Stage – Fermentative Reactor (R1)

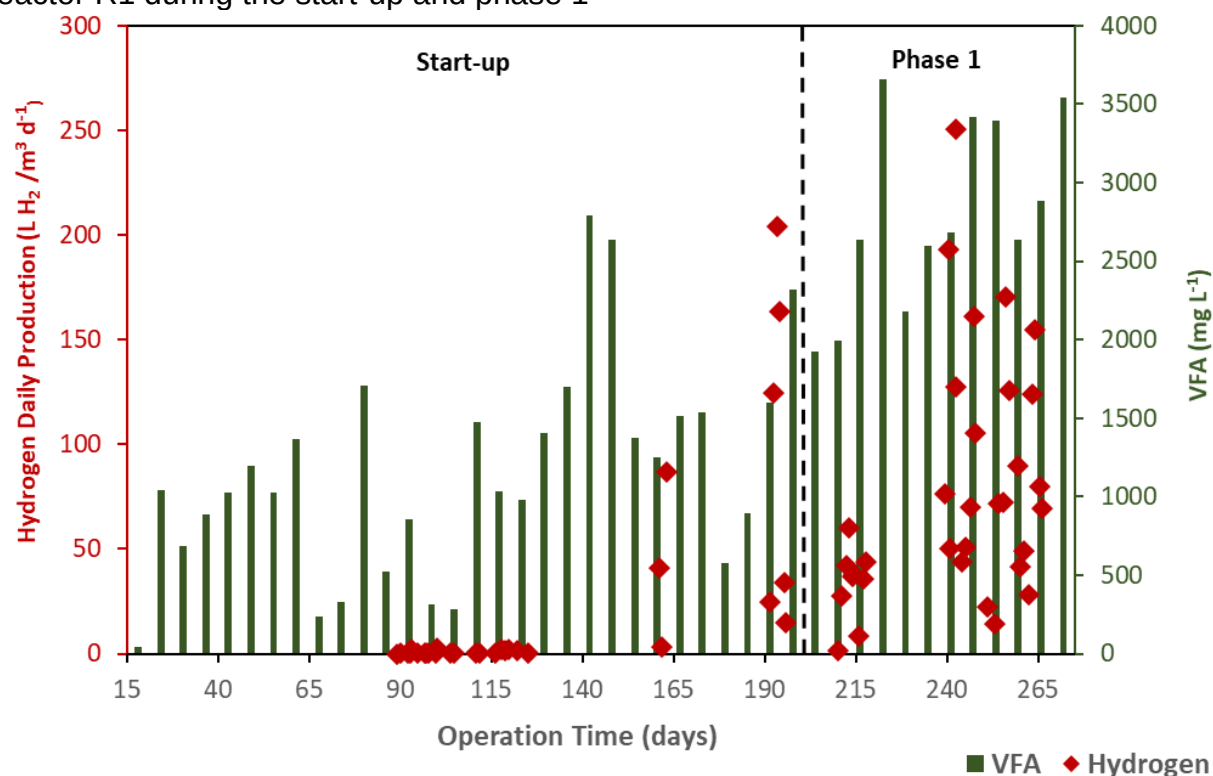
As expected, there was no methane generation in the R1, showing the sludge pretreatment effectiveness. This type of pretreatment has greater applicability in pilot-scale reactors and stands out compared to other methods. Rossi et al. [16] evaluated five different pretreatments and obtained better results using the acid pretreated mixed bacterial cultures, reaching 64.4 mL H₂ g⁻¹ of dry grass. Vasconcelos et al. [21] used non-pretreated inoculum for H₂ production, and the strategy used to avoid CH₄ generation was the increase of OLR to 54.5 kg COD (m³ d)⁻¹ at HRT 3.5 days.

Biogas production was observed after 89 days of the system's start-up, composed of 1% H₂ and 99% CO₂. Throughout the process, the percentage of hydrogen in the biogas increased progressively. After 160 days, it reached 60% H₂, and the maximum measured was 81% of H₂ (in 211th days of the experiment). Rivero et al. [3] evaluated the hydrogen production in semi-continuous CSTR fed with a mix of sewage sludge and crude glycerol and obtained the lower percentages (24-27% H₂) even after reducing the OLR (from 15 to 7.8 kg COD (m³ d)⁻¹). Higher hydrogen percentages in the biogas composition could be attributed to the system configuration - plug flow reactor model – which allowed the nucleation of the anaerobic microorganisms. During the start-up phase and acclimatization of the microorganisms, the OLR was reduced from 25.4 kg COD (m³ d)⁻¹ to 13 kg COD (m³ d)⁻¹, and it seems to have favored the hydrogen and organic acids production (**Figure III.1**) considerably.

In phase 1, there were statistically high hydrogen production yields, with daily values of 0.42 mol H₂ mol⁻¹ glycerol ($p < 0.01$). Vasconcelos et al. [21] evaluated the production of hydrogen in a UASB reactor and obtained less than 0.1 mol H₂ mol⁻¹ glycerol

by applying higher OLR $54.5 \text{ kg COD (m}^3 \text{ d)}^{-1}$. By comparing our results with those reported by Vasconcelos et al. [21], OLR plays an essential role in the process. Jiraprasertwong et al. [22] evaluated the biogas production using UASB reactors in series and observed a drop in the biogas production when applying OLRs higher than $20.0 \text{ kg COD (m}^3 \text{ d)}^{-1}$, and this is most likely due to the inhibitory concentration of organic acids.

Figure III.1 - Daily volumetric hydrogen and volatile fatty acids (VFA) Production in the reactor R1 during the start-up and phase 1



In terms of hydrogen yield, the values obtained in the present study (0.138 ± 0.103 phase 1) have not achieved the theoretical yield. It is most likely due to the use of carbon sources for cellular growth and the occurrence of different metabolic pathways. In the oxidative route, two moles of H_2 can be produced from the oxidation of 1 mol of glycerol which is first converted into pyruvate, then acetyl-in CoA and formiate, which is then cleaved into H_2 and CO_2 . Nevertheless, the oxidation of acetyl-CoA into ethanol, acetate, and butyrate will not culminate with H_2 generation. The same occurs when pyruvate is oxidized into lactic acid [23]. A common glycerol by-product is 1,3-propanediol (1,3PD); when glycerol is metabolized via this pathway, there is no H_2 production.

S. Table III.1 - Mean values and statistical data of the physical-chemical parameters and production of biogas were analyzed during the Start-up and Phase 1 in the influent, effluents, and reactors R1, R2, and R3

Parameters		Start-up		Phase 1		F-statistic	Prob {>F}
pH	Influent	6.34 ^b	± 0.89	7.18 ^a	± 0.44	10.88	0.002 ^{**}
	R1	4.48 ^a	± 0.73	4.89 ^a	± 0.40	3.98	0.053 ^{NS}
	R2	6.40 ^b	± 1.05	7.30 ^a	± 0.57	8.87	0.005 ^{**}
	R3	6.69 ^b	± 1.20	8.36 ^a	± 0.13	26.84	0.000 ^{**}
Alkalinity (mg CaCO ₃ L ⁻¹)	Influent	341 ^b	± 632	1557 ^a	± 786	29.34	0.000 ^{**}
	R1	85 ^b	± 259	575 ^a	± 285	31.34	0.000 ^{**}
	R2	2480 ^a	± 2049	2842 ^a	± 1062	0.38	0.539 ^{NS}
	R3	3054 ^b	± 2343	5181 ^a	± 1496	9.53	0.004 ^{**}
VFA (mg L ⁻¹)	Influent	386 ^a	± 405	289 ^a	± 181	0.72	0.400 ^{NS}
	R1	1096 ^b	± 650	2675 ^a	± 644	55.37	0.000 ^{**}
	R2	2388 ^b	± 1588	3885 ^a	± 867	10.75	0.002 ^{**}
	R3	2748 ^a	± 1454	636 ^b	± 379	28.25	0.000 ^{**}
COD (mg L ⁻¹)	Influent	10567 ^b	± 4244	13045 ^a	± 1301	4.51	0.040 [*]
	R1	9717 ^a	± 3898	10744 ^a	± 1220	0.92	0.344 ^{NS}
	R2	8852 ^a	± 3921	8933 ^a	± 1931	0.01	0.942 ^{NS}
	R3	6588 ^a	± 3191	798 ^b	± 861	43.98	0.000 ^{**}
COD Removal (%)	R1	12.55 ^a	± 18.53	17.31 ^a	± 9.09	0.82	0.372 ^{NS}
	R2	20.82 ^a	± 19.30	30.65 ^a	± 17.74	2.55	0.118 ^{NS}
	R3	35.89 ^b	± 25.07	93.61 ^a	± 7.33	70.38	0.000 ^{**}
Glycerol (mg L ⁻¹)	Influent	1157 ^b	± 831	2522 ^a	± 613	23.94	0.000 ^{**}
	R1	532 ^a	± 458	198 ^b	± 370	4.51	0.042 [*]
	R2	201 ^a	± 286	7 ^b	± 14	5.47	0.026 [*]
	R3	3 ^a	± 3	2 ^a	± 2	0.89	0.353 ^{NS}
Glycerol Removal (%)	R1	50.37 ^b	± 30.01	91.22 ^a	± 15.94	18.58	0.002 ^{**}
	R2	55.88 ^a	± 34.88	68.73 ^a	± 28.62	1.12	0.299 ^{NS}
	R3	87.35 ^a	± 27.12	57.21 ^b	± 38.65	6.33	0.018 [*]
OLR (kg COD (m ³ d) ⁻¹)	R1	25.40 ^a	± 10.20	13.05 ^b	± 1.30	20.13	0.000 ^{**}
	R2	5.68 ^a	± 2.48	6.28 ^a	± 0.31	1.73	0.1974 ^{NS}
	R3	2.64 ^a	± 1.27	2.67 ^b	± 0.16	0.19	0.6670 ^{NS}
H ₂ (%)	R1	16.26 ^b	± 23.73	80.02 ^a	± 5.05	227.23	0.000 ^{**}
CH ₄ (%)	R2	34.55 ^b	± 15.94	57.00 ^a	± 0.00	77.09	0.000 ^{**}
	R3	76.33 ^b	± 37.60	85.70 ^a	± 0.00	50.05	0.000 ^{**}
H ₂ Production (mmols H ₂ L ⁻¹ d ⁻¹)	R1	0.98 ^b	± 2.14	3.17 ^a	± 2.39	14.55	0.000 ^{**}
CH ₄ Production (L CH ₄ (m ³ d) ⁻¹)	R2	38.82 ^b	± 29.76	80.91 ^a	± 52.15	32.28	0.000 ^{**}
	R3	69.68 ^b	± 46.69	104.34 ^a	± 64.42	10.69	0.001 ^{**}

VFA: Volatile Fatty Acids. COD: Chemical Oxygen Demand. OLR: Organic Loading Rate.

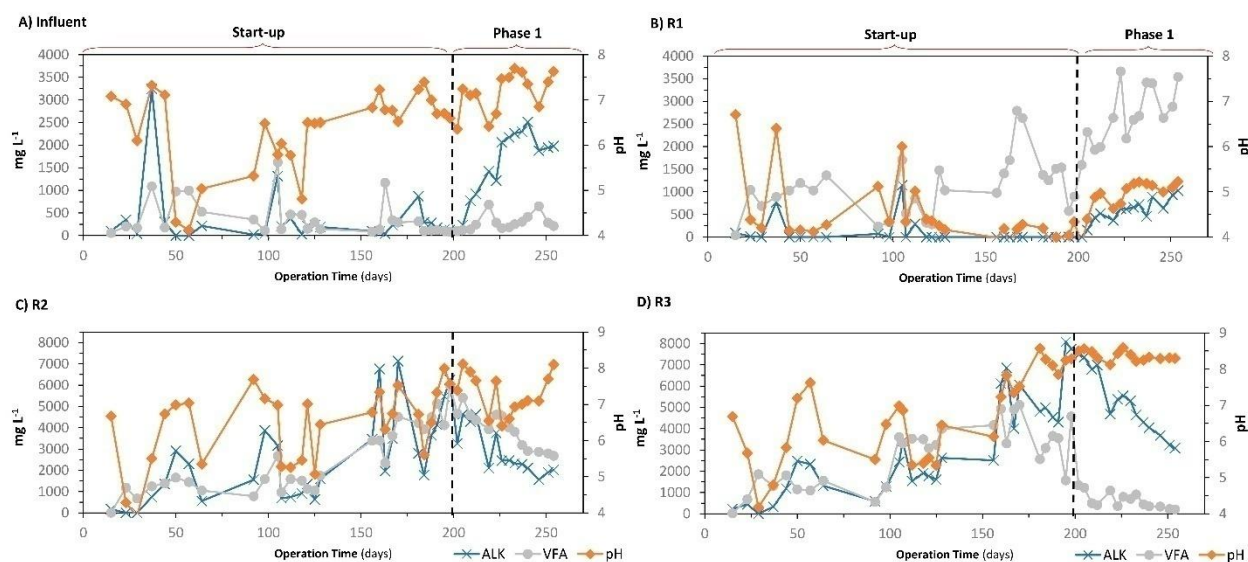
Significance level: ** 1%, * 5%, ^{NS} not significant. ± Standard Deviation. Different lowercase letters in the same row indicate a statistically significant difference between the mean values of Start-up and Phase 1, according to Tukey's test.

The hydrogen production yields verified were lower than the yields reported by Selembo et al. [24] and Ngo et al. [25] which were 0.69 a 1.12 mol H₂ mol⁻¹ glycerol, respectively, using pure cultures of *Enterobacter aerogenes* in anaerobic batch reactors; however, it seems to be laborious avoiding culture contamination when scaling up the process for waste treatment.

The analysis of variance revealed a significant increase ($p < 0.01$) in the volatile fatty acids production when the HRT was increased on Phase 1. The VFA was 2675 mg L⁻¹ (± 644). Jiraprasertwong et al. [27] applying OLR and HRT of 5 Kg COD (m³ d)⁻¹ and 10 days, respectively, observed 25000 mg L⁻¹ de VFA, and this value dropped to 10000 mg VFA L⁻¹ with OLR increasing (10 Kg COD (m³ d)⁻¹). In the present study, using a lower HRT (0.5 days), during the start-up phase, it was produced 1096 VFA mg L⁻¹ with a higher OLR (25.4 Kg COD (m³ d)⁻¹), attesting the potential of crude glycerol use as a substrate for microorganisms in a HARFB.

The domestic sewage, used with crude glycerol as a substrate for the present study, cannot supply the alkalinity to keep the reactor's pH stable/controlled. During the start-up phase, no external alkalinity source was added into the substrate mixture, and, for this reason, it was observed a pH fluctuation in the influent and effluent (**S. Figure III.2**). Based on these results, for phase 1, the substrate was supplemented with 1 g L⁻¹ NaHCO₃, and the pH remained stable (4.89 ± 0.40) for about 10 days. After this period, a drop in pH values was observed and increased VFA production. There were no statistical differences ($p > 0.05$) between the pH mean values along with the start-up (4.48 ± 0.73) and phase 1 (4.89 ± 0.40), although subtle differences in daily pH can affect microorganisms more sensitive to pH fluctuations; this was expected since the substrate was prepared using a blend of residues with variable characteristics. The conditions of each biodiesel plant could affect the crude glycerol characteristics, such as pH range. Veras et al. [26] used crude glycerol with pH 10.4 in a UASB reactor and did not observe any excessive acidification with final pH at around 6.0. In the present study, the crude glycerol had a pH of 4.5, and this value was, on average, 6.3 and 7.2 for the start-up and phase 1, respectively, after its mixture with domestic sewage.

S. Figure III.2 - Alkalinity (ALK – mg CaCO₃ L⁻¹), Volatile Fatty Acids (VFA – mg L⁻¹) and pH in the influent and effluent of the reactors R1, R2, and R3 during the start-up and phase 1



3.2 Second Stage: Methanogenesis Reactor (R2)

In the start-up phase (200 d), R2 was fed with 6.2 Kg COD (m³ d)⁻¹, and the production of methane and carbon dioxide during this time was 35% and 65%, respectively. Followed by the OLR decrease on Phase 1, an increase in methane generation was observed and, this value reached 312 L CH₄ (m³ d)⁻¹ and higher ($p < 0.01$) mean values than was observed at start-up (**Figure III.2**). The percentage of CH₄ reached its maximum value on the 200th day (57% and 43% CO₂).

The increase in the VFA production in the R1 reactor, which was used as an influent for R2 without any pretreatment, negatively affected the methane production in R2. The accumulation of VFA caused a pH drop, and for this reason, supplementation with 1 g NaHCO₃ (L d)⁻¹ was needed. As a result, hydrogen was not detected in the biogas produced in R2. It is possible that, if produced, H₂ was consumed by hydrogenotrophic methanogenic archaea. The total VFA in the influent of R2 was 1,096 mg L⁻¹ (± 650) and 2,675 mg L⁻¹ (± 644) during start-up and phase 1, respectively. The VFA production was statistically higher ($p < 0.01$) in Phase 1 (3,885 mg L⁻¹ ± 867) when compared to start-up (2,388 mg L⁻¹ ± 1588). These results confirmed that the acidogenesis, with organic acids generation, also occurred in R2. Such evidence was confirmed with the consumption of glycerol in R2 that reached 99.9%. Glycerol concentration in the influent and effluent in

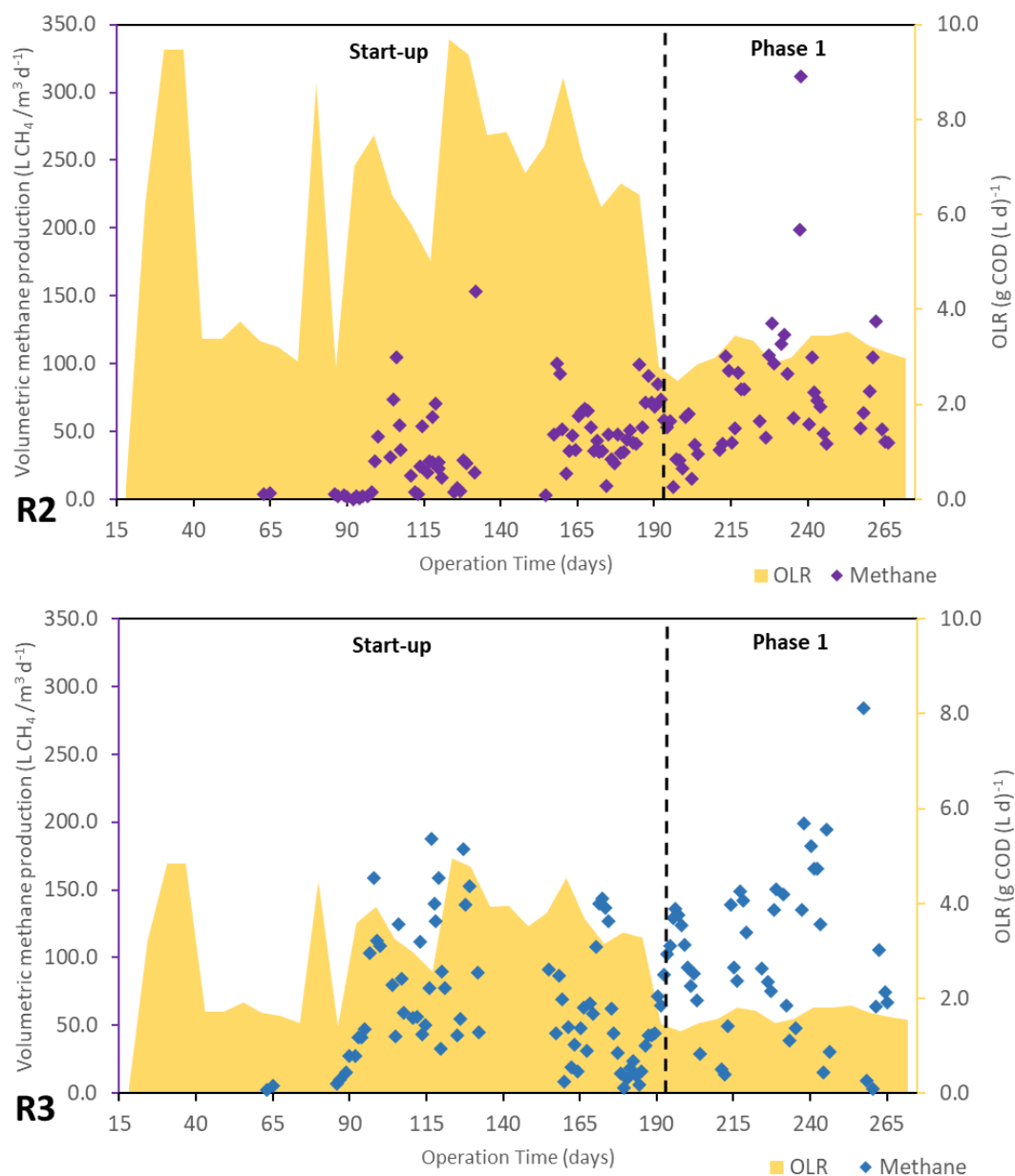
R2 was 291 mg L^{-1} (± 431) and 9 mg L^{-1} (± 17), respectively. In addition, only 30.7% of COD removal was verified in R2, confirming that the fermentation occurred, resulting in an effluent with COD of 8933 mg L^{-1} ; nevertheless, no positive correlation was detected between start-up and phase 1 ($p > 0.05$) Veroneze et al. [27] also observed COD low removal while evaluating the biodigestion of swine manure with the addition of crude glycerin doses for biogas production in alternative biodigesters without stirring.

High doses of glycerol can lead to the failure of a 2-stage system. Silva et al. [28] related instability in the methanogenesis process due to the metabolic products formed in the first stage with 3% glycerol. The addition of a third stage could allow overpassing this problem. At the 1% concentration of glycerol, reactor R2 was able to maintain the methanogenesis process, but to increase the amount of glycerol applied feasible approach would be to let the acetogenic microorganisms proliferate with a lower pH.

3.3 Third Stage: Methanogenesis (R3)

After the 86th day of the start-up, 78.7% of CH_4 was observed in the biogas composition. During the operation, CH_4 mean values increased from 76.3% (start-up) to 85.7% (phase 1) in R3 ($p < 0.01$). Rivero et al. [3], aiming to enhance hydrogen and methane production, used a two-stage semi-continuous CSTR with similar OLR values ($7.8 - 15.3 \text{ Kg COD (m}^3 \text{ d)}^{-1}$). However, the authors observed lower proportions of CH_4 in the biogas composition (50-62% of CH_4). Sawasdee et al. [6] aimed to enhance CH_4 production by using different glycerol/glucose ratios. The optimum condition for glycerol and COD removal was a 5:5 ratio, yielding $213.3 \text{ mL g}^{-1} \text{ COD}$ (21.7% CH_4). Dinh [29] evaluated the substrate's gradual feeding and sludge type (acclimated and non-acclimated) effect on methane production from glycerol. Reactors inoculated using a non-acclimated brewery granular sludge gradually fed with glycerol exhibited a 44.7% of CH_4 . In the same study, reactors fed with 100% glycerol showed just 16.1% of CH_4 , indicating the drastic effect of feeding shock. The values obtained in the present study reinforce the efficiency of the system configuration used to obtain higher quantities of methane in the biogas.

Figure III.2 - Daily volumetric methane production and organic loading rate (OLR) in the reactors R2 and R3 during the start-up and phase 1



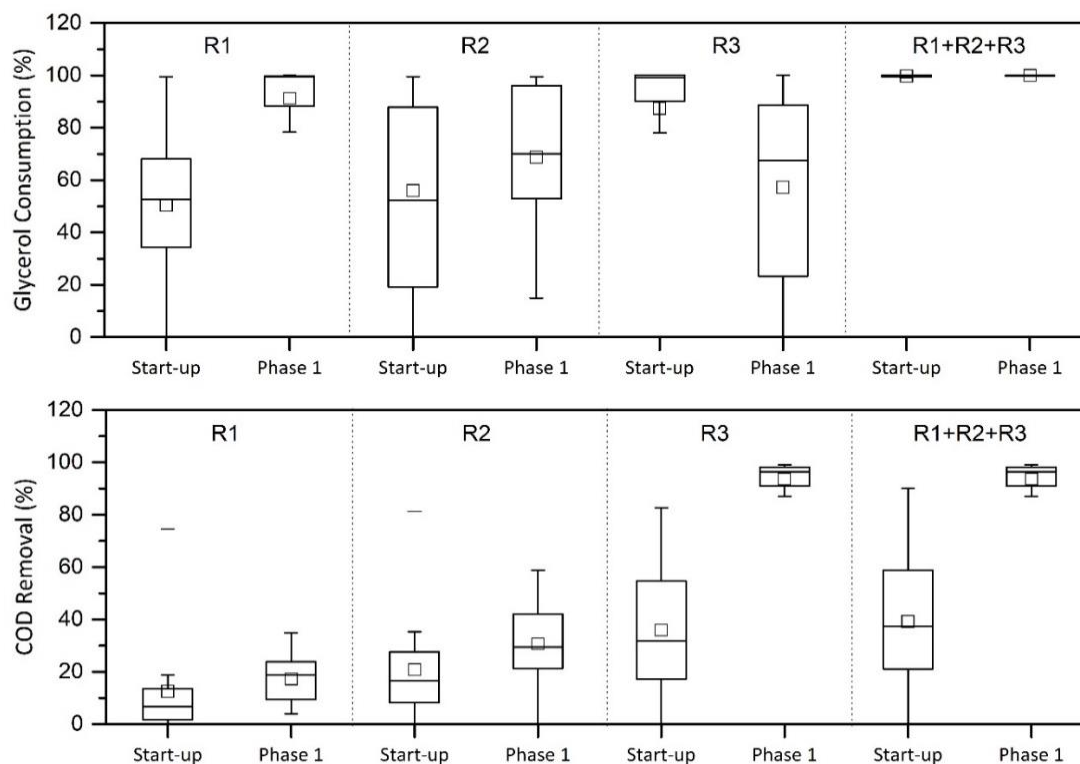
The HRT change favored a significant difference ($p < 0.01$) between the mean values of methane, with a production of $69.68 \text{ L CH}_4 (\text{m}^3 \cdot \text{d})^{-1} (\pm 46.69)$ during star-up and $104.34 \text{ L CH}_4 (\text{m}^3 \cdot \text{d})^{-1} (\pm 64.42)$ at phase 1. The highest yields achieved were $187.4 \text{ L CH}_4 (\text{m}^3 \cdot \text{d})^{-1}$ (start-up) and $283.9 \text{ L CH}_4 (\text{m}^3 \cdot \text{d})^{-1}$ (phase 1) (**Figure III.2**). The increase in the biogas production is most likely due to OLR decrease and microbial selection throughout the experiment. The application of reactors in series allows the degradation of organic matter gradually by using the effluent of the first reactor as an influent of a second or third

one; this allows the selection of different microbial groups in separate reactors and the maximization of its activity. In the present study, with the establishment of methanogenesis in reactor R2, a more easily degradable influent was produced for reactor R3, without the need for buffering supplementation, since the part of the alkalinity was generated during the biodegradation steps, altogether with nitrogen compounds present in the domestic sewage [8].

There was a significant decrease ($p < 0.01$) in the R3 effluent VFA mean values from 2748 mg L^{-1} (± 1454) at the start-up to 636 mg L^{-1} (± 379) at phase 1. The consumption of organic acids in R3 during Phase 1 was the most significant efficacy obtained consequent to the pH increase (8.4 ± 0.17). The COD removal during start-up and phase 1 was 35.9% and 93.6%, respectively, which agrees with the establishment of methanogenesis in R3 (**S. Fig. III.3**). In the present study, the reduction of organic matter was supposed to be seen in reactors R2 and R3 (methanogenic reactors), but it was observed mainly in reactor R3 during phase 1; since the carbon source, glycerol, was not wholly consumed in R1, its consumption took place also in R2, and there was organic acid production and low COD removal.

The reactors R1 and R2 were even more successful in removing glycerol during phase 1, so less glycerol was made available to the reactor R3, so the lower percentage ($p < 0.05$) of glycerol removal in phase 1 (57.21 %) when compared to start-up (87.35%) does not indicate failure in reactor R3, but success in the in-series reactors. The glycerol concentration present in R3's effluent during the start-up and phase 1 was 3 and 2 mg glycerol L^{-1} , respectively. Glycerol removals in the referred experiments were: 87.4 and 67.6%. Thus, the overall glycerol removal in the system was 99.9%, confirming the potential of using this system for glycerol alternate disposal/treatment along with biofuels generation. Some authors reported that substrates rich in organic matter with higher H_2 production potential might result in lower CH_4 conversion in a two-stage anaerobic digestion system [28]. However, in the 3-stage HARFB experimental conditions, we could maximize H_2 production continuously and keep the CH_4 production with COD conversion up to 99%.

S. Fig. III.3 - Glycerol consumption and COD removal in the reactors R1, R2, and R3 of the COD of their respective affluent and effluent during the start-up and phase1



Different reactor configurations and operational parameters have been studied to achieve better bioconversions of glycerol into H_2 and CH_4 . Most of the initial studies were performed using batch reactors; however, recently, studies are using continuous stirred tank reactor (CSTR) and Up-Flow Anaerobic Sludge Blanket reactors (UASB). The results obtained in the present study show the potential of using a HARFB system for fermentation and methanogenesis, providing superior conversion rates of H_2 and CH_4 , even when compared to studies that used purified glycerin (**Table III.3**).

Table III.3 - Comparative table showing the results of bioconversion of crude glycerol into biogas using different anaerobic reactors at mesophilic conditions.

Feedstock/substrate	Reactor	OLR	pH	HRT	Biogas yield	Ref.
Crude Glycerol	Batch	14.4	5.7	24	0.005 (H_2)	[21]
Crude Glycerol	Batch	54.5	5.2	84	0.076 (H_2)	[21]
Glycerin purified	UASB	25.0	5.5	1	0.360 (H_2)	[50]
1% Crude Glycerol + sewage (v/v)	HARFB	13.1	4.89	1	0.423 (H_2)	Present Study (Phase1 - R1)

Feedstock/substrate	Reactor	OLR	pH	HRT	Biogas yield	Ref.
3.5% Crude glycerol + Biodiesel wastewater (w/v)	SBR	11.3	7.0	1	0.128 (CH ₄)	[4]
Crude Glycerol + Acetic Acid (6:4)	Batch	2.5	7.0	7	0.026 (CH ₄)	[49]
1% Crude Glycerol + sewage (v/v)	HARFB	6.2	6.4	2.1	0.117 (CH ₄)	Present Study (Start-up - R2)
1% Crude Glycerol + sewage (v/v)	HARFB	1.6	8.4	8.0	0.094 (CH ₄)	Present Study (Phase 1 - R3)

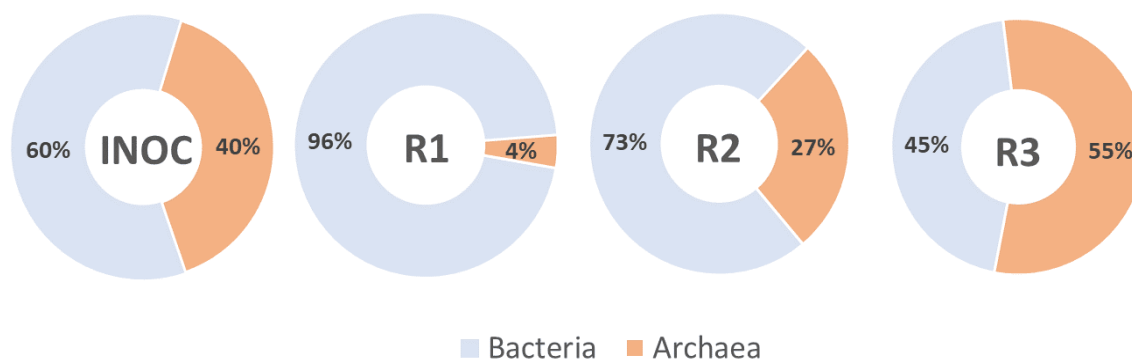
Units: OLR - Organic Loading Rate (Kg COD (m³ d)⁻¹); HRT - Hydraulic Retention Time (days); Biogas - Hydrogen - mol H₂ (mol Glycerol)⁻¹, Methane - m³ CH₄ (kg COD_{removed})⁻¹.

3.4 Microbial Diversity Analysis

3.4.1 Microbial Relative Abundance

The inoculum source showed a relative abundance for Archaea and Bateria Domain as 40% and 60%, respectively (**Figure III.3**). In the sample from R1 (Fermentative Reactor), the relative abundance was just 4% for the Archaea Domain, while it was 96% for Bateria. Therefore, the effectiveness of inoculum pretreatment and operational conditions on microorganisms' selection were confirmed. As discussed previously, those could be claimed for having selected fermentative bacteria responsible for hydrogen and organic acids production.

Figure III.3 - Archaea and Bacteria Domain relative abundancy in the inoculum source and samples from R1, R2, and R3 at the end of Phase 1.



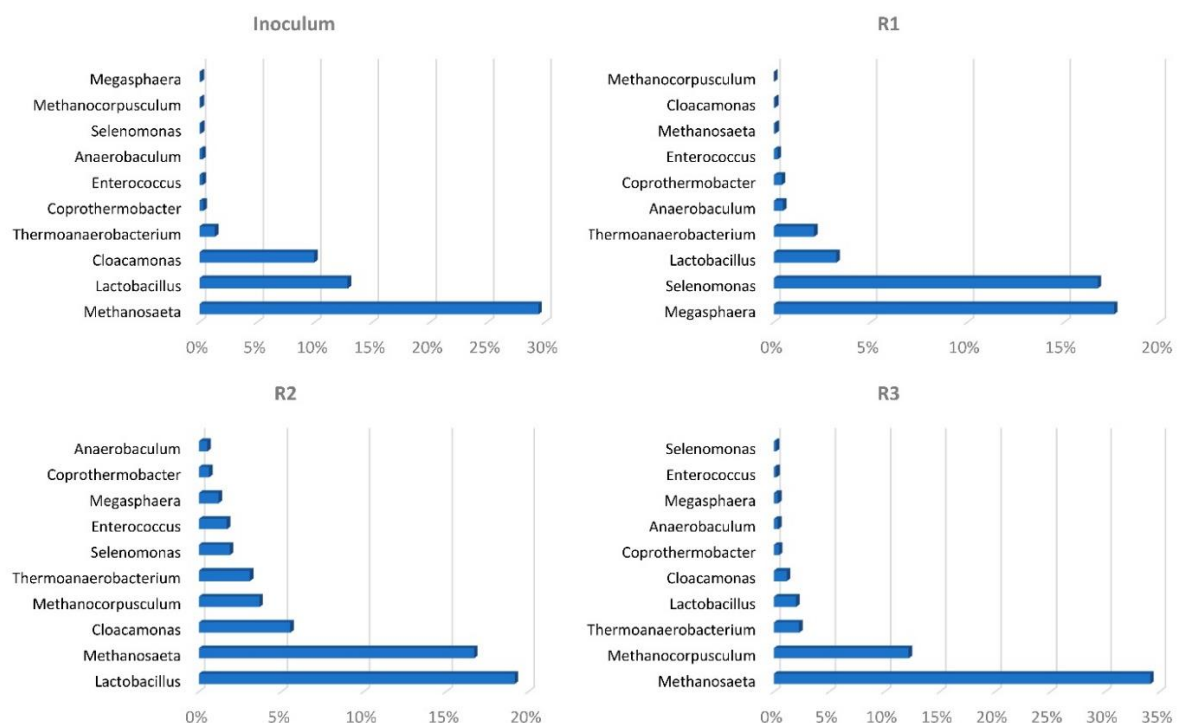
A different tendency was observed in the relative abundance inside reactors R2 and R3 compared to the inoculum (**Figure III.3**). Archaea and Bacteria Domain's relative

abundance was 27% and 73% for R2. Since R2 was fed with the R1 reactor's effluent without any dilution, the high volatile organic acids concentration could have caused the inhibition of the Archaea Domain. On the contrary, for the R3, an increase in the relative abundance for Archaea Domain was observed (55%), corroborating with methane production observed in this reactor (85.7% of CH₄ in the composition of the biogas).

It is possible to attest the system efficiency from the analysis of the relative microbial abundance in the reactors R1, R2 and R3 operated sequentially, creating different environments for selecting specific microbial populations to optimize the whole process of residues digestion and biofuels production.

A considerable change in the phyla composition was observed in all reactors compared to the inoculum *in natura* (**S. Figure III.4**). The most abundant phyla observed in the inoculum were Firmicutes (28%), followed by Cloacimonetes (19%), Bacteroidetes (16%), and Proteobacteria (14%). The Phylum Firmicutes is known to group bacteria capable of tolerating adverse conditions by endospores forming and resisting the sludge's pretreatment; this justifies its dominance in R1 (74%) in comparison to the reactors R2 and R3 [30]. The second most abundant phylum in the inoculum was the Cloacimonetes, which was recently classified, and it clusters syntrophic bacteria involved in the degradation of propionate [31]. Considering that the inoculum *in natura* came from a methanogenic UASB reactor, in which the production of organic acids is known, the presence of anaerobic propionate-degrading bacteria was expected. The presence of phyla Bacteroidetes and Proteobacteria were verified in samples from the inoculum, R1, R2, and R3, which groups facultative fermentative and anaerobic bacteria that have certainly contributed to the hydrogen/organic acids production verified during our experiments [32]. Reactors R2 and R3 only produced methane; there was no H₂ detection. The most abundant phylum was also the Firmicutes (55% and 40%, respectively). It is most likely that this abundance is due to the diversity of strict and facultative anaerobic bacteria belonging to this phylum that can perform a wide diversity of metabolic pathways such as for alcohols and volatile fatty acids production [5].

S. Figure III.4 - Distribution of relative abundance orders of Inoculum (INOC) and Reactors 1, 2, and 3 (R1, R2, and R3) at the end of Phase 1



Lactobacillales, belonging to the Bacteria Domain, was the most abundant order in the inoculum (13.1%) (**S. Figure III.4**). The presence of microorganisms in this order increased in R2 (21%), while a meager percentage was observed in R1 and R3 (3.4 and 2.3%). Regarding the genus *Lactobacillus*, there was a relative abundance of 91% in reactor R2. The presence of *Lactobacillus* is often described in fermentative bioreactors in which acidic pHs are observed [15, 33]. However, the presence of those microorganisms is known to be prejudicial for biohydrogen production due to the inhibition of *Clostridia* cells by the biocines secreted [26].

A different tendency was observed for the orders *Bacteroidales* and *Clostridiales*, showing relative abundance increased from 2.5 and 1.5% in the inoculum to 11.8% and 10.6% in R3, respectively. Thus, it is possible that the operational conditions applied to the reactors, including the carbon source used, favored their establishment in the R3. Members of this order, such as *Clostridium sp.*, have already been described with the ability to consume different carbon sources through hydrolysis, culminating with organic acids and hydrogen generation, among other metabolic pathways [34]. The high relative abundance of the order *Clostridiales* in reactor R3 (10.6%) suggests there were

still compounds to be consumed or an environmental condition that could favor/select these endospore-forming cells.

In reactor R1, the order with the highest relative abundance was *Selenomonadales* (61.3%) and genus *Megasphaera* (29%), which groups lactic acid consuming microorganisms that can produce H₂ [35]. However, there was a reduced production of H₂ in R1 compared to the theoretical production.

The maintenance of different hydrogen-producing microorganisms can be related to the synergism between species that have already been reported in several bioreactors. Strains of Enterobacteriaceae were observed contributing to the production of H₂ and *Clostridium* in a CSTR fed with glucose [36]. The synergism between the orders *Enterobacteriales* and *Bacteroidales* was reported in packaged bed reactors. *Clostridium* spp. developed an association with *Klebsiella* and *Prevotella*, which can agglutinate with other microorganisms [32, 37]. These groups of microorganisms in the R1 reactor may explain the low relative abundance of individuals of the order *Clostridiales* in a fermentative reactor with H₂ production. The microbial consortium can benefit from this synergism between species and stand out in the production of H₂ when compared to communities dominated by *Clostridium*.

Luo et al. [38] used a continuous flow bioreactor inoculated with thermally treated agricultural soil and fed with glucose. They observed a diversified selection of microbial communities (*Selenomonas*, *Enterobacter*, and *Clostridium* spp), resulting in the highest hydrogen production yield compared to the community dominated by *Clostridium* observed in higher OLRs.

For the Archaea Domain present in the acidogenic reactor (R1), the relative abundance of 4% of *Methanobacteriales* was higher when compared to the inoculum (0.8%). In addition, these known H₂-consuming microorganisms are also capable of assimilating methanol [39], which may be present in crude glycerol, favoring its permanence in R1 and justifying the reduced H₂ production.

Methanosarcinales had the highest relative abundance in the methanogenic reactors, presenting 17.6% and 35.7% in the R2 and R3 reactors, respectively. Thus, these microorganisms were likely responsible for the expressive CH₄ generation during the experiments.

The genetic sequencing of the inoculum *in natura* and the composing samples retrieved from the reactor at the end of phase 1 have clearly shown the microbiota changes due to substrate modification operational conditions imposed on the 3-stage bioreactors.

3.4.2 Microbial Community Structure - DGGE

3.4.2.1 Bacteria Domain

S. Figure III.5 shows a dendrogram and the *Jaccard* similarity index calculated for the Bacteria Domain. The samples were clustered in 2 main groups: (1) all reactor R1 and (2) samples from reactors R2, R3, and the inoculum.

A high similarity (93%) was verified between the central and end portion of reactor R1 (R1P2b and R1P3b). Probably, the highest OLR and potentially toxic compounds could have impacted the bacterial community of the first section of the reactor R1 (R1P1b) than the intermediate and final sections. However, it is worth emphasizing that the similarity of R1P2b and R1P3b with the R1P1b is 60%.

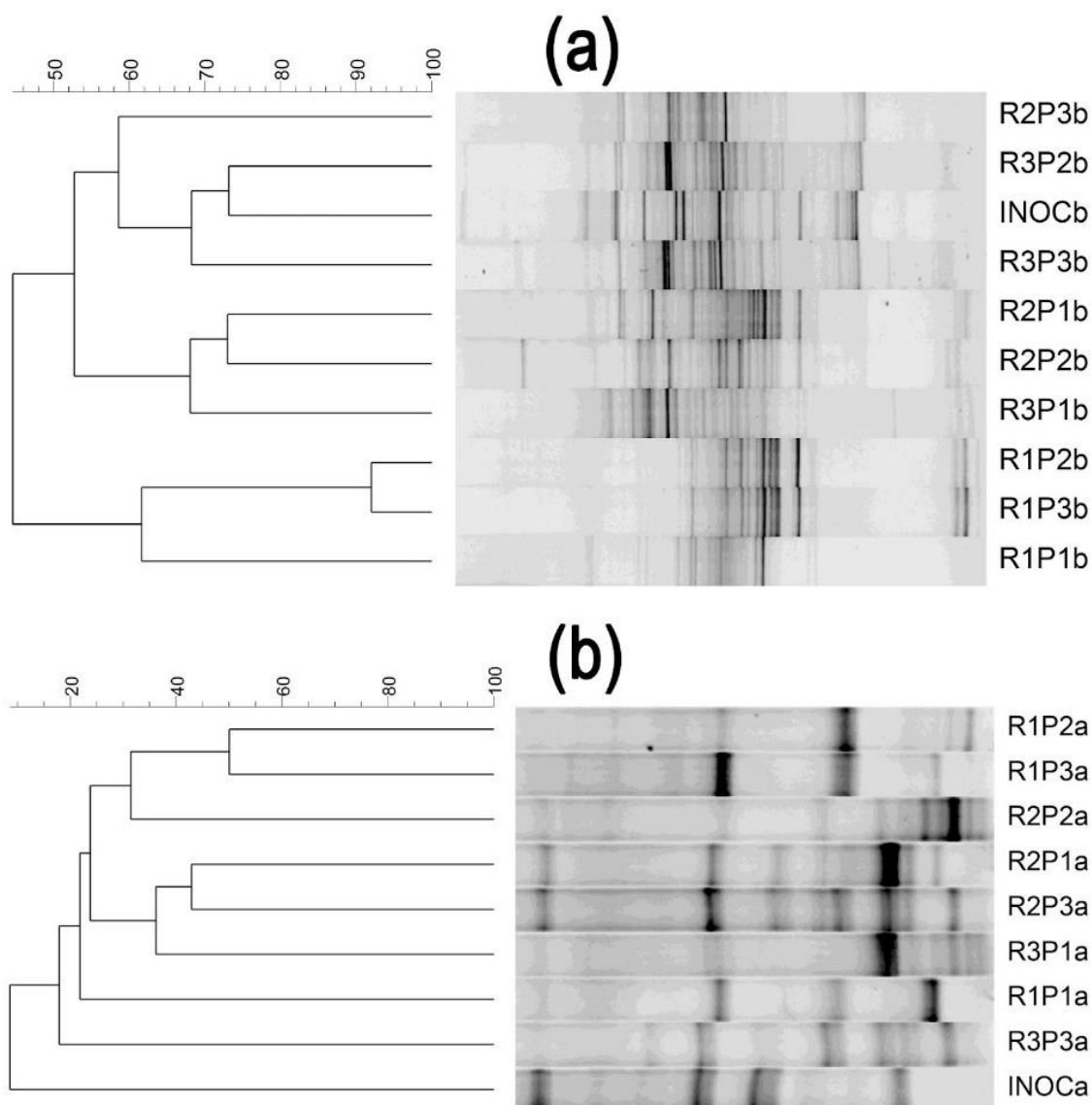
Another essential comparison is with the inoculum (INOCb) with the bacterial community from reactor R1, which was 44%. In other words, the pretreatment of the inoculum inactivated populations, causing many of them to disappear along the first reactor. The higher the OLR, the lower the community similarity; organic loading rate shocks act by selecting more resistant individuals [21].

A similar pattern was observed by Silva et al. [40], who studied a fluidized bed reactor to treat dairy wastewater under different OLRs. 90% similarity was observed at 28.7, 53.2 Kg COD ($\text{m}^3 \text{d}^{-1}$) conditions, and 70% at 95.76 Kg COD ($\text{m}^3 \text{d}^{-1}$). The piston flow of the AFBR acted selecting specific bacteria on different sections inside the reactor, as the initial portion receives major OLRs, it allows and pushes for a longitudinally oriented selection of species.

In Reactor R2, 74% of similarity was observed between the initial and central portions of the reactor (R2P1b e R2P2b). This cluster was 52% similar to the end portion of this reactor (R2P3b) (**S. Figure III.5**). The changes in the bacterial community were expected due to the piston flow and the design of the system set-up operated in series.

As per reactors and system configuration, the effluent of one reactor will be used as the influent for the next one contributing to the microbial selection.

S. Figure III.5 - Dendrogram and similarity coefficient based on the Jaccard correlation of the samples from the 3 points (P1, P2, and P3) of each reactor (R1, R2, and R3) and inoculum (INOC) for the (a) Bacteria domain and (b) Archaea domain at the end of phase 1.



To summarize, similarly to what was observed in R2, a methanogenic reactor, the intermediate and end sections of R3 were more similar between themselves. These sections were possibly colonized by microbial populations capable of generating methane from similar substrates. Different results were reported when batch reactors were used for H_2 production; higher similarities between their populations were observed 87% by Zhao

et al. [41] and 98% by Maintinguer et al. [42]. Pretreatments and operational conditions such as higher pH and temperature range play an essential role. This difference may have occurred due to factors such as the reactor configuration and the more extended experimental period (260 days) in our HARFB system, which contributed to species selection, increasing microbial diversity in the reactors. According to the Shannon-Wiener index (H index) for the Bacteria Domain, higher diversity was observed in the R3 reactor: 3.17, 3.27, and 3.19 for sampling points P1, P2, and P3, respectively (**Table III.4**). These results are comparable with the inoculum diversity index (3.28). Furthermore, it is noteworthy that the inoculum came from a methanogenic reactor and the operational conditions applied for the R2 and R3 reactors were set to favor methane generation, corroborating the high diversity in the R3 reactor, as observed in the inoculum.

The lowest diversity index (2.60) was found for the first sampling point in R1; this can be explained due to the pretreatment applied to the inoculum for fermentative microorganisms' selection and acidic pH imposed (5.5). The same was observed by Abreu et al. [43], in their study for hydrogen production from a mixture of glucose (13 mM) and L-arabinose (16 mM), at 37°C, and pH 5.5. Additionally, the highest OLR these microorganisms were exposed to also contributed to its lowest diversity. Contrary, reactors R2 and R3, being fed with reactor's R1 and reactor's R2 effluent, respectively, received lower glycerol load than R1 but certainly higher in volatile organic acids [44, 45].

Although showing the lowest diversity index compared to all reactors, R1's diversity was still high. Pachiega et al. [15] studied batch reactors fed with sucrose and inoculated with granular sludge from a UASB reactor treating brewery wastewater; the authors observed an H index of 0.78 for the sample of tropical sludge pretreated (pH 5.5 + heat treatment). Reactor's type, system configuration, inoculum source (initial diversity), pretreatment method, carbon source, and operational conditions (OLR, temperature, pH) play a role in microorganisms' selection, and it is impossible to determine which of all the listed factors weighed more. The main drawback of the high microbial diversity is having hydrogen-consuming microorganisms co-existing with hydrogen-producers [46]. Silva et al. [40] observed a correlation between OLR and microbial diversity. For these authors, the higher the OLR, the higher the diversity (2.205 to 2.811); however, the opposite trend was seen for H₂ production. In the present study, the unstable and lowest hydrogen

production obtained during the start-up phase could be due to the impact of OLR on microbial diversity. The same trend was observed in a study aiming to evaluate the microbial profile of water reservoir sediments against organic matter concentration and nutrients such as nitrogen and phosphorus [47].

In reactors R2 (>3.09) and R3 (>3.17), the microbial diversity was higher in comparison to the first reactor (<2.91). As the system comprises 3-series reactors, the volatile fatty acids and alcohols rich-effluent with reduced glycerol load seem to have played an essential role in microorganisms' diversity in R2 and R3. Furthermore, NaHCO_3 supplementation in R2's influent to mimic an optimal pH environment for establishing methanogens could have also affected positively for its diversity.

3.4.2.2 Archaea Domain

DGGE profiles for the Domain Archaea revealed significant structural differences between the inoculum and samples from the reactors after 260 days; the similarity index was less than 15%. This result can be attributed to the pretreatment applied to the inoculum and the operational conditions that the microorganisms were exposed to during the experimental period. It was also observed that there was a reduced similarity between the samples of each reactor. In reactor R1, the lowest similarity was between sampling points R1P2a and R1P3a (50%) and in reactor R2 between R2P1a and R2P3a (40%). Based on this analysis, it was possible to observe the impact of inoculum pretreatment, substrate composition, and operational conditions on the microbial community. The spatial selection of microorganisms throughout the reactor could be attributed to the reactor's configuration – plug flow - as per its definition, the carbon source/substrate the microorganisms were exposed to within the identical bioreactors varies (**S. Figure III.5 b**).

S. Figure III.5 clearly shows that all the samples taken from the reactors were clustered together; however, in a separate branch from the inoculum (~10%). These results confirm the selection of different microbial communities either due to the acidic pretreatment the inoculum was subjected to or the environmental conditions the microorganisms were exposed to during the experimental period (260 days).

The sample from the first point of the system (R1P1a) was not grouped with other samples (less than 30% similar) nor with the inoculum, suggesting the pretreatment

impact in the microbial populations. The central and end regions of R1 (R1P2a and R1P3a) showed 50% similarity, indicating a more similar environmental condition in these two reactor sections. Samples from the reactor R2 were either grouped with samples from R1 and R3. The central portion of the reactor R2P2a was grouped with the central and end region of reactor R1. In a different cluster, it was grouped R2P1a and R2P3a (>40% similarity).

In reactor R3, the sample R3P1a, collected from the reactor's initial part, was grouped with samples from the reactor R2: R2P1a and R2P3a (35% similarity) (**S. Figure III.5 b**). As the R3 was fed with the effluent from R2, probably the substrate composition favored the selection of a similar microbial community. However, the last sampling point of the system (R3P3a) was not grouped with any other sample analyzed, showing less than 20% similarity with them. As being the last part of a system composed of 3-reactors operated in series and fed with the effluent of the precedent reactor, the lack of carbon source (99.9% of overall glycerol removal was achieved) could be the reason for such difference. It was impossible to analyze the sample R3P2a (sampling point R3 central position) due to a DNA amplification limitation.

Archaea microorganisms have high sensitivity to environmental fluctuations. It includes substrate-fed shocks occurring during the reactor's start-up phase and justifies the low similarities of 15% to 50% among all samples. Silva et al. [28] obtained similar results by analyzing the microbiota from the inoculum and the first chamber of a pilot-scale compartmented reactor used for the treatment of sanitary sewage and in reduced OLR ($0.10 \text{ kg COD (m}^3 \text{ d)}^{-1}$); it was observed a 51% of similarity.

The highest diversity Shannon-Wiener index for the Archaea Domain was observed for sampling points R2P2a for R2 (2.25) and R3P3a for R3 (2.27). Both values were higher than that observed for the inoculum (1.99). The lowest diversity index, as expected, occurred in the first sampling point of the fermentative reactor R1 (1.58) since the sludge was subjected to the acidic pretreatment, which aimed to select endospore-forming bacteria, including the methanogens (**Table III.4**).

Table III.4. Shannon-Wiener index (H index) to Bacteria and Archaea domain.

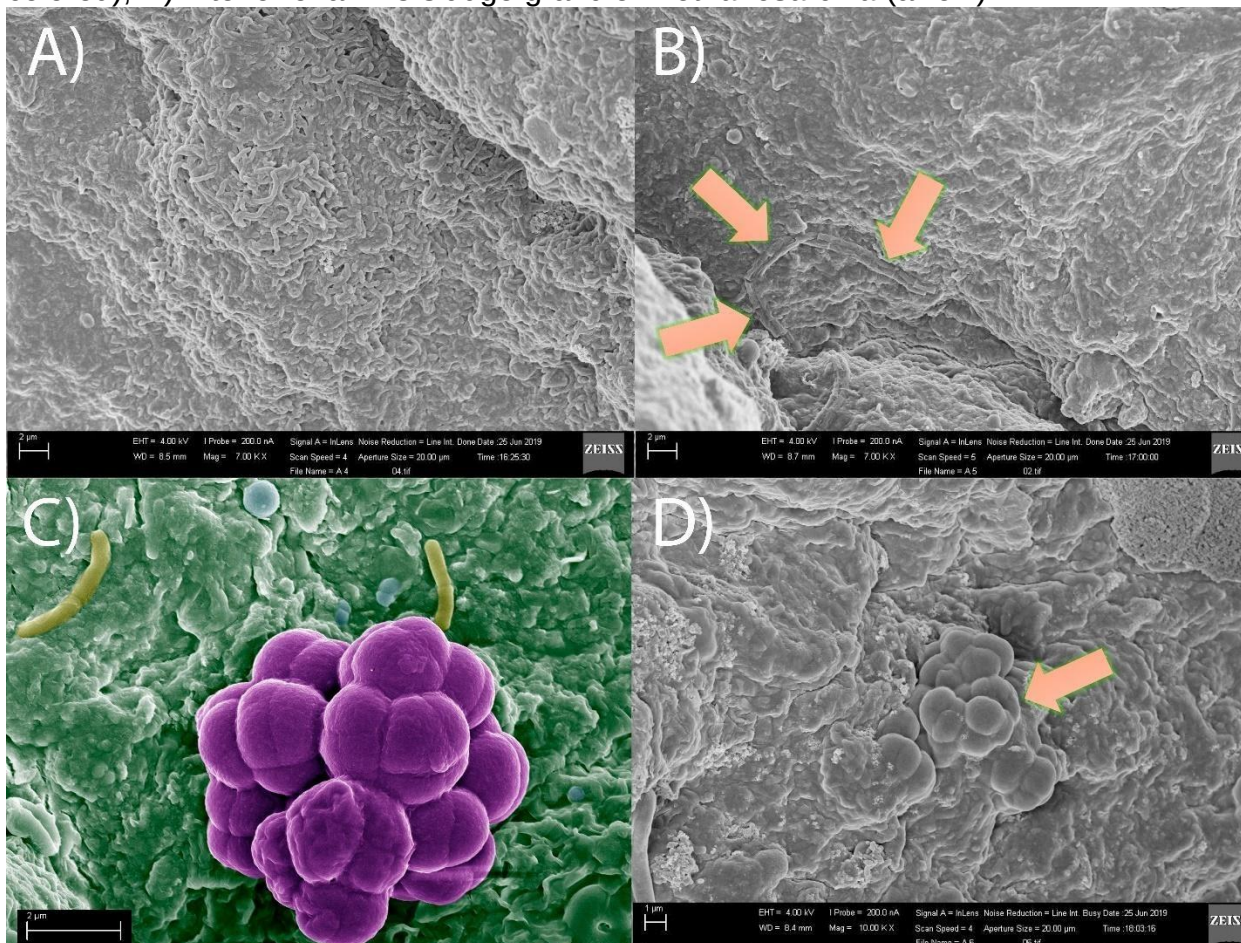
Domain	Inoculum	R1P1	R1P2	R1P3	R2P1	R2P2	R2P3	R3P1	R3P2	R3P3
Bacteria	3.28	2.60	2.91	2.80	3.25	3.15	3.09	3.17	3.27	3.19
Archaea	1.99	1.58	1.71	1.99	2.09	2.25	2.01	2.22	-	2.27

3.4.3 Scanning electron microscopy

Scanning electron microscopy analysis allowed the morphological identification of methanogenic microorganisms in granular sludge samples taken from reactors 2 and 3 and identification of cells morphologies inside hydrogen-producing bioreactor (R1) (**Figure III.4**). Exopolymers (EPS), which are biopolymers produced by microbial cells during specific metabolic processes, have been observed throughout the granular structure, and EPS has clustered a large number of bacterial cells. A series of tunnels/channels were also observed due to the granule extension, which was probably used in syntrophic relationships (food intake, gas output) intra and inter-species and populations of anaerobic microorganisms [48]. The granular sludge from the UASB reactor kept its morphology/activity after being transferred to the HARFB; this is extremely important; besides the biofilm formed and attached to the material support, this interstitial granular sludge helps to avoid the microbial washout.

Cell morphologies similar to microorganisms belonging to the genera *Methanosaeta* (**Figure III.4 B**) and *Methanosarcina* (**Figure III.4 C and D**) were observed in samples from R2 and R3. It is most likely that the production of acetic acid was notable in the bioreactors because the genus *Methanosarcina* has a greater affinity for this carbon source and can grow in nutritional media with reduced pH [49].

Figure III.4 - Scanning electron microscopy (SEM) of the sludge from reactors R1, R2, and R3: A) Interior of an R1 sludge granule; B) Interior of an R2 sludge granule: *Methanosaeta* (arrows); C) Interior of an R2 sludge granule: *Methanosarcina* (digitally colored); D) Interior of an R3 sludge granule: *Methanosarcina* (arrow)



CONCLUSIONS

About the reactor start-up strategy, the inoculum pretreatment was efficient in inhibiting methanogenic microorganisms in R1, avoiding hydrogen consumption in this environment. The increase in HRT positively influenced biogas production and COD removal. The substrates in co-digestion did not inhibit hydrogen and methane-producing microorganisms. The reactor operation reached $0.42 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ glycerol}$ values, $311.9 \text{ e } 283.9 \text{ L CH}_4 (\text{m}^3 \text{ d})^{-1}$ for reactors R1, R2, and R2, respectively. The operational conditions played an important role in selecting microorganisms along with the pistoned flow of the HARFB. Higher microbial diversities were observed inside methanogenic reactors (R2 and R3) in comparison to the fermentative reactor (R1), which was inoculated with an acidic pretreated inoculum. The overall glycerol consumption of 99.9% and COD

removal of about 94% show the potential of using a 3-series HARFB reactor to recuperate bioenergy from a critical industrial waste.

Statement and Declarations

Funding

This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) under Grant 407298/2018-5 and 457144/2014-9; and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) under Grant 2017/11767-1 and 2017/25329-6. The authors are also grateful to the “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil” (CAPES) – Finance Code 001.

Competing interests

The authors have no competing interests to declare relevant to this article's content.

Data Availability

All experimental data generated or analyzed during this study are included in this published article and its supplementary information files.

Authors' contributions

All authors contributed to the study's conception and design. Luan Vieira Adames, Ana Paula Jacobus, Isabel Sakamoto performed material preparation, data collection, and analysis. Sandra Imaculada Maintinguer and Lorena Oliveira Pires made funding acquisition, advising, and experimental outline. Luan Vieira Adames wrote the first draft of the manuscript. Discussion, English, and text revised by Carolina Zampol Lazaro. All authors commented on previous versions of the manuscript read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) under Grant 407298/2018-5 and 457144/2014-9; and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) under Grant 2017/11767-1

and 2017/25329-6. The authors are also grateful to the “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil” (CAPES) – Finance Code 001.

REFERENCES

1. Kaur J, Sarma AK, Jha MK, Gera P (2020) Valorisation of crude glycerol to value-added products: Perspectives of process technology, economics and environmental issues. *Biotechnol Reports* 27:e00487. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00487>
2. Brazilian National Agency of Petroleum NG and B (2022) Oil, Natural Gas and Biofuels Statistical Yearbook 2020. <https://www.gov.br/anp/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/anuario-estatistico/oil-natural-gas-and-biofuels-statistical-yearbook-2020>. Accessed 4 Feb 2022
3. Rivero M, Solera R, Perez M (2014) Anaerobic mesophilic co-digestion of sewage sludge with glycerol: Enhanced biohydrogen production. *Int J Hydrog Energy* 39:2481–2488. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.12.006>
4. Tangkathitipong P, Intanoo P, Butpan J (2017) Separate production of hydrogen and methane from biodiesel wastewater with added glycerin by two-stage anaerobic sequencing batch reactors (ASBR). *Renew Energy* 113:1077–1085. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2017.06.056>
5. Rodrigues CV, Nespeca MG, Sakamoto IK, et al (2019) Bioconversion of crude glycerol from waste cooking oils into hydrogen by sub-tropical mixed and pure cultures. *Int J Hydrog Energy* 44:144–154. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.02.174>
6. Sawasdee V, Haosagul S, Pisutpaisal N (2019) Co-digestion of waste glycerol and glucose to enhance biogas production. *Int J Hydrog Energy* 44:29575–29582. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.03.144>
7. Chilakamaray CR, Sakinah AMM, Zularisam AW, et al (2021) Bioconversion of Glycerol into Biofuels—Opportunities and Challenges. *BioEnergy Res*. <https://doi.org/10.1007/s12155-021-10353-6>
8. Robles Á, Aguado D, Barat R, et al (2020) New frontiers from removal to recycling of nitrogen and phosphorus from wastewater in the Circular Economy. *Bioresour Technol* 300:122673. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122673>
9. Passos F, Bressani-Ribeiro T, Rezende S, Chernicharo CAL (2020) Potential applications of biogas produced in small-scale UASB-based sewage treatment plants in Brazil. *Energies* 13:. <https://doi.org/10.3390/en13133356>
10. Silva JA da, F.M. Braga A, Feroso FG, et al (2021) Evaluation of the influence of trace metals on methane production from domestic sewage, using the Plackett-Burman experimental design. *J Environ Manage* 294:. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.113002>

11. Rodrigues CV, Oliveira Santana K, Nespeca MG, et al (2020) Energy valorization of crude glycerol and sanitary sewage in hydrogen generation by biological processes. *Int J Hydrog Energy* 45:11943–11953. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.02.168>
12. Sivagurunathan P, Kuppam C, Mudhoo A, et al (2018) A comprehensive review on two-stage integrative schemes for the valorization of dark fermentative effluents. *Crit Rev Biotechnol* 38:868–882.
13. Mazareli RC da S, Duda RM, Leite VD, Oliveira RA de (2016) Anaerobic co-digestion of vegetable waste and swine wastewater in high-rate horizontal reactors with fixed bed. *Waste Manag* 52:112–121. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.03.021>
14. Aydin S, Ince B, Ince O (2015) Application of real-time PCR to determination of combined effect of antibiotics on Bacteria, Methanogenic Archaea, Archaea in anaerobic sequencing batch reactors. *Water Res* 76:88–98. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.02.043>
15. Pachiega R, Sakamoto IK, Varesche MB, et al (2018) Obtaining and Characterization of Mesophilic Bacterial Consortia from Tropical Sludges Applied on Biohydrogen Production. *Waste Biomass Valorization*. <https://doi.org/10.1007/s12649-017-0185-6>
16. Rossi DM, Berne Da Costa J, Aquino De Souza E, et al (2011) Comparison of different pretreatment methods for hydrogen production using environmental microbial consortia on residual glycerol from biodiesel. *Int J Hydrog Energy* 36:4814–4819. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.01.005>
17. Rodrigues BCG, De Mello BS, Gonsales Da Costa Araujo ML, et al (2021) Soybean molasses as feedstock for sustainable generation of biomethane using high-rate anaerobic reactor. *J Environ Chem Eng* 9:. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.105226>
18. Maintinguer S, Fernandes B, Duarte I, et al (2008) Fermentative hydrogen production by microbial consortium. *Int J Hydrog Energy* 33:4309–4317. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.06.053>
19. Nation JL (1983) A New Method Using Hexamethyldisilazane for Preparation of Soft Insect Tissues for Scanning Electron Microscopy. *Stain Technol* 58:347–351. <https://doi.org/10.3109/10520298309066811>
20. Griffiths RI, Whiteley AS, O'Donnell AG, Bailey MJ (2000) Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA- and rRNA-based microbial community composition. *Appl Environ Microbiol* 66:5488–5491. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.12.5488-5491.2000>
21. Vasconcelos EAF, Santaella ST, Viana MB, et al (2019) Composition and ecology of bacterial and archaeal communities in anaerobic reactor fed with residual glycerol. *Anaerobe* 59:145–153. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2019.06.014>

22. Jiraprasertwong A, Seneesrisakul K, Pornmai K, Chavadej S (2020) High methanogenic activity of a three-stage UASB in relation to the granular sludge formation. *Sci Total Environ* 724:138145. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138145>
23. Sarma SJ, Brar SK, Sydney EB, et al (2012) Microbial hydrogen production by bioconversion of crude glycerol: A review. *Int J Hydrog Energy* 37:6473–6490. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.01.050>
24. Selembo PA, Perez JM, Lloyd WA, Logan BE (2009) Enhanced hydrogen and 1,3-propanediol production from glycerol by fermentation using mixed cultures. *Biotechnol Bioeng* 104:1098–1106. <https://doi.org/10.1002/bit.22487>
25. Ngo TA, Kim MS, Sim SJ (2011) High-yield biohydrogen production from biodiesel manufacturing waste by *Thermotoga neapolitana*. *Int J Hydrog Energy* 36:5836–5842. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.11.057>
26. Veras STS, Rojas P, Florencio L, et al (2019) Production of 1,3-propanediol from pure and crude glycerol using a UASB reactor with attached biomass in silicone support. *Bioresour Technol* 279:140–148. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.01.125>
27. Veroneze ML, Schwantes D, Gonçalves AC, et al (2019) Production of biogas and biofertilizer using anaerobic reactors with swine manure and glycerin doses. *J Clean Prod* 213:176–184. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.12.181>
28. Silva FMS, Mahler CF, Oliveira LB, Bassin JP (2018) Hydrogen and methane production in a two-stage anaerobic digestion system by co-digestion of food waste, sewage sludge and glycerol. *Waste Manag* 76:339–349. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.02.039>
29. Dinh NT (2020) A novel enhancement for the start-up of methane fermentation reactor by inoculating the acclimated sludge as a seeding material. *IOP Conf Ser Mater Sci Eng* 736:. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/736/4/042041>
30. Filippidou S, Junier T, Wunderlin T, et al (2015) Under-detection of endospore-forming Firmicutes in metagenomic data. *Comput Struct Biotechnol J* 13:299–306. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2015.04.002>
31. Ahlert S, Zimmermann R, Ebling J, König H (2016) Analysis of propionate-degrading consortia from agricultural biogas plants. *Microbiologyopen* 5:1027–1037. <https://doi.org/10.1002/mbo3.386>
32. Maintinguer SI, Fernandes BS, Duarte ICS, et al (2011) Fermentative hydrogen production with xylose by *Clostridium* and *Klebsiella* species in anaerobic batch reactors. *Int J Hydrog Energy* 36:13508–13517. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.07.095>
33. Wu Y, Wang C, Liu X, et al (2016) A new method of two-phase anaerobic digestion for fruit and vegetable waste treatment. *Bioresour Technol* 211:16–23.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.050>

34. Zhao Y, Wu J, Yuan X, et al (2017) The effect of mixing intensity on the performance and microbial dynamics of a single vertical reactor integrating acidogenic and methanogenic phases in lignocellulosic biomass digestion. *Bioresour Technol* 238:542–551.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.04.080>
35. Castelló E, García y Santos C, Iglesias T, et al (2009) Feasibility of biohydrogen production from cheese whey using a UASB reactor: Links between microbial community and reactor performance. *Int J Hydrog Energy* 34:5674–5682. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.05.060>
36. Song J, An D, Ren N, et al (2011) Effects of pH and ORP on microbial ecology and kinetics for hydrogen production in continuously dark fermentation. *Bioresour Technol* 102:10875–10880.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.09.024>
37. Li C, Zhang T, Fang HHP (2006) Fermentative hydrogen production in packed-bed and packaging-free upflow reactors. *Water Sci Technol* 54:95–103. <https://doi.org/10.2166/wst.2006.712>
38. Luo Y, Zhang H, Salerno M, et al (2008) Organic loading rates affect composition of soil-derived bacterial communities during continuous, fermentative biohydrogen production. *Int J Hydrog Energy* 33:6566–6576. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.08.047>
39. Bonin AS, Boone DR (2006) The Order Methanobacteriales Characteristics of Methanobacteriales. *Prokaryotes* 3:231–243. https://doi.org/10.1007/0-387-30743-5_11
40. Silva AN da, Macêdo WV, Sakamoto IK, et al (2019) Biohydrogen production from dairy industry wastewater in an anaerobic fluidized-bed reactor. *Biomass and Bioenergy* 120:257–264.
<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2018.11.025>
41. Zhao C, Karakashev D, Lu W, et al (2010) Xylose fermentation to biofuels (hydrogen and ethanol) by extreme thermophilic (70 °C) mixed culture. *Int J Hydrog Energy* 35:3415–3422.
<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.01.082>
42. Maintinguer SI, Sakamoto IK, Adorno MAT, Varesche MBA (2015) Bacterial diversity from environmental sample applied to bio-hydrogen production. *Int J Hydrog Energy* 40:3180–3190.
<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.12.118>
43. Abreu AA, Alves JI, Pereira MA, et al (2011) Strategies to suppress hydrogen-consuming microorganisms affect macro and micro scale structure and microbiology of granular sludge. *Biotechnol Bioeng* 108:1766–1775. <https://doi.org/10.1002/bit.23145>
44. Marzorati M, Wittebolle L, Boon N, et al (2008) How to get more out of molecular fingerprints: Practical tools for microbial ecology. *Environ Microbiol* 10:1571–1581.
<https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01572.x>

45. Lebrero R, Rodríguez E, Pérez R, et al (2013) Abatement of odorant compounds in one- and two-phase biotrickling filters under steady and transient conditions. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:4627–4638. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4247-1>
46. Traversi D, Villa S, Lorenzi E, et al (2012) Application of a real-time qPCR method to measure the methanogen concentration during anaerobic digestion as an indicator of biogas production capacity. *J Environ Manage* 111:173–177. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.07.021>
47. Maintinguer SI, Sakamoto IK, Adorno MAT, Varesche MBA (2016) Diversity of anaerobic bacteria in sediments from a subtropical reservoir. *Lakes Reserv Res Manag* 21:351–361. <https://doi.org/10.1111/lre.12156>
48. Baloch MI, Akunna JC, Kierans M, Collier PJ (2008) Structural analysis of anaerobic granules in a phase separated reactor by electron microscopy. *Bioresour Technol* 99:922–929. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.03.016>
49. Haosagul S, Vikromvarasiri N, Sawasdee V, Pisutpaisal N (2019) Impact of acetic acid in methane production from glycerol/acetic acid co-fermentation. *Int J Hydrog Energy* 44:29568–29574. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.03.204>
50. Sittijunda S, Reungsang A (2017) Fermentation of hydrogen, 1,3-propanediol and ethanol from glycerol as affected by organic loading rate using up-flow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. *Int J Hydrog Energy* 42:27558–27569. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.05.149>

CAPÍTULO IV

Este capítulo apresenta a versão modificada do artigo submetido à publicação na revista Bioenergy Research ISSN 1939-1234, contendo dados referente aos ensaios 2, 3 e 4.

CONTINUOUS LONG-TERM ANAEROBIC CO-DIGESTION OF CRUDE GLYCEROL AND DOMESTIC SEWAGE: PLUG-FLOW IN-SERIES REACTORS PERFORMANCE AND MICROBIOTA ACCLIMATIZATION

Luan Vieira Adames¹; Lorena Oliveira Pires¹; Sandra Imaculada Maintinguer^{1,2,3}.

¹UNESP, São Paulo State University, Institute of Chemistry, postgraduate program in biotechnology. Araraquara, SP, 14800-060, Brazil. Luan.adames@unesp.br

²UNESP, São Paulo State University, IPBEN – Bioenergy Research Institute. Rio Claro, SP, 13500-230, Brazil.

³UNIARA, University of Araraquara, Araraquara, SP, 14801-320, Brazil.

ABSTRACT

Long-term operation of four in-series Horizontal Anaerobic Reactors with Fixed Bed (HARFB) R1, R2, R3, and R4 was conducted to evaluate the co-digestion of domestic sewage (DS) with different proportions of crude glycerol (CG) from biodiesel production. The main objective was to examine the effect of the increase of CG in the influent with the proportions of 1.5%, 2%, and 3% (v/v). The anaerobic co-digestion was conducted in sequential reactors with increasing diameters to favor the fermentation in the R1 and R2 and the methanogenesis in the R3 and R4. The increase in CG proportions in the influent resulted in mean OLRs of 18.06, 26.75, and 37.85 kg COD/(m³ d) for 1.5%, 2%, and 3% of CG, respectively. The highest hydrogen production was (L H₂/(m³ d)) 277.88 (R1, at the 1.5% CG) and 84.43 (R2, at the 2% CG). The highest methane volumetric production occurred during the 1.5% CG in R3 (306,7 L CH₄/(m³ d)), with a 98% COD removal. The configuration of four in-series reactors could promote total removals of CG, even at the 3% CG. Reactor R1 produced 4 g/L of 1,3-Propanediol and 2.8 g/L of propionic acid. The changes in the microbiota were verified, mainly on how the *Lactobacillales* and *Selenomonadales* orders were favored, respectively, in the fermentative reactor (R1) and the methanogenic reactor (R3). The inhibition of the methanogens verified in the in-series reactors selected the *Methanosarcinales* order. Even though CG increased caused some instabilities in the reactor parameters, no toxic effect was reached and the HARFB in-series system showed robustness to removing CG continuously for extended times.

Keywords: Biogas, Hydrogen, Methane, Biodiesel, Anaerobic Reactor, 1,3 Propanediol.

1 INTRODUCTION

The shortage of fossil fuels, the increase in emissions of combustion pollutants, and their rising costs make alternative fuels more attractive. In this respect, the production and use of biofuels based on biomass, such as biodiesel, has increased considerably. However, in biodiesel production, through the transesterification process, each oil mole reacts with 3 moles of alcohols (i.e., methanol or ethanol), yielding 3 moles of biodiesel and 1 mole of glycerol [1]. Crude glycerol (CG) has drastically decreased its market value with the escalation of world biodiesel production [1, 2]. In order to achieve higher sales value to segments such as the pharmaceutical and food industry, CG needs to be purified to obtain more competitive by-products, resulting in more costs for biodiesel chain production [2, 3]. In this context, using unpurified CG for value-added product generation through bioconversion can be economically attractive.

Introducing CG into renewable energy production processes benefits those processes and helps reduce the cost of biodiesel production while benefiting the environment. One of the most suitable methods is the bioconversion of CG through anaerobic digestion (AD) for biogas (H_2 and CH_4) production and value-added products such as 1,3-Propanediol (1,3-PD), alcohols, and volatile fatty acids (VFA) [2, 4].

However, crude glycerol (CG) has low economic value due to the need for purification as a result of the presence of contaminants such as methanol, soap, free fatty acids, salts, dissolved or suspended charcoal, and chemical elements that can have an inhibition effect on microorganisms making a challenge to maximize its use in biosystems [1]. Different reactor configurations, operational parameters, and combinations of feedstocks for co-digestion have been studied to overcome the CG inhibition effect. Razaviarani et al. [5] observed that the prolonged addition of 1.8% (v/v) glycerol to the sludge could destabilize AD in continuously stirred tank reactors. The continuous addition of 3% (v/v) glycerol for more than a week led to lower biogas production, chemical oxygen demand (COD), and volatile solids (VS) removals. Nghiem et al. [6], testing 0.63 and 3.0% CG (v/v) in a pilot-scale digester, found that the lowest proportion of this substrate (0.63% v/v) was the best for methane production.

Although CG has high organic matter content and is readily biodegradable, there is a lack of essential nutrients for AD, such as nitrogen [1]. The co-digestion is the most

employed approach to solve the nutritional lack of one residue, providing more variability for AD feedstock. In this sense, to reach nutritional supplementation, CG is usually co-digested with swine manure [7], sewage sludge [3], and food waste [8]. The co-digestion with domestic sewage (DS) is another suitable option to add nutrients and dilute the CG [2, 9]. Even though nitrogen concentration in sewage is not as high as the other wastes, the optimal nitrogen dosage for anaerobic treatment systems is largely unknown. Industrial wastes are often required to be augmented with N more than the stoichiometric requirement for anaerobic degradation. The N supplementation in excess is subsequently released into water bodies, impacting aquatic systems' ecology [10].

The reactor configuration and operation approach strongly influence the microbiota environment, which could help surpass possible toxic effects or organic loading rate (OLR) overloads. Horizontal reactors have been successfully utilized to maximize biogas conversion and remove toxic compounds and high OLR wastes. Zhou et al. [11] achieved excellent volumetric methane production rates of 4.58 and 5.37 L CH₄/(L d) at OLRs of 10.80 and 13.80 kg-VS/(m³ d) from food waste. Oliveira et al. [12] removed 75% of veterinary antimicrobial sulfamethazine. However, there is a lack of studies evaluating horizontal reactors' benefits in treating CG. The HARFBs installed in-series and the eventual biomass stratification can help overcome issues reported in batch reactors which can present system stabilities and failure when fed with CG concentrations up to 3% due to acid accumulation such as propionic acid [3, 13].

Regardless of the anaerobic reactor used, an effective system should help to amplify the adaptation and maintenance of adequate biological activity. Most of the studies use pure cultures aiming to reach better production yields for 1,3-PD using *Klebsiella pneumoniae* [14], and *Clostridium butyricum* [15]; *Enterobacter aerogenes* for H₂ and ethanol production [16], and *Clostridium pasteurianum* for butanol [17]. However, working with mixed cultures could make the system more feasible to implement on a full scale since there are no concerns about contamination [18]. Nonetheless, identifying the microbial composition in the anaerobic sludge is essential for building more efficient CG converting consortia, as it can provide information on the predominant metabolic pathways and help control the stability of the process.

In this pursuit, this work aimed to evaluate four in-series horizontal anaerobic reactors with fixed bed (HARFB) fed with different proportions of CG and DS as regards the hydrogen and methane production, COD removal, VFA, and 1,3-PD production and how the increase in the amount of CG modifies the reactors microbiota.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Substrates

Crude glycerol (CG) from the transesterification of vegetable oils and animal fat for biodiesel production was provided by Biobrotas located in Brotas (SP-Brazil). The feedstock was stored in dark polyethylene gallons and kept at room temperature until usage. Glycerol physic-chemical characteristics were: COD 1.92 kg/L (± 0.13), 80.6% (± 5.3) glycerol content, pH 4.35 (± 0.55), 5.3% (± 0.3) of chlorines, 11.4% (± 3.7) humidity, 5.1% (± 0.3) ashes and 2.84% (± 0.73) non-glycerol organic matter.

Domestic Sewage (DS) was from the wastewater treatment plant located in Rio Claro (SP-Brazil). The DS was collected weekly (after coarse solid removal) and stored in dark polyethylene gallons at room temperature. Its average composition was as follows: 378 mg COD/L (± 165), total solids 183 mg/L (± 73), and pH 7.0 (± 0.3). A blend of CG and DS weekly prepared and kept at 4°C formed the influent.

2.2 Inoculum source

The inoculum was collected from an Upflow Anaerobic Sludge Blanket (UASB) reactor treating slaughterhouse wastewater (Avicola Dakar, Tietê – São Paulo State – Brazil). The inoculum was mixed with the support material and used to fill the reactors R2, R3, and R4 [9]. For reactor R1, the *in natura* inoculum was pretreated (pH 3.0 for 24h at 37°C). After that, the pH of the pretreated inoculum was adjusted to 5.5 and inserted in R1 along with the support material [9].

The inoculum was identified previously by Adames [9], with relative abundances as *Lactobacillales* (13.1%), *Cloacimonetes* (10.0%), *Synergistales* (4.1%), *Bacteroidales* (2.5%), *Methanosarcinales* (29.5%), *Methanomicrobiales* (8.7%), *Methanobacteriales* (0.8%) and *Thermoplasmatales* (0.7%) orders.

2.3 In-series system timeline operation

Before this study, reactors R1, R2 and R3 were operated for 265 days fed with 1% CG and 99% DS [9]. The system was composed of four in-series HARFB made of 2 meters long PVC tubes with entry and exit ports (Influent and Effluent) (**S. Fig. IV.1**). The reactors were installed sequentially, making the first reactor's effluent the second reactor's influent until the last reactor.

The reactor's diameters were 5 cm, 10 cm, 15 cm, and 20 cm for reactors R1, R2, R3, and R4, respectively, to favor shorter fermentation times (R1 and R2) and longer HRT for the methanogenesis process (R3 and R4). The reactor R4 was added to the system during Phase 2 (2% of CG) to maximize COD removals. All reactors were filled with PVC corrugated conduit rings (2 cm x 2 cm) as support material to build the fixed bed. The reactors R1, R2, and R3 had an external temperature controlling system consisting of silicone tubes filled with water at 37°C involving the bioreactors. The Reactor R4 was kept with no temperature control.

2.4 Operational conditions

The reactors were performed in three distinct phases (1, 2, and 3) in which only the proportions (% v/v) of CG and DS were modified. The influent pumping was kept at 2.64 ml min⁻¹. Table 1 summarizes operational conditions (influent and effluent COD, OLR, pH, proportions of CG and DS, each reactor's hydraulic retention time (HRT), the addition of alkalizing, and phase duration). The NaHCO₃ was only added to the reactor's R2 influent during Phase 1, reactors R1 and R2 influent in Phase 2, and Phase 3 only to the influent of reactors R1 and R3 in the concentrations described in **Table IV.1**.

Table IV.1 Operational parameters, proportions of Crude Glycerol (CG) and Domestic Sewage (DS) in the influent and mean values ($\pm$ SD) of organic loading rate (OLR), chemical oxygen demand (COD), nitrogen, and pH of the influent and effluents of reactors R1, R2, R3, and R4 during the phases of 1.5%, 2%, and 3% of crude glycerol proportions

Parameters	Phase 1 (1.5% CG - 98.5% DS)				Phase 2 (2% CG - 98% DS)					Phase 3 (3% CG - 97% DS)				
	IN	R1	R2	R3	IN	R1	R2	R3	R4	IN	R1	R2	R3	R4
HRT	NA	1.00	4.20	8.04	NA	1.00	4.20	8.04	10.72	NA	1.00	4.20	8.04	10.72
NaHCO ₃	0.00	0.00	2.00	0.00	3.00	0.00	3.00	0.00	0.00	5.00	0.00	0.00	5.00	0.00
OLR	NA	18.06 ± 2.14	9.12 ± 1.56	3.59 ± 1.81	NA	26.75 ± 2.21	15.24 ± 1.20	7.57 ± 1.42	0.54 ± 0.57	NA	37.85 ± 3.72	21.06 ± 2.19	10.24 ± 0.48	2.29 ± 1.00
COD	18.06 ± 2.14	15.60 ± 2.68	12.02 ± 6.05	0.33 ± 0.15	26.75 ± 2.21	26.06 ± 2.06	25.35 ± 4.75	6.61 ± 4.10	0.80 ± 0.24	37.85 ± 3.72	36.01 ± 3.74	34.30 ± 1.60	23.16 ± 6.68	0.95 ± 0.05
pH	7.41 ± 0.32	5.55 ± 0.94	7.16 ± 0.93	8.31 ± 0.23	7.10 ± 0.63	5.06 ± 0.61	5.00 ± 0.45	6.59 ± 0.87	7.70 ± 0.16	7.69 ± 0.31	5.21 ± 0.26	5.00 ± 0.16	6.37 ± 1.25	7.89 ± 0.28
N	61 ± 11	54 ± 30	54 ± 33	50 ± 30	60 ± 8	35 ± 8	20 ± 6	30 ± 15	61 ± 52	56 ± 8	35 ± 10	23 ± 8	29 ± 4	29 ± 7

NA: Not Applicable; IN: influent; HRT: Hydraulic Retention Time (days); NaHCO₃ (g/L/reactor); OLR: Organic Loading Rate (kg COD/(m³ d)); COD (g/L); N: nitrogen (mg/L). CG: Crude Glycerol; DS: Domestic Sewage.

2.5 Physico-chemical and Chromatographic Analysis

In order to evaluate the performance of the reactors system, affluent and influents were sampled twice a weekly. The composite samples of affluent (inlet of R1) and influents (output of R1, R2, R3, and R4) were composed of single samples of 100 ml, which were collected every 1 hour during 5 hours. The samples were analyzed twice a week for pH, alkalinity, Chemical Oxygen Demand (COD), Total Volatile Fatty Acids (VFA_{total}), and and biweekly for free glycerol [9, 19].

The identification of alcohols and VFA, performed biweekly, was conducted in a Shimadzu® GC-2030 gas chromatograph, equipped with a flame ionization detector, automatic sampler for AOC headspace 6000 Plus, and HP INNOWAX column (Agilent Technologies), 30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m film thickness. The chromatographic conditions

were: 35 °C (0 min), 2 °C min⁻¹ 38 °C (0 min), 10°C min⁻¹ 75 °C (0 min), 35 °C min⁻¹ 120 °C (1 min), 10 °C min⁻¹ 170 °C (2 min), increasing the final temperature of the heating ramp to 230 °C for 2 minutes, totaling approximately 17 minutes of running time. The column flow was 1.5 mL min⁻¹ with nitrogen (N₂) as carrier gas. The detector used hydrogen (H₂) at 30 mL min⁻¹ with synthetic air at 300 mL min⁻¹ and N₂ at 30 mL min⁻¹ as flame and auxiliary gases. The detector temperature was 280°C. The conditions of the autosampler using a 2.5 mL syringe were: 13 minutes of incubation of the sample at 100 °C, injection of 400 µL of the sample with the syringe at 100 °C, and 3 minutes of washing the syringe with N₂ after each injection, adapted from Adorno, Hirasawa, and Varesche [20]. The same GC and column were used to analyze 1,3-Propanediol (1,3-PDO) through the liquid injection of 2 µL with an automatic liquid sampler after sample filtration in 0.22 µm nylon membranes (MSI, USA) according to Egoburo et al. [21].

Total biogas volumetric production was measured daily by water displacement, and real-time biogas production was recorded using an adapted Arduino microcontroller [9]. Gas chromatography was performed twice a week, to evaluate biogas composition using a Shimadzu GC-2014, equipped with column 1010 PLOT (30 m x 0.53 mm), thermal conductivity detector (TCD), and Argon as a gas carrier. Injector and detector temperatures were set as 220°C and 230°C, respectively. Column temperature ramp was: 120°C (1 min), 40°C/min up to 200°C (3 min), 50°C/min up to 230°C (0,5 min) [9].

2.6 DNA Sequencing

Sludge samples from each reactor were collected at the end of phases 1 (1.5% CG - 152th day) and 3 (3% CG - 278th day). Samples from the three sampling points (P1, P2, and P3) of each reactor (Supplementary Fig. 1 of Online Resource 1) were homogenized, and the composite sample was used for DNA extraction.

DNA extraction was carried out by the phenol-chloroform modified method [22]. Extracted DNA integrity was verified by a 260/280 ratio using an ND-2000 spectrophotometer (Nanodrop Inc., Wilmington, DE). DNA was dried at room temperature for 24 hours and then stored at -20°C until its analysis at GenONE- (Rio de Janeiro-RJ, Brazil) using the NGS Illumina MiSeq platform analyzed as described in Adames et al. [9].

Sequences were deposited in NCBI genetic sequence database, Project name PRJNA531496, Bioproject PRJNA531496, R1: Biosample SAMN 21000023 (SRA: SRR15680138); R2: Biosample SAMN21001927 (SRA: SRR15680202); R3: Biosample SAMN21001929 (SRA: SRR15680204) for the analysis performed at the end of phase 1 and for the phase 3 were registered under numbers: R1: Biosample SAMN28608351 (SRA: SRR19400694); R2: Biosample SAMN28608352 (SRA: SRR19400695); R3: Biosample SAMN28608353 (SRA: SRR19400696), R4: Biosample SAMN28608354 (SRA: SRR19400697)

2.7 Statistical Analyses

Statistical analyses through ANOVA and Tukey's test were performed using Microsoft Excel 365 for Windows 10 (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA), considering the completely randomized design, with three treatments for reactors R1, R2, and R3 (phases 1, 2, and 3) and two treatments for reactor R4 (phases 2 and 3). The analysis of variance (ANOVA, $p < 0.05$) was used to assess whether there are statistically significant differences among various parameters due to differences in treatments and expressed as mean values $\pm$ SD. The number of samples used for statistical test, the Tukey's test ($p < 0.05$) and F-statistic as shown in **S. Table IV.1**, **S. Table IV.2**, and **S. Table IV.3**.

3 RESULTS

3.1 In-series reactors performance

Figure IV.1 presents the reactor's pH, alkalinity, and VFA_{total} register during all three operation phases. Although the pH averages of the reactor R1 did not show statistical differences ($p > 0.01$) and it remained at the fermentative pH (< 5.5). The occasional pH increases allowed the reestablishment of the methanogenic microbiota, reflected in the biogas composition containing CH_4 and H_2 . The opposite change was observed in reactor R2 after increasing the CG quantities from 1.5% to 2%, which decreased ($p < 0.01$) pH from 7.16 ± 0.93 to 5.00 ± 0.45 . Consequently, was verified H_2 production and almost ceased the CH_4 generation. The methanogenic reactors (R3 and R4) kept the pH above 6.5, holding the in-series system stability (**Figure IV.1**).

Different alkalinizing approaches were taken, considering the lack of alkalinity in CG and DS. In phase 1 was added NaHCO_3 (2 g/L) to the influent of R1 and R2, resulting in total alkalinity of 1830 and 1614 mg CaCO_3/L , respectively. However, the rise of CG to 2% (phase 2) resulted in high $\text{VFA}_{\text{total}}$ production. After that, NaHCO_3 was lifted to 3 g/L in reactors R1 and R3 to maintain enough alkalinity. However, the pH of reactor R2 dropped to the fermentative range.

The stability of methanogenic reactors could be verified through the VFA:Alkalinity (VFA/ALK) ratio, which must be less than 0.8 [23]. Nualsri [24] achieved VFAs/alkalinity ratios between 0.15 and 0.27 in the digestion of sugar cane syrup in two-stage UASB reactors. Reactor R2 could not maintain the VFA/ALK below the recommended in the present study due to intense VFA production. The NaHCO_3 supplementation in reactor R2 was insufficient, resulting in a ratio of 1.37 ± 0.84 , 2.76 ± 1.84 , and 2.01 ± 0.44 with 1.5%, 2%, and 3% CG, respectively. The elevation of the CG proportion in the influent led reactor R2 from methanogenic to the fermentative stage, raising its H_2 yielding and consequently inhibiting CH_4 production.

Reactor R3 had its highest methane production ($306,7 \text{ L CH}_4/(\text{m}^3 \text{ d})$) with 1.5% CG (phase 1) in the influent, and the VFA/ALK ratio was 0.07 ± 0.03 . However, the increase in CG to 2% (phase 2) led to the VFA/ALK ratio of 1.14 ± 0.40 and low CH_4 productions of $63.0 \pm 51.2 \text{ L CH}_4/(\text{m}^3 \text{ d})$. However, the methane production was maintained uninterrupted during the whole operation. The VFA/ALK ratios in Reactor R4 were 0.22 ± 0.13 (phase 2 - 2% CG) and 0.49 ± 0.15 (phase 3 - 3% CG) due to the low OLR applied (0.54 ± 0.57 and $2.29 \pm 1.00 \text{ kg COD}/(\text{m}^3 \text{ d})$) and the consumption of $\text{VFA}_{\text{total}}$ in the reactor R3. Alves et al. [3], utilizing batch reactors in the co-digestion of CG with sewage sludge, obtained low VFA/ALK ratios (< 0.4) as a consequence of the sewage sludge total alkalinity ($960 \text{ mg CaCO}_3/\text{L}$) and its low degradability.

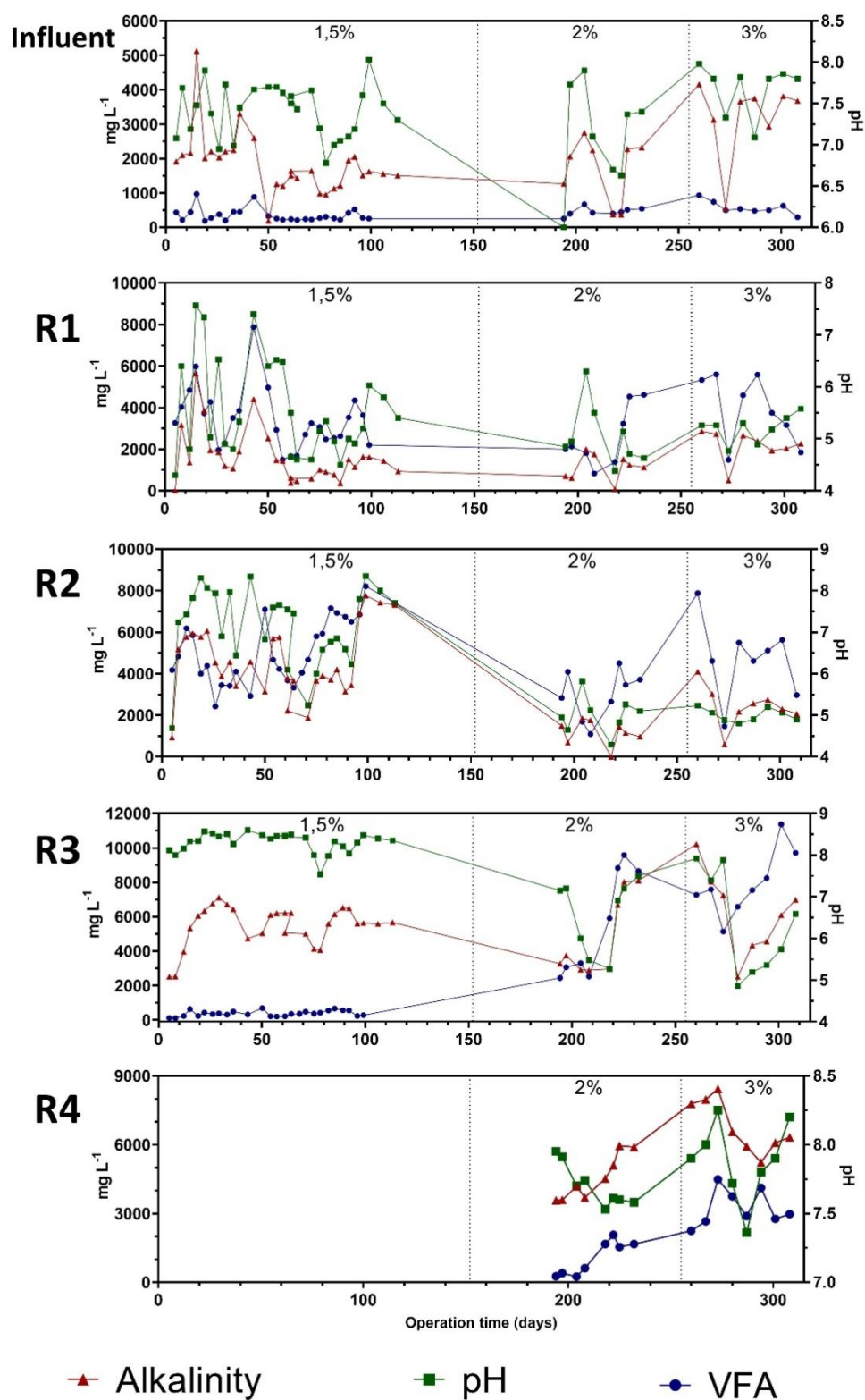


Figure IV.1 - Total alkalinity (mg CaCO₃/L), Volatile Fatty Acids (VFA_{total} – mg/L), and pH in the influent and effluent of the reactors R1, R2, R3, and R4 during the phases 1 (1.5% CG), 2 (2% CG), and 3 (3% CG).

The proportion of nitrogen was reduced with the increase of CG from 1.5% (phase 1) to 3% (phase 3), resulting in COD:N ratio going from 296:1 to 676:1 in reactor R1. Nitrogen is a crucial macronutrient used in essential functions such as cell growth [10]. Its variations on nitrogen could affect the system's performance. The nitrogen deficiency may have disturbed microbial biomass growth, avoiding reaching bacterial cells enough to degrade the overplus carbon fed. Testing different COD:N ratios, Sreethawong et al. [25] managed to reach a better hydrogen production with a ratio of 45:1 in batch reactors treating cassava wastewater (OLR 30 kg COD/(m³ d)). Even though perfect ratios are proposed based on the bacteria cell composition, different operational parameters and wastewaters could demand different ratios. Hussain et al. [10] studied different COD:N ratios on methanogenic reactors treating phenol wastewater from 300:10 to 300:0 to achieve the best CH₄ production at 300:1. The authors reported that at the 300:0 ratio, biogas production ceased, and there was a 25% drop in cells in the anaerobic sludge. In the present study, reactor R3 had its best CH₄ production with 1.5% CG (phase 1) with a COD:N ratio of 223:1. The 2% and 3% CG phases had COD:N ratios of 1267:1 and 1715:1, respectively. The N supplementation could be introduced at high CG quantities to achieve better CH₄ production. However, even with the N deficiency, there was no reactor failure.

Despite the fluctuations in the CH₄ production, reactor R3 showed a very stable COD removal of 98.2 ±0.8% during phase 1 (**Figure IV.2**). The values achieved are higher than those observed by Alves et al. [3], who obtained COD removals of 20.6% in co-digestion of food waste, sewage sludge and 1% of CG in batch reactors with an influent of 28.1 ±0.29 g COD/L. The increase in the CG amount affected the reactor R3 removal efficiency, but reactor R4 held the system perform in 97.5 ±0.2% of COD removal in phase 3. The glycerol conversion into fermentation by-products was efficient, reaching 89.9 ±10.2% right on the reactor R1 at Phase 3 (**Figure IV.2**). The reactors R1+R2 converted up to 99.9% of the free glycerol, showing that the set of two HARFB reactors is enough to hydrolyse CG.

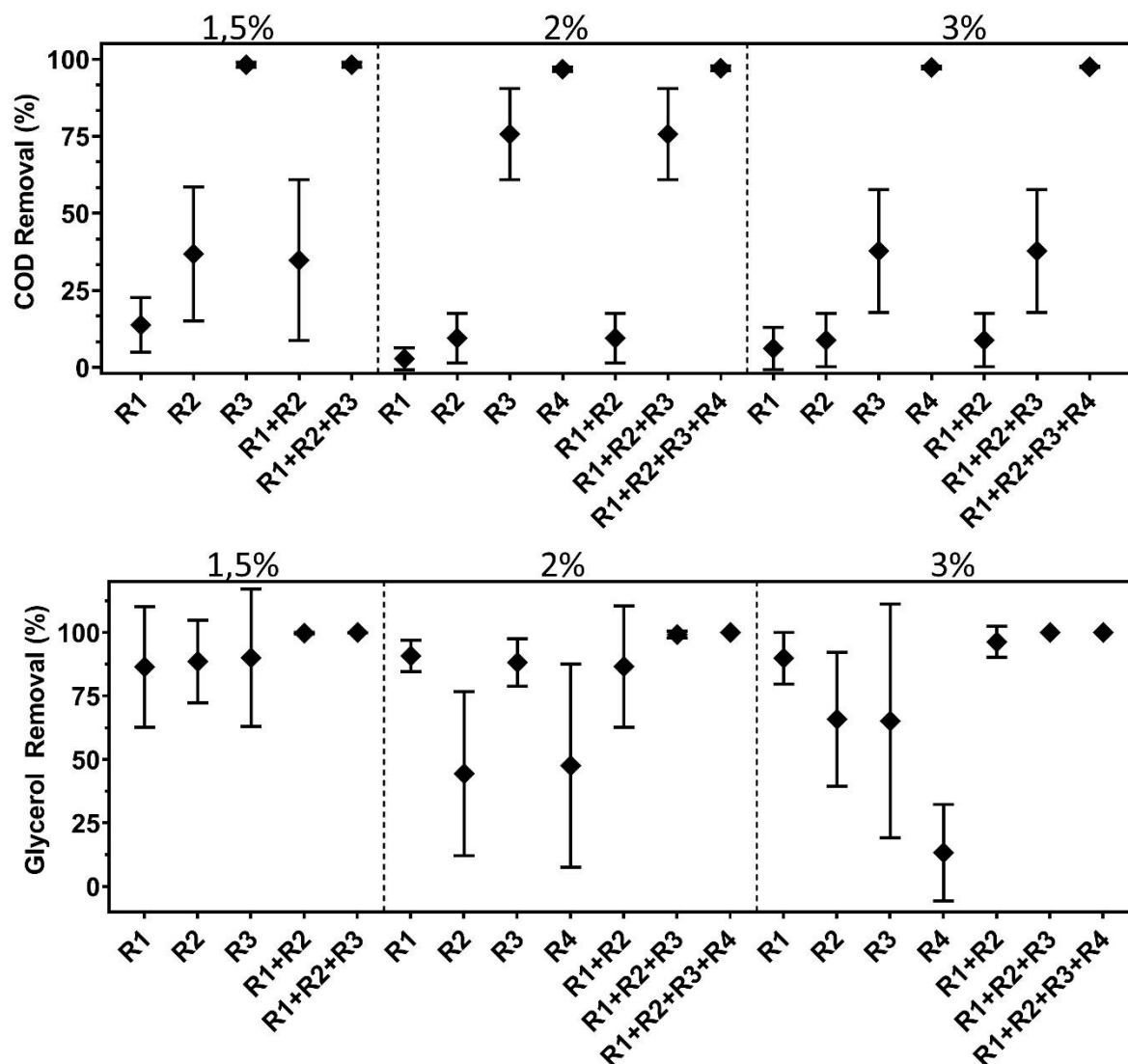


Figure IV.2 - Glycerol consumption and COD removal in the reactors R1, R2, R3, and R4 during the phases with 1.5%, 2%, and 3% of raw glycerol concentration

3.2 Hydrogen and Methane Production

The highest hydrogen production was observed in R1 ($277.88 \text{ L H}_2/(\text{m}^3 \text{ d})$), occurring with 1.5% of CG proportions (phase 1) and R2 ($84.43 \text{ L H}_2/(\text{m}^3 \text{ d})$) with 2% CG (phase 2) (**Figure IV.3**). The mean values of hydrogen production in R1 did not confer statistical difference ($p > 0.05$) in any of the three phases tested, going from 44.7 ± 53.4 to 70.66 ± 70.61 (**S. Table IV.2**). A greater ($p < 0.01$) hydrogen production ($10.64 \pm 18.54 \text{ L H}_2/(\text{m}^3 \text{ d})$) was observed in R2 with the 2% CG (phase 2). The hydrogen production

remained continuous but unstable, associated with pH instability in all phases, could trigger changes in metabolic pathways, and favored hydrogen-consuming microorganisms.

High conversions of free glycerol into H_2 were observed, with daily production of up to 0.71 mol H_2 /mol glycerol in the 2% CG (phase 2). Vasconcelos et al. [26] reported lower conversions of 0.096 mol H_2 /mol glycerol in a UASB reactor with an OLR of 54.5 Kg COD/(m³ d). The author's findings indicated that the microbiota might have difficulties converting glycerol to H_2 at high organic rates. Jiraprasertwong et al. [27] also observed a drop in biogas production in UASB reactors operated in-series, fed with wastewater from ethanol production when OLR of 20.0 Kg COD/(m³ d) was applied. The authors verified that the accumulation of AGV in the reactor was caused by high OLR, reaching an inhibitory concentration.

The maximum hydrogen percentage in reactor R1 was 40.7% during phase 1 (1.5% CG) and 32.6% in the R2 in phase 2 (2% CG). These findings were similar to Meier [28], that achieved 46.3% hydrogen in batch reactors co-digesting 3% of crude glycerol and cassava wastewater. The highest methane volumetric production occurred during phase 1 (1.5% CG) in reactor R3 (306,7 L CH_4 /(m³ d)). However, the mean values from phases 1 and 3 were statistically similar ($p > 0.01$). The increase in the rate of CG over DS did not directly affect the methane production nor improve the CH_4 yields.

Despite the need to treat more significant amounts of crude glycerol due to the constant increase in worldwide production of biodiesel, the increase in CG in the influent of anaerobic reactors should be cautious due to the toxic potential. A prolonged addition of 1% or more CG (v/v) was reported by Razaviarani et al. [5] to cause reactors instability, and proportions of 3% CG led to the failure of the digester. Nghiem et al. [6] tested a pilot-scale digester with proportions of 0.63 and 3.0% CG, and they observed that the low proportion of this substrate (0.63%) boosted the methane production. Alves et al. [3], utilizing 3% of CG co-digested with sewage sludge in batch reactors, also observed the inhibitory effect in the methanogenesis. Although the instabilities were caused by the increase in the percentage of crude glycerol to 3% in the present study, the HARFB reactors R3 and R4 overcame the toxicity effect by maintaining an average methane production of 82.16 ± 45.32 and 22.47 ± 23.75 L CH_4 /(m³ d), respectively.

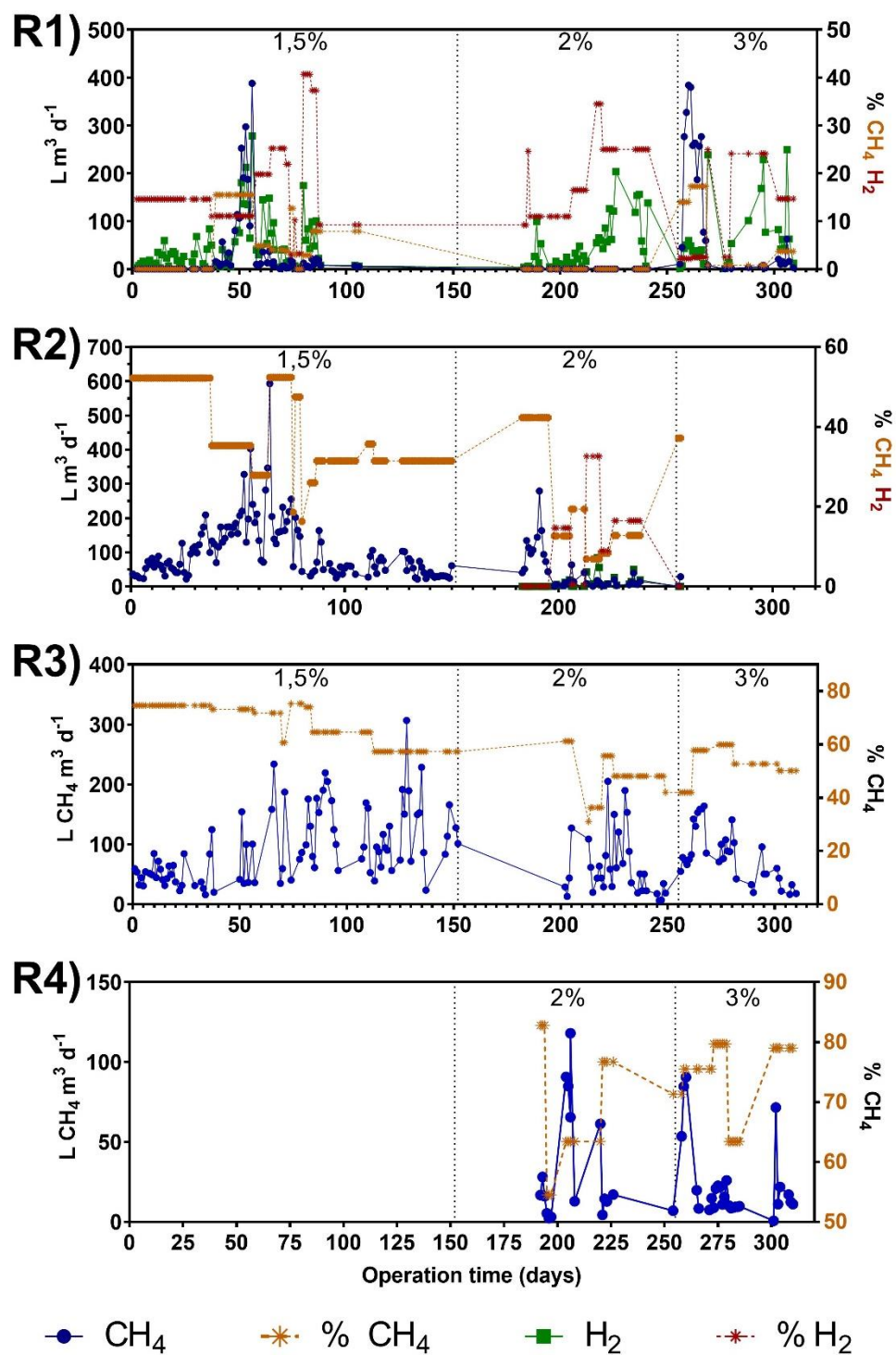


Figure IV.3 - Daily volumetric methane and hydrogen production and percentual of CH_4 e H_2 in the biogas of reactors R1, R2, R3, and R4 during the phases 1 (1.5% CG), 2 (2% CG), and 3 (3% CG).

The fermentation and methanogenesis occur in two different pH ranges, making it more challenging to treat wastes as CG from biodiesel production with a higher organic matter concentration in the same reactor. Two-stage treatments are feasible options since they can solve problems such as different growth rates of fermentative bacteria ($\mu_{\max}=0.14$ to $0.33/\text{h}$) from methanogenic archaea ($\mu_{\max}=0.017/\text{h}$) [29] by the possibility of applying distinct HRT and OLR to stage in different reactors. The sequential increase in the diameters of the four in-series reactors succeeded in maximizing this speciation of the microbiota, respecting the different growth rates, with advantages such as the continuous production of H_2 and the removal of the produced VFA being converted to CH_4 .

3.3 Volatile Fatty Acids and 1,3-Propanediol generation

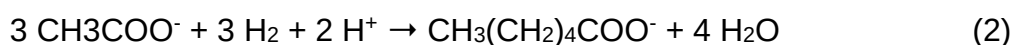
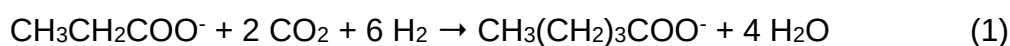
Ethanol in the influent of reactor R1 was generated due to an initial fermentation. Methanol concentrations of 42 ± 9 , 94 ± 124 , and 66 ± 9 mg/L were observed in the R1 influent in phases 1 (1.5% CG), 2 (2% CG), and 3 (3% CG), respectively. Methanol is a common residue from the biodiesel production process, and it had no toxic effect on the microbiota. The high VFA produced in all reactors was propionic acid (HPa), reaching a production peak of (g/L) 3.1 in reactor R1, 3.2 in R2, and 2.0 in R3 during phase 3 (3% CG) (**Figure IV.4**).

The acid profile can indicate the stress imposed on the microbiota with the rise in the crude glycerol amount in the influent since the propionic and butyric acid bacteria can thrive when high organic loading rates are imposed on the mixed cultures [30]. High HPa productions lead to its accumulation in the reactor since its conversion to methane is an endothermic reaction that requires greater energy consumption [8]. The output of HPa in the effluent of the reactors confirmed it. Meier et al. reported high HPa production in batch reactors, with 3% of crude glycerol co-digested with cassava wastewater [28]. The authors also reported a decrease in the HPa production after 48h, which could be observed in the same behavior in the present study, especially in reactor R3 (**Figure IV.4**).

The HPa/HAc ratio of reactor R3 was 5.2 and 9.4 for phases 2 (2% CG) and 3 (3% CG), respectively. Considering single-phase reactors, the ratio of HPa/HAc higher than 1.4 or if the value of HPa is higher than 1000 mg/L could imply a process disturbance [31,

32]. The inhibitory effect of HPa over methanogens with reduced production of HAc resulted in a lower ($p<0.01$) CH_4 production in phases 2 (2% CG) and 3 (3% CG).

High valeric acid (HVa) production is not usually reported in reactors fed with CG. HVa is related to low hydrogen production since its gets through the conversion of HAc, HPa, and H_2 , according to equations 1 and 2 [33]. Saady [34] verified HVa production in reactors with mixed cultures, becoming a challenge to achieve high H_2 yields. The high HVa production obtained in the present study could justify the daily hydrogen production fluctuation in R1 and R2 reactors, preventing the achievement of higher H_2 yield.



The production of 1,3-Propanediol (1,3-PD) during the three phases was summarized in Supplementary material (**S. Table IV.3**). Maximal 1,3-PD production of 4,0 g/L was obtained in reactor R1 and 4,8 g/L in reactor R2 at the 3 phase (3% CG) with an OLR of 37.9 (Fig. 4). The results were comparable to Sittijunda et al. [35], who reached 5.6 g/L at a similar OLR in a UASB reactor using purified glycerol. However, the 1,3-PD productions verified in the present study were broadly higher than the batch reactors fed with CG (40 g COD/L) with a production range of 30.6 - 50.8 mg/L [2].

Phase 3 (3% CG) resulted in a high ($p<0.01$) mean 1,3-PD production (2816 ± 1136 mg/L) in reactor R1 and consequent accumulation in reactor R2 (3105 ± 1013 mg/L). The decrease in the mean value for reactor R3 in the same phase (1226 ± 840 mg/L) indicated the 1,3-PD being metabolized by the microbiota (**Figure IV.4**). However, to recover produced 1,3-PD totally at the HARFB in-series system would be necessary to implement it after the reactor R2. The recovery of 1,3-PD from fermentation and conversion of the salts to high-added value by-products is already described. The process proposing bipolar membrane electrodialysis, acid crystallization, and base recycling for fermentation could reach 98.66% efficiency [36].

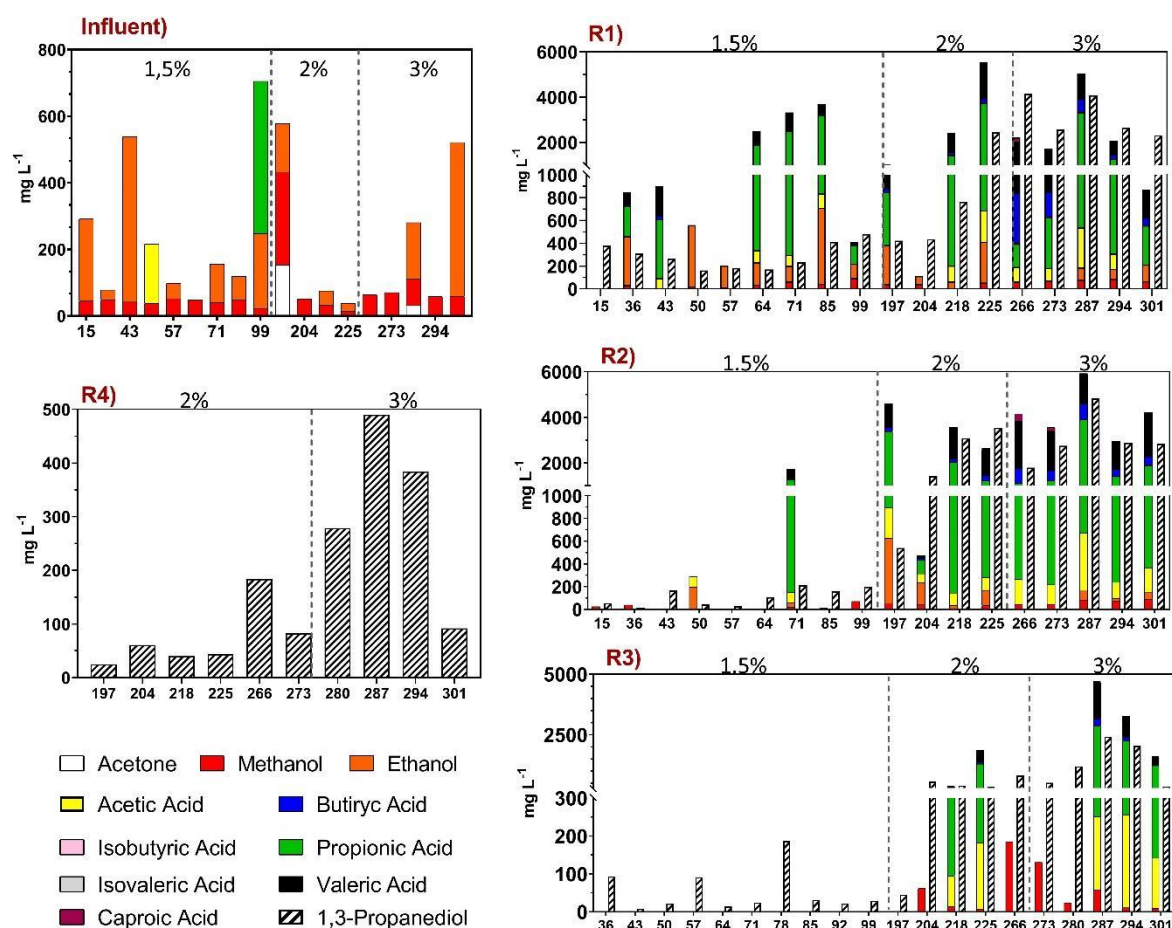


Figure IV.4 - Alcohols, volatile fatty acids, and 1,3-Propanediol generation in the influent and effluents of reactors R1, R2, R3, and R4 during the phases 1 (1.5% CG), 2 (2% CG), and 3 (3% CG).

3.4 Microbial Characterization

The strategy of segmenting anaerobic digestion in-series reactors aims to specialize the microbiota of each reactor, making these microbial communities resistant to the application of higher organic loads and preventing the toxic effect that CG can have when applied in larger quantities. At the end of phase 3 (3% CG), the impact of the high CG amount in reactor R1 could be observed by the lower richness than in reactor R4 (**Table IV.2**). Regardless, the R1 H-Index was lower (4.98) than the R2, R3, and R4. This result was higher than batch reactors fed with pure glycerol presented by Paesi [37], with an H-Index range of 1.32 – 2.90. The pistoned flow could create different sections inside the same reactor, leading it to advantage in enriching microbiota species inside HARFB.

The richness in the population of the anaerobic sludge could promote resistance to adverse conditions such as acid shock or potentially toxic effects in the influent. However, it could also cause low H₂ production in the fermentative reactor. Palomo-Briones et al. [38] observed in continuous stirred-tank reactors fed with agave bagasse that communities with low microbial diversity (Shannon index 0.5–1.68) were responsible for high hydrogen production performance from enzymatic hydrolysates of agave bagasse. It could be related to the disadvantage of having different microorganisms consuming the H₂ produced.

Table IV.2 - Alpha diversity in the sludge samples of reactors R1, R2, R3, and R4 during the phases 1 (1.5% CG) and 3 (3% CG)

Phases	R1	R2	R3	R4
	H-Index			
Phase 1 (1.5% CG)	6.167	6.843	6.744	-
Phase 3 (3% CG)	4.982	6.015	6.035	6.421
Phases	Observed Species			
	R1	R2	R3	R4
Phase 1 (1.5% CG)	1329	1238	1232	-
Phase 3 (3% CG)	681	741	753	988

Selenomonadales was the most abundant order identified from the Bacteria Domain in all phases of the reactors R1 and R3. However, reactor R2 showed reverse behavior, with the relative abundance of *Selenomonadales* dropping from 29.10% to 6.70% after the increase in the CG feeding. *Selenomonadales* are non-spore-forming bacteria that produce lactic, propionic, and acetic acids [39]. Since some *Selenomonadales* consume H₂ to generate fermentative products, their presence justifies propionic acid's high production and low H₂ yields.

Within the Firmicutes phylum, the *Megaesphaera* genus represented 67% of *Selenomonadales* in reactor R3. They are non-sporing bacteria, strictly anaerobic, and mostly reported as hydrogen and ethanol producers [40]. Even though they were the most predominant order in reactor R3 with no H₂ production observed.

The order *Anaerolineales* was observed in all reactors, and it is usually reported as an excellent adhesive matrix for cell-cell aggregation [41]. Its capacity could promote an essential role in the HARFB reactors helping to immobilize the biomass and avoiding wash-outs. The class *Anaerolineae* was identified in reactors R2, R3, and R4. Inside this class, *Longilinea arvoryzae*, a filamentous bacteria, was isolated from a methanogenic propionate-degrading reactor [41]. Probably, anaerobic bacteria from this class could have played a vital role in degrading HPa accumulated in the reactors in the present study.

A wide range of microorganisms belonging to *Klebsiella*, *Clostridium*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, and *Lactobacillus* are producers of 1,3-PDO from glycerol [4]. The fermentative reactor (R1) had a significant change in its relative abundance of *Lactobacillales* from 0.87% to 22.77%, with CG increase and the highest ($p < 0.01$) 1,3-PD production. *Lactobacillus reuteri* and *L. brevis* were also described as 1,3-PD producers [42]. However, the 1,3-PD mainly produced in the first reactor was seemingly converted to HPa in the subsequent reactors. *Clostridia* species such as *Clostridium propionicum* are known for HPa production; these bacteria were reported to dominate during stress conditions such as high OLR [34].

The rise in the CG proportions caused changes in the relative abundance. The *Sphingobacteriales* order was only identified in phase 1 (1.5% CG) (**Table IV.3**). Monitoring the microbiota of a full-scale reactor fed with sewage sludge and slaughterhouse wastewater, Puig-Castellví et al. [43] reported a similar behavior with the drastic drop of *Sphingobacteriales* after 80th days, correlating with the rise of the OLR. The authors also reported a positive correlation in the relative abundance between *Sphingobacteriales* and *Methanosaeta*. *Sphingobacteriales* are degraders, and the molecules resulting from their metabolism may be used by the archaeal community, leading to the establishment of syntrophic relationships. Due to the increase in CG, the long-term operation with the high OLR can make it more difficult for some microorganisms to adapt, disturbing beneficial correlations that could improve biogas production.

Long-term reactors can impact the microbiota differently, resulting in different behaviors as the reactor's parameters, operational conditions, and influent composition are modified. The Synergistales order is usually found in long-term reactors fed with influents with high hydrocarbons concentration. They can convert long-chain fatty acids (LCFA) into VFAs [44]. The rise of the anaerobic bacteria from this order in reactor R2 could indicate a more lavish production of LCFA in reactor R1, selecting these microorganisms (**Table IV.3**). The relationship of *Synergistales* with high lipid medium was observed in semi-continuous anaerobic batch reactors fed with waste cooking oil and waste food, where even with the lipids increase, they remained at 10% of relative abundance [45]. In the present study, they played an essential role since the CG contained a large amount (228 ± 45 g/L) of biodiesel that was not recovered in the production process.

The principal orders identified within the Archaea domain were *Methanosarcinales*, *Methanomicrobiales*, and *Methanobacteriales* (**Table IV.3**). Even though CG did not cause a toxic effect in the Bacteria Domain, the long-term operation with CG amount increase made a harsh selection in the Archaea community. The methanogenesis process consists of four main pathways: CO₂ reduction, acetoclastic, methylotrophic, and methyl reduction pathways [46]. Practically all methanogens can reduce CO₂ to CH₄ with electrons derived from the oxidation of H₂ through the CO₂ reduction pathway [46]. The *Methanosarcinales* order can utilize the acetoclastic and methylotrophic pathways, whereas the species in the *Methanobacteriales* order only possess a methyl reduction pathway [47]. It could justify how *Methanosarcinales* outcome the other methanogens, lasting to extreme conditions such as pH variations and VFA accumulation.

The pH drop is not the only factor that causes Archaea Domain inhibition; even with external alkalinity, the VFA accumulation has a toxic effect on these microorganisms. Xiao et al. [48] observed that the thin filaments of *Methanothrix* offered greater surface area with higher VFAs toxicity endurance than the *Methanobacterium* rods. This behavior was reported in batch reactors with microalgal biomass with *Methanobacterium* replenished for *Methanothrix* after rising OLR from 2.3 to 8.7 g COD/(L d) [49]. In this sense, an inoculum rich in the *Methanothrix* genus for in-series reactor systems could improve microbiota resistance and boost methane production.

Table IV.3 - Relative abundance percentual of the main orders identified in the sludge samples of reactors R1, R2, R3, and R4 at the end of the phases with 1.5% and 3% of crude glycerol proportions

Order	R1		R2		R3		R4
	1.5%	3%	1.5%	3%	1.5%	3%	3%
<i>Lactobacillales</i>	0.87	22.77	1.29	3.16	0.63	1.32	0.30
<i>Thermoanaerobacterales</i>	UN	1.97	UN	1.65	UN	0.04	0.01
<i>Selenomonadales</i>	37.02	35.73	29.10	6.70	12.64	29.99	6.97
<i>Synergistales</i>	0.62	1.03	3.62	8.26	4.56	4.24	12.95
<i>Bacteroidales</i>	10.90	15.45	6.71	5.04	8.81	11.07	21.01
<i>Clostridiales</i>	11.42	10.81	22.85	20.42	19.02	22.43	11.28
<i>Cloacimonetes</i>	UN	0.04	UN	1.53	UN	2.63	9.14
<i>Enterobacteriales</i>	22.02	1.00	5.93	3.80	2.90	0.11	0.14
<i>Anaerolineales</i>	0.37	0.30	2.86	2.47	1.91	2.83	2.33
<i>Sphingobacteriales</i>	1.75	UN	0.91	UN	1.42	UN	UN
<i>Methanobacteriales</i>	0.01	UN	2.36	UN	17.36	UN	UN
<i>Methanosarcinales</i>	0.01	0.09	1.48	21.90	8.91	8.31	14.26
<i>Methanomicrobiales</i>	0.03	0.03	2.12	3.20	17.08	3.05	4.08

UN: Unidentified

Inside the *Methanosarcinales* order, the genus *Methanosarcina* went from 37% (Phase 1 - 1.5% CG) to 2% (Phase 3 - 3% CG) in reactor R2, replaced by *Methanotherix*, which went from 63% to 98%. Similar behavior was observed in reactor R3, with *Methanosarcina* decreasing from 37% to 18% and *Methanotherix* increasing from 67% to 82%. *Methanotherix* is widely reported as a dominant methanogen in mesophilic conditions [56]. Members of this genus can form methane both by acetoclastic methanogenesis and DIET-CO₂ reduction [50]. Li et al. [51] reported *Methanotherix* acid resistance during the operation of semi-continuous reactors fed with propionate. The authors observed the predominance of this genus over the other acetoclastic methanogens. The high concentration of H₂Pa during the present study could have forced the selection of these microorganisms. However, acclimatization of the inoculum with H₂Pa could be a promising acclimatization approach for HARFB anaerobic reactors in series.

CONCLUSION

The co-digestion of 3% of CG with DS efficiently generated value-added products. The gradual increase in the amount of GC and the long operation time promoted selection in the reactors' microbiota and the metabolic pathways with predominant production of propionic acid and 1,3 propanediol. The increase in the diameter of the in-series reactors and its consequent HRT elongation enabled the stratification of the biomass throughout the system. The high propionic acid production in reactors R1 and R2 decreased CH₄ conversion with CG concentrations above 1.5% in R3. The study confirmed the HARFB in-series system endurance to treat compounds with potential toxic effects for long periods indicating the possibility of tests with higher amounts of CG in this system.

Acknowledgments

This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) under Grant 407298/2018-5 and 457144/2014-9; and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) under Grant 2017/11767-1 and 2017/25329-6. The authors are also grateful to the “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil” (CAPES) – Finance Code 001.

Author Contribution

All authors contributed to the study's conception and design: Luan Vieira Adames performed material preparation, data collection, and analysis and wrote the first draft of the manuscript. Sandra Imaculada Maintinguer and Lorena Oliveira Pires made funding acquisition, advising, experimental outline, and discussion. All authors commented on previous versions of the manuscript and approved the final manuscript.

Funding

This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) under Grant 407298/2018–5 and 457144/2014–9; and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) under Grant 2017/11767–1 and 2017/25329–6. The authors are also grateful to the “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil” (CAPES) – Finance Code 001.

SUPPLEMENTARY MATERIALS

In the statistical analysis, the repetition number evaluated in each parameter of Phase 1 (1.5% CG) were 28 for COD and COD removals, OLR, pH, and Alkalinity, 26 for VFA_{total} , 16 for glycerol and glycerol removals, 79 for H_2 production in reactor R1; 130 for CH_4 production in reactor R2 and 88 for reactor R3. In Phase 2 (2% CG), the number of repetitions of the data utilized in the statistical analysis were 8 for COD and COD removals, OLR, pH, Alkalinity, and VFA_{total} , 5 for glycerol and glycerol removals, 41 for biogas production in reactor R1, 38 for reactor R2, 35 for reactor R3, and 17 for reactor R4. In Phase 3 (3% CG), the number of repetitions was 8 for COD and COD removals, OLR, pH, Alkalinity, and VFA_{total} , 7 for glycerol, and glycerol removals, 26 for biogas production in reactor R1, 31 for reactor R3 and 27 for reactor R4.

S. Table IV.1 - Mean values and statistical data of the physical-chemical parameters measured during the 1.5%, 2%, and 3% crude glycerol phases in the influent and effluents of the HARFB reactors R1, R2, R3, and R4

Parameters		1.5%		2%		3%		F statistic Prob {>F}	
pH	Influent	7.41 ± 0.32	ab	7.10 ± 0.63	b	7.69 ± 0.31	a	4.53	0.0167*
	R1	5.55 ± 0.94	a	5.06 ± 0.61	a	5.21 ± 0.26	a	1.44	0.2492 ^{NS}
	R2	7.16 ± 0.93	a	5.00 ± 0.45	b	5.00 ± 0.16	b	38.57	0.0000**
	R3	8.31 ± 0.23	a	6.59 ± 0.87	b	6.37 ± 1.21	a	39.83	0.0000**
	R4	-		7.70 ± 0.16	a	7.89 ± 0.28	a	2.75	0.1195 ^{NS}
Total Alkalinity [mg CaCO ₃ /L]	Influent	1830 ± 879	b	1707 ± 924	b	3207 ± 1146	a	7.39	0.0018**
	R1	1614 ± 1283	a	1129 ± 642	a	2172 ± 752	a	1.74	0.1876 ^{NS}
	R2	4581 ± 1702	a	1171 ± 615	b	2444 ± 990	b	19.82	0.0000**
	R3	5493 ± 1174	a	4827 ± 2355	a	6246 ± 2420	a	1.42	0.2544 ^{NS}
	R4	-		4563 ± 987	b	6786 ± 1137	a	17.44	0.0009**
VFA _{total} [mg/L]	Influent	353 ± 195	b	459 ± 127	ab	578 ± 193	a	4.86	0.0130*
	R1	3414 ± 1430	a	2567 ± 1239	a	3922 ± 1643	a	1.77	0.1839 ^{NS}
	R2	5062 ± 1555	a	3007 ± 1232	b	4726 ± 1898	a	3.97	0.0286*
	R3	375 ± 164	c	5539 ± 3046	b	7933 ± 1905	a	89.03	0.0000**
	R4	-		1055 ± 748	b	3234 ± 787	a	32.22	0.0001**
COD [mg/L]	Influent	18057 ± 2140	c	26751 ± 2210	b	37848 ± 3716	a	206.04	0.0000**
	R1	15601 ± 2676	c	26060 ± 2056	b	36008 ± 3737	a	180.35	0.0000**
	R2	12022 ± 6054	c	25352 ± 4752	b	34300 ± 1599	a	62.40	0.0000**
	R3	326 ± 146	c	6612 ± 4100	b	23159 ± 6679	a	154.94	0.0000**
	R4	-		803 ± 237	a	950 ± 50	a	2.94	0.1084 ^{NS}
COD Removal [%]	R1	13.79 ± 8.87	a	2.83 ± 3.57	b	6.19 ± 6.81	ab	7.44	0.0017**
	R2	36.83 ± 21.67	a	9.51 ± 8.01	b	8.85 ± 8.63	b	11.69	0.0001**
	R3	98.16 ± 0.83	a	75.68 ± 14.75	b	37.78 ± 19.92	c	110.24	0.0000**
	R4	-		96.77 $\pm$	a	97.28 $\pm$	a	2.93	0.1091 ^{NS}
Glycerol [mg/L]	Influent	3522 ± 507	a	1330 ± 885	b	2296 ± 858	b	22.90	0.0000**
	R1	294 ± 208	a	82 ± 53	a	174 ± 171	a	2.94	0.0715 ^{NS}
	R2	10 ± 13	b	60 ± 63	a	50 ± 56	ab	4.53	0.0210*
	R3	1 ± 2	b	5 ± 5	a	1 ± 1	ab	4.58	0.0202*
	R4	-		0 ± 0	b	3 ± 1	a	7.11	0.0286*
Glycerol Removal [%]	R1	86.44 ± 23.78	a	90.68 ± 6.28	a	89.89 ± 10.20	a	0.13	0.8746 ^{NS}
	R2	88.59 ± 16.26	a	44.34 ± 32.47	b	65.68 ± 26.41	ab	8.35	0.0017**
	R3	90.03 ± 27.08	a	88.38 ± 9.20	a	65.26 ± 46.13	a	1.62	0.2174 ^{NS}
	R4	-		47.56 ± 39.90	a	13.30 ± 19.11	a	3.39	0.0904 ^{NS}

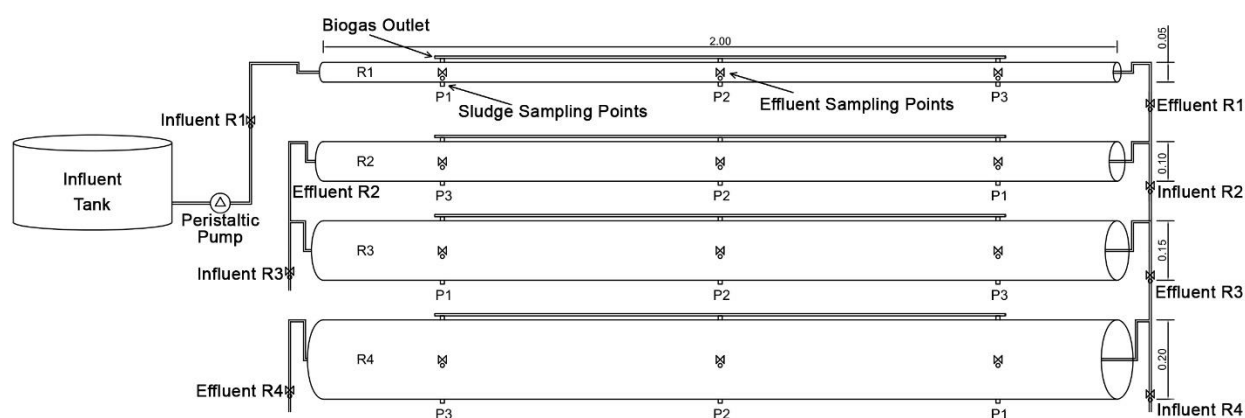
VFA: Volatile Fatty Acids. COD: Chemical Oxygen Demand. OLR: Organic Loading Rate.

Significance level: ** 1%, * 5%, ^{NS} not significant. $\pm$ Standard Deviation. Equal lowercase letters indicate that at the 5% significance level, there is no difference between the means. According to Tukey's test, different lowercase letters in the same row indicate a statistically significant difference between the mean values of the 1.5%, 2%, and 3% crude glycerol phases.

S. Table IV.2 - Mean values and statistical data of the Organic Loading Rate (OLR) applied and production of biogas measured during the 1.5%, 2%, and 3% crude glycerol phases in the influent and effluents of the HARFB reactors R1, R2, R3, and R4

Parameters		1.5%		2%		3%		F statistic	Prob {>F}
OLR [kg COD/(m ³ d)]	R1	18.06 ±2.14	c	26.75 ±2.21	b	37.85 ±3.72	a	206.04	0.0000**
	R2	9.12 ±1.56	c	15.24 ±1.20	b	21.06 ±2.19	a	180.35	0.0000**
	R3	3.59 ±1.81	c	7.57 ±1.42	c	10.24 ±0.48	a	62.40	0.0000**
	R4	-		0.54 ±0.57	b	2.29 ±1.00	a	18.33	0.0008**
H ₂ [%]	R1	16.32 ±8.77	a	18.25 ±8.37	a	10.75 ±9.18	b	6.10	0.0029**
	R2	0.38 ±0.9	b	10.01 ±10.6	a	-	-	65.06	0.0000**
CH ₄ [%]	R1	5.31 ±6.12	a	0.68 ±3.05	b	8.18 ±7.33	a	15.43	0.0000**
	R2	39.30 ±10.27	a	22.94 ±14.76	b	-	-	79.50	0.0000**
	R3	68.30 ±7.40	a	47.99 ±7.81	c	53.68 ±5.79	b	119.88	0.0000**
	R4	-		68.84 ±10.10	b	74.65 ±6.46	a	5.43	0.0246*
H ₂ Production [L H ₂ /(m ³ d)]	R1	44.70 ±53.40	a	48.94 ±51.68	a	70.66 ±70.61	a	2.10	0.1264 ^{NS}
	R2	2.56 ±6.71	b	10.64 ±18.54	a	-	-	10.64	0.0015**
CH ₄ Production [L CH ₄ /(m ³ d)]	R1	27.58 ±68.30	b	1.36 ±7.21	b	112.25 ±137.94	a	17.49	0.0000**
	R2	103.14 ±85.88	a	44.71 ±59.72	b	-	-	15.38	0.0001**
	R3	92.16 ±60.6	a	62.96 ±51.25	b	82.16 ±45.32	ab	3.38	0.0369*
	R4	-		32.94 ±36.41	a	22.47 ±23.75	a	1.34	0.2541 ^{NS}

Significance level: ** 1%, * 5%, ^{NS} not significant. ± Standard Deviation. Equal lowercase letters indicate that at the 5% significance level, there is no difference between the means. According to Tukey's test, different lowercase letters in the same row indicate a statistically significant difference between the mean values of the 1.5%, 2%, and 3% crude glycerol phases.



S. Fig. IV.1 - Schematic representation of four horizontal anaerobic reactors with fixed-bed (HARFB) in-series (R1, R2, R3, and R4), Influent, Effluent, Biogas outlets, Sludge sampling points (P1, P2, and P3)

S. Table IV.3 - Mean values and statistical data of alcohols, Volatile Fatty Acids, and 1,3-Propanediol analyzed during the 1.5%, 2%, and 3% crude glycerol phases in the influent and effluents of the HARFB reactors R1, R2, R3, and R4

Parameters		1.5%		2%		3%		F statistic Prob {>F}	
Acetone	Influent	0 ±0	a	38 ±77	a	6 ±14	a	1.71	0.2149 ^{NS}
Methanol	Influent	42 ±16	a	94 ±124	a	66 ±9	a	1.20	0.3287 ^{NS}
	R1	36 ±29	b	35 ±23	b	75 ±10	a	4.80	0.0245*
	R2	20 ±24	b	31 ±21	ab	65 ±20	a	7.30	0.0061**
	R3	0 ±	a	67 ±	a	46 ±	a	1.96	0.1803 ^{NS}
Ethanol	Influent	123 ±159	a	53 ±64	a	127 ±202	a	0.39	0.6814 ^{NS}
	R1	254 ±237	a	209 ±164	a	69 ±65	a	1.54	0.2459 ^{NS}
	R2	26 ±64	b	235 ±238	a	33 ±37	ab	4.79	0.0246*
Acetic Acid	Influent	18 ±57	a	0 ±0	a	0 ±0	a	0.47	0.6346 ^{NS}
	R1	46 ±55	a	104 ±132	a	144 ±128	a	1.72	0.2120 ^{NS}
	R2	21 ±41	b	140 ±85	ab	253 ±147	a	11.05	0.0011**
	R3	0 ±0	b	64 ±83	ab	114 ±111	a	4.51	0.0280*
Propionic Acid	Influent	46 ±145	a	0 ±0	a	0 ±0	a	0.47	0.6346 ^{NS}
	R1	787 ±983	a	1193 ±1350	a	949 ±1070	a	0.19	0.8250 ^{NS}
	R2	123 ±368	b	1344 ±1037	a	1539 ±971	a	7.47	0.0056**
	R3	0 ±0	b	335 ±530	ab	1134 ±1169	a	4.88	0.0221*
Isobutyric Acid	R1	2 ±5	a	3 ±6	a	4 ±6	a	0.22	0.8029 ^{NS}
	R2	1 ±4	b	11 ±8	a	15 ±2	a	15.86	0.0002**
	R3	0 ±0	b	4 ±8	ab	8 ±8	a	3.72	0.0471*
Butyric Acid	R1	20 ±22	b	89 ±93	b	304 ±211	a	9.46	0.0022**
	R2	4 ±13	b	134 ±86	b	485 ±170	a	40.45	0.0000**
	R3	0 ±0	b	17 ±27	ab	90 ±118	a	3.49	0.0453*
Isovaleric Acid	R2	1 ±2	b	8 ±10	a	4 ±4	ab	3.74	0.0482*
	R3	0 ±0	a	3 ±7	a	6 ±9	a	1.88	0.1846 ^{NS}
Valeric Acid	R1	229 ±275	a	626 ±718	a	777 ±382	a	2.99	0.0808 ^{NS}
	R3	0 ±0	b	125 ±220	ab	531 ±639	a	3.90	0.0417*
Caproic Acid	R1	5 ±6	b	5 ±4	ab	61 ±71	a	4.16	0.0366*
	R2	1 ±3	b	19 ±14	ab	115 ±120	a	5.70	0.0144*
	R3	0 ±0	b	4 ±5	ab	14 ±15	a	4.67	0.0252*
1,3-Propanediol	R1	285 ±109	b	1015 ±962	b	2816 ±1136	a	22.01	0.0000**
	R2	106 ±73	c	1423 ±1170	b	3105 ±1013	a	30.98	0.0000**
	R3	52 ±56	b	342 ±216	b	1226 ±840	a	12.05	0.0006**
	R4	-		42 ±15	b	252 ±163	a	6.28	0.0365*

Units: mg/L. Significance level: ** 1%, * 5%, ^{NS} not significant. ± Standard Deviation. Equal lowercase letters indicate that at the 5% significance level, there is no difference between the means. According to Tukey's test, different lowercase letters in the same row indicate a statistically significant difference between the mean values of the 1.5%, 2%, and 3% crude glycerol phases.

REFERENCES

1. Kumar LR, Yellapu SK, Tyagi RD, Zhang X (2019) A review on variation in crude glycerol composition, bio-valorization of crude and purified glycerol as carbon source for lipid production. *Bioresour Technol* 293:122155. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122155>
2. Rodrigues CV, Oliveira Santana K, Nespeca MG, et al (2020) Energy valorization of crude glycerol and sanitary sewage in hydrogen generation by biological processes. *Int J Hydrogen Energy* 45:11943–11953. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.02.168>
3. Alves IRFS, Mahler CF, Oliveira LB, et al (2020) Assessing the use of crude glycerol from biodiesel production as an alternative to boost methane generation by anaerobic co-digestion of sewage sludge. *Biomass and Bioenergy* 143:. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105831>
4. Veras STS, Rojas P, Florencio L, et al (2019) Production of 1,3-propanediol from pure and crude glycerol using a UASB reactor with attached biomass in silicone support. *Bioresour Technol* 279:140–148. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.01.125>
5. Razaviarani V, Buchanan ID, Malik S, Katalambula H (2013) Pilot scale anaerobic co-digestion of municipal wastewater sludge with biodiesel waste glycerin. *Bioresour Technol* 133:206–212. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.101>
6. Nghiem LD, Nguyen TT, Manassa P, et al (2014) Co-digestion of sewage sludge and crude glycerol for on-demand biogas production. *Int Biodeterior Biodegrad* 95:160–166. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.04.023>
7. Aguilar-Aguilar F, Adaya L, Godoy-Lozano EE, et al (2021) Anaerobic co-digestion of raw glycerol and swine manure: microbial communities. *Biomass Convers Biorefinery*. <https://doi.org/10.1007/s13399-021-01914-y>
8. Li X, Shimizu N (2021) Effects of lipase addition, hydrothermal processing, their combination, and co-digestion with crude glycerol on food waste anaerobic digestion. *Fermentation* 7:. <https://doi.org/10.3390/fermentation7040284>
9. Adames LV, Jacobus AP, Sakamoto IK, et al (2022) Bioenergy Recovery from Anaerobic Co-Digestion of Crude Glycerol and Domestic Sewage In-Series Reactor: Microbial Characterization and System Performance. *Bioenergy Res*. <https://doi.org/10.1007/s12155-022-10417-1>
10. Hussain A, Kumar P, Mehrotra I (2010) Nitrogen biotransformation in anaerobic treatment of phenolic wastewater. *Desalination* 250:35–41.

<https://doi.org/10.1016/j.desal.2009.09.018>

11. Zhou H, Jiang J, Zhao Q, et al (2022) Effects of organic loading rates on high-solids anaerobic digestion of food waste in horizontal flow reactor: Methane production, stability and mechanism. *Chemosphere* 293:133650. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.133650>
12. Oliveira GHD, Santos-Neto AJ, Zaiat M (2017) Removal of the veterinary antimicrobial sulfamethazine in a horizontal-flow anaerobic immobilized biomass (HAIB) reactor subjected to step changes in the applied organic loading rate. *J Environ Manage* 204:674–683. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.09.048>
13. Athanasoulia E, Melidis P, Aivasidis A (2014) Co-digestion of sewage sludge and crude glycerol from biodiesel production. *Renew Energy* 62:73–78. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2013.06.040>
14. Lee JH, Jung MY, Oh MK (2018) High-yield production of 1,3-propanediol from glycerol by metabolically engineered *Klebsiella pneumoniae*. *Biotechnol Biofuels* 11:1–13. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1100-5>
15. Yun J, Yang M, Magocha TA, et al (2018) Production of 1,3-propanediol using a novel 1,3-propanediol dehydrogenase from isolated *Clostridium butyricum* and co-biotransformation of whole cells. *Bioresour Technol* 247:838–843. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.180>
16. Ito T, Nakashimada Y, Senba K, et al (2005) Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. *J Biosci Bioeng* 100:260–265. <https://doi.org/10.1263/jbb.100.260>
17. Krasňan V, Plž M, Marr AC, et al (2018) Intensified crude glycerol conversion to butanol by immobilized *Clostridium pasteurianum*. *Biochem Eng J* 134:114–119. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.03.005>
18. Varrone C, Rosa S, Fiocchetti F, et al (2013) Enrichment of activated sludge for enhanced hydrogen production from crude glycerol. *Int J Hydrogen Energy* 38:1319–1331. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.11.069>
19. APHA, AWWA, WEF (2005) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21st ed. American Public Health Association, Washington DC, USA.
20. Adorno, Maria Angela Tallarico, Julia S. Hirasawa and MBAV, Adorno MAT, Hirasawa JS, Varesche MBA (2014) Development and validation of two methods to quantify volatile acids (C2-C6) by GC/FID: headspace (automatic and manual) and liquid-liquid extraction (LLE). *Am J Anal Chem* 5:406. <https://doi.org/10.4236/ajac.2014.57049>

21. Egoburo DE, Diaz Peña R, Kolender A, Pettinari MJ (2017) Optimization and Validation of a GC–FID Method for Quantitative Determination of 1,3-Propanediol in Bacterial Culture Aqueous Supernatants Containing Glycerol. *Chromatographia* 80:1121–1127. <https://doi.org/10.1007/s10337-017-3310-6>
22. Griffiths RI, Whiteley AS, O'Donnell AG, Bailey MJ (2000) Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA- and rRNA-based microbial community composition. *Appl Environ Microbiol* 66:5488–5491. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.12.5488-5491.2000>
23. Callaghan FJ, Wase DAJ, Thayanithy K, Forster CF (2002) Continuous co-digestion of cattle slurry with fruit and vegetable wastes and chicken manure. *Biomass and Bioenergy* 22:71–77. [https://doi.org/10.1016/S0961-9534\(01\)00057-5](https://doi.org/10.1016/S0961-9534(01)00057-5)
24. Nualsri C, Kongjan P, Reungsang A (2016) Direct integration of CSTR-UASB reactors for two-stage hydrogen and methane production from sugarcane syrup. *Int J Hydrogen Energy* 41:17884–17895. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.07.135>
25. Sreethawong T, Chatsiriwatana S, Rangsunvigit P, Chavadej S (2010) Hydrogen production from cassava wastewater using an anaerobic sequencing batch reactor: Effects of operational parameters, COD:N ratio, and organic acid composition. *Int J Hydrogen Energy* 35:4092–4102. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.02.030>
26. Vasconcelos EAF, Santaella ST, Viana MB, et al (2019) Composition and ecology of bacterial and archaeal communities in anaerobic reactor fed with residual glycerol. *Anaerobe* 59:145–153. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2019.06.014>
27. Jiraprasertwong A, Seneesrisakul K, Pornmai K, Chavadej S (2020) High methanogenic activity of a three-stage UASB in relation to the granular sludge formation. *Sci Total Environ* 724:138145. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138145>
28. Meier TRW, Cremonez PA, Maniglia TC, et al (2020) Production of biohydrogen by an anaerobic digestion process using the residual glycerol from biodiesel production as additive to cassava wastewater. *J Clean Prod* 258:. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.120833>
29. Lovato G, Albanez R, Ruggero LS, et al (2020) Energetic feasibility of a two-stage anaerobic digestion system compared to a single-stage system treating whey and glycerin. *Biochem Eng J* 161:107653. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107653>
30. Oh SE, Iyer P, Bruns MA, Logan BE (2004) Biological hydrogen production using

a membrane bioreactor. *Biotechnol Bioeng* 87:119–127.
<https://doi.org/10.1002/bit.20127>

31. Cibis KG, Gneipel A, König H (2016) Isolation of acetic, propionic and butyric acid-forming bacteria from biogas plants. *J Biotechnol* 220:51–63.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.01.008>
32. Weiland P (2010) Biogas production: Current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* 85:849–860. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2246-7>
33. Rosa PRF, Gomes BC, Varesche MBA, Silva EL (2016) Characterization and antimicrobial activity of lactic acid bacteria from fermentative bioreactors during hydrogen production using cassava processing wastewater. *Chem Eng J* 284:1–9.
<https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.08.088>
34. Saady NMC (2013) Homoacetogenesis during hydrogen production by mixed cultures dark fermentation: Unresolved challenge. *Int J Hydrogen Energy* 38:13172–13191. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.07.122>
35. Sittijunda S, Reungsang A (2020) Valorization of crude glycerol into hydrogen, 1,3-propanediol, and ethanol in an up-flow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor under thermophilic conditions. *Renew Energy* 161:361–372.
<https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.07.053>
36. Wu RC, Xu YZ, Song YQ, et al (2011) A novel strategy for salts recovery from 1,3-propanediol fermentation broth by bipolar membrane electrodialysis. *Sep Purif Technol* 83:9–14. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2011.06.028>
37. Paesi S, Schiavenin A, Almeida LG, et al (2022) Comparison of two different kinds of seed sludge and characterization of microorganisms producing hydrogen and soluble metabolites from raw glycerol. *Brazilian J Chem Eng*.
<https://doi.org/10.1007/s43153-021-00212-4>
38. Palomo-Briones R, Montoya-Rosales J de J, Razo-Flores E (2021) Advances towards the understanding of microbial communities in dark fermentation of enzymatic hydrolysates: Diversity, structure and hydrogen production performance. *Int J Hydrogen Energy* 46:27459–27472.
<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2021.06.016>
39. Luo Y, Zhang H, Salerno M, et al (2008) Organic loading rates affect composition of soil-derived bacterial communities during continuous, fermentative biohydrogen production. *Int J Hydrogen Energy* 33:6566–6576.
<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.08.047>
40. Cabrol L, Marone A, Tapia-Venegas E, et al (2017) Microbial ecology of

fermentative hydrogen producing bioprocesses: Useful insights for driving the ecosystem function. *FEMS Microbiol Rev* 41:158–181.
<https://doi.org/10.1093/femsre/fuw043>

41. Xia Y, Wang Y, Wang Y, et al (2016) Cellular adhesiveness and cellulolytic capacity in *Anaerolineae* revealed by omics-based genome interpretation. *Biotechnol Biofuels* 9:1–13. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0524-z>
42. Chilakamarry CR, Mimi Sakinah AM, Zularisam AW, et al (2021) Technological perspectives for utilisation of waste glycerol for the production of biofuels: A review. *Environ Technol Innov* 24:101902.
<https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.101902>
43. Puig-Castellví F, Midoux C, Guenne A, et al (2022) Metataxonomics, metagenomics and metabolomics analysis of the influence of temperature modification in full-scale anaerobic digesters. *Bioresour Technol* 346:.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126612>
44. Jin Y, Cai F, Song C, et al (2022) Degradation of biodegradable plastics by anaerobic digestion: Morphological, micro-structural changes and microbial community dynamics. *Sci Total Environ* 834:155167.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.155167>
45. He J, Wang X, Yin X bo, et al (2018) Insights into biomethane production and microbial community succession during semi-continuous anaerobic digestion of waste cooking oil under different organic loading rates. *AMB Express* 8:.
<https://doi.org/10.1186/s13568-018-0623-2>
46. Mand TD, Metcalf WW (2019) Energy Conservation and Hydrogenase Function in Methanogenic Archaea, in Particular the Genus *Methanosarcina* . *Microbiol Mol Biol Rev* 83:.
<https://doi.org/10.1128/mmb.00020-19>
47. Xu R ze, Fang S, Zhang L, et al (2021) Distribution patterns of functional microbial community in anaerobic digesters under different operational circumstances: A review. *Bioresour Technol* 341:125823.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125823>
48. Xiao X, Shi W, Huang Z, et al (2017) Process stability and microbial response of anaerobic membrane bioreactor treating high-strength kitchen waste slurry under different organic loading rates. *Int Biodeterior Biodegrad* 121:35–43.
<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.03.012>
49. Magdalena JA, Greses S, González-Fernández C (2020) Anaerobic degradation of protein-rich biomass in an UASB reactor: Organic loading rate effect on product output and microbial communities dynamics. *J Environ Manage* 274:.

<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111201>

50. Jiang J, Wu P, Sun Y, et al (2020) Comparison of microbial communities during anaerobic digestion of kitchen waste: Effect of substrate sources and temperatures. *Bioresour Technol* 317:124016. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124016>
51. Li Y, Sun Y, Li L, Yuan Z (2018) Acclimation of acid-tolerant methanogenic propionate-utilizing culture and microbial community dissecting. *Bioresour Technol* 250:117–123. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.11.034>

CAPÍTULO V

Este capítulo tem a finalidade de destacar pontos importantes dos artigos publicados, apresentados em **Capítulo II** e **Capítulo III**, e no artigo submetido apresentado no **Capítulo IV**, discutindo as principais descobertas do projeto de pesquisa como um todo.

1 RESULTADOS COMPLEMENTARES

Nesta sessão serão apresentados os resultados dos artigos dos capítulos III e IV, com nova análise estatística, com o objetivo de comparar todos os dados obtidos durante o projeto.

1.2 Carga Orgânica Volumétrica (COV)

Com a alteração do TDH (tempo de detenção hidráulica) após a partida, as COVs dos ensaios 1 e 2 foram as menores ($p < 0,01$) aplicadas. A maior COV imposta ao reator R1 se deu no ensaio 4 (3% de glicerol), assim como maior valor de DQO (**Tabela V.1**).

Tabela V.1 - Valores médios da carga orgânica volumétrica (COV), demanda química de oxigênio total (DQO) no afluente e nos efluentes dos reatores anaeróbios horizontais de leito fixo (R1, R2, R3 e R4) instalados em série, durante as fases de: Partida (1% glicerol bruto), Ensaio 1 (1% Glicerol Bruto), Ensaio 2 (1,5% Glicerol Bruto), Ensaio 3 (2% Glicerol Bruto) e Ensaio 4 (3% Glicerol Bruto).

Parâmetros		Ensaio						Teste F	Prob {>F}
		Partida	1	2	3	4			
COV (g DQO (L d) ⁻¹)	R1	25,40 b	13,05 c	18,06 c	26,75 b	37,85 a	26,07	0,0000**	
	R2	5,68 d	6,28 d	9,12 c	15,24 b	21,06 a	148,57	0,0000**	
	R3	2,64 c	2,67 c	3,59 c	7,57 b	10,24 a	68,80	0,0000**	
	R4	-	-	-	0,54 b	2,29 a	18,33	0,0008**	
DQO (mg L ⁻¹)	Afluente	10567 e	13045 d	18057 c	26751 b	37848 a	149,44	0,0000**	
	R1	9717 d	10744 d	15601 c	26060 b	36008 a	148,57	0,0000**	
	R2	8852 c	8933 c	12022 c	25352 b	34300 a	68,80	0,0000**	
	R3	6588 b	798 c	326 c	6612 b	23159 a	101,56	0,0000**	
	R4	-	-	-	803 a	950 a	2,94	0,1084 ^{NS}	

Letras iguais na mesma linha indicam que, no nível de 5% de significância, não houve diferença entre as médias. ** - Significativo a 1% de probabilidade ($p < 0,01$); * - Significativo a 5% de probabilidade ($p < 0,05$); ^{NS} - não significativo ($p > 0,05$).

1.2 Parâmetros operacionais

As médias de pH, ácidos graxos voláteis totais (AGV) e alcalinidade parcial (AP) alcalinidade total (AT), estão apresentadas na **Tabela V.2** junto com o teste estatístico para comparação de diferença significativa entre os ensaios.

Tabela V.2 - Valores médios de pH, ácidos graxos voláteis totais (AGV), alcalinidade parcial (AP) e alcalinidade total (AT) no afluente e efluentes dos reatores anaeróbios horizontais de leito fixo (R1, R2, R3 e R4) instalados em série durante as fases de: Partida (1% glicerol bruto), Ensaio 1 (1% Glicerol Bruto), Ensaio 2 (1,5% Glicerol Bruto), Ensaio 3 (2% Glicerol Bruto) e Ensaio 4 (3% Glicerol Bruto).

Parâmetros		Ensaio								Teste F	Prob {>F}
		Partida	1	2	3	4					
pH	Afluente	6,34 b	7,18 a	7,41 a	7,10 a	7,69 a				14,22	0,0000**
	R1	4,48 b	4,89 ab	5,55 a	5,06 ab	5,21 ab				7,82	0,0000**
	R2	6,40 b	7,30 a	7,16 ab	5,00 c	5,00 c				19,56	0,0000**
	R3	6,69 b	8,36 a	8,31 a	6,59 b	6,37 b				22,83	0,0000**
	R4	-	-	-	7,70 a	7,89 a				2,75	0,1195 ^{NS}
AGV (mg L ⁻¹)	Afluente	386 a	289 a	353 a	459 a	578 a				1,59	0,1861 ^{NS}
	R1	1096 b	2675 a	3414 a	2567 a	3922 a				18,32	0,0000**
	R2	2388 c	3885 ab	5062 a	3007 bc	4726 a				12,44	0,0000**
	R3	2748 c	636 d	375 d	5539 b	7933 a				62,11	0,0000**
	R4	-	-	-	1055 b	3234 a				32,22	0,0001**
AP (mg L ⁻¹)	Afluente	175 c	1069 b	1372 b	1228 b	2635 a				27,12	0,0000**
	R1	16 a	0 a	209 a	82 a	0 a				3,05	0,0215*
	R2	1213 ab	1236 ab	1662 a	10 b	0 b				5,95	0,0003**
	R3	1500 b	4342 a	4279 a	1226 b	1386 b				22,09	0,0000**
	R4	-	-	-	3194 a	3803 a				1,32	0,2706 ^{NS}
AT (mg L ⁻¹)	Afluente	341 c	1557 b	1830 b	1707 b	3207 a				23,55	0,0000**
	R1	95 c	979 bc	1614 a	1129 ab	2172 a				15,83	0,0000**
	R2	2905 bc	3889 ab	4581 a	1171 c	2444 bc				7,44	0,0000**
	R3	3358 b	5719 a	5493 a	4827 ab	6246 a				5,01	0,0012**
	R4	-	-	-	4563 b	6787 a				17,44	0,0009**

Letras iguais na mesma linha indicam que, no nível de 5% de significância, não há diferença entre as médias. ** - Significativo a 1% de probabilidade ($p < 0,01$); * - Significativo a 5% de probabilidade ($p < 0,05$); ^{ns} - não significativo ($p > 0,05$).

1.3 Produção de biogás

Os resultados da produção de biogás, quantificação de metano e hidrogênio, e produções específicas estão aparentados na **Tabela V.3**, junto com o teste estatístico para comparação de diferença significativa entre os ensaios.

Tabela V.3 - Valores médios da produção volumétrica específica, e conteúdo de CH₄ e H₂ no biogás nos reatores anaeróbios horizontais de leito fixo (R1, R2, R3 e R4) instalados em série durante as fases de: Partida (1% glicerol bruto), Ensaio 1 (1% Glicerol Bruto), Ensaio 2 (1,5% Glicerol Bruto), Ensaio 3 (2% Glicerol Bruto) e Ensaio 4 (3% Glicerol Bruto).

Parâmetros	Ensaio					Teste F	Prob {>F}
	Partida	1	2	3	4		
CH ₄ (%)	R1	0,0 b	0,0 b	5,3 a	0,7 a	8,2 a	17,93 0,0000**
	R2	34,6 b	57,0 a	44,1 b	22,9 c	33,4 b	40,84 0,0000**
	R3	76,3 b	85,7 a	68,3 c	48,0 e	53,7 e	192,73 0,0000**
	R4	-	-	-	68,8 b	74,7 a	5,43 0,0246*
H ₂ (%)	R1	16,3 b	80,0 a	16,3 b	18,3 b	10,75 b	209,17 0,0000**
	R2	0,0 b	0,0 b	0,38 b	10,0 a	0,0 b	55,35 0,0000**
Produção Volumétrica CH ₄ L CH ₄ (m ³ d) ⁻¹	R1	0,00 b	0,00 b	27,58 b	1,36 b	112,25 a	15,80 0,0000**
	R2	38,82 c	80,91 ab	103,14 a	44,71 bc	41,13 ac	14,62 0,0000**
	R3	69,68 bc	104,34 a	92,16 ab	62,96 c	82,16 abc	4,78 0,0010**
	R4	-	-	-	32,94 a	22,47 a	1,34 0,2541 ^{NS}
Produção Específica CH ₄ m ³ CH ₄ (kg DQO _{removida}) ⁻¹	R2	0,117 a	0,107 a	0,083 a	0,038 a	0,018 a	1,71 0,1492 ^{NS}
	R3	0,782 a	0,104 ab	0,065 b	0,028 b	0,072 ab	4,09 0,0031**
	R4	-	-	-	0,136 a	0,009 b	9,10 0,0043**
Produção Volumétrica H ₂ L H ₂ (m ³ d) ⁻¹	R1	23,71 c	76,87 a	44,70 bc	48,94 abc	70,66 ab	4,60 0,0014**
	R2	0,00 b	0,00 b	2,56 b	10,64 a	0,00 b	13,22 0,0000**
Produção Específica H ₂ mol H ₂ /mol glicerol	R1	0,032 c	0,138 a	0,045 bc	0,128 a	0,103 ab	11,39 0,0000**

Letras iguais na mesma linha indicam que, no nível de 5% de significância, não houve diferença entre as médias. ** - Significativo a 1% de probabilidade (p<0,01); * - Significativo a 5% de probabilidade (p<0,05); ^{NS} - não significativo (p>0,05).

1.4 Remoção de matéria orgânica e glicerol livre

A eficiência de remoção de DQO e do consumo de glicerol livre nos reatores, estão apresentados em porcentagens de remoção, obtidas por comparação do afluente e efluente de cada reator (**Tabela V.4**). O sistema de reatores em série foi eficiente atingindo altos índices de remoções de DQO com médias de até 98,2% (1,5% GB - ensaio 2 – R1+R2+R3). Com adição de maiores COV, nos ensaios 3 e 4, a adição do quarto reator (R4), ajudou a manter esta elevada remoção de DQO pelo sistema completo.

Tabela V.4 - Valores médios das eficiências de remoção de demanda química de oxigênio (DQO) e glicerol bruto nos reatores anaeróbios horizontais de leito fixo e alta taxa (R1, R2, R3 e R4) instalados em série durante as fases de: Partida (1% glicerol bruto), Ensaio 1 (1% Glicerol Bruto), Ensaio 2 (1,5% Glicerol Bruto), Ensaio 3 (2% Glicerol Bruto) e Ensaio 4 (3% Glicerol Bruto).

Parâmetros		Ensaios								Teste	Prob
		Partida	1	2	3	4				F	{>F}
Eficiência de Remoção de DQO (%)	R1	12,6 a	17,3 a	13,8 a	2,8 a	6,2 a				2,25	0,0709 ^{NS}
	R2	20,8 b	30,6 ab	36,8 a	9,5 b	8,9 b				6,44	0,0001**
	R3	35,9 c	93,6 ab	98,2 a	75,7 b	37,8 c				65,50	0,0000**
	R4	-	-	-	96,8 a	97,3 a				1,45	0,2488 ^{NS}
	R1+R2	21,4 b	30,6 ab	36,8 a	9,5 b	8,9 b				5,89	0,0003**
	R1+R2+R3	39,1 c	93,6 a	98,2 a	75,7 b	37,8 c				56,65	0,0000**
	R1+R2+R3+R4	-	-	-	97,0 a	97,5 a				2,27	0,1539 ^{NS}
Eficiência de Remoção de Glicerol Livre (%)	R1	50,4 b	91,2 a	86,4 a	90,7 a	89,9 a				6,26	0,0004**
	R2	55,9 b	68,7 ab	88,6 a	44,3 b	65,7 ab				3,95	0,0074**
	R3	87,4 a	67,6 a	90,0 a	88,4 a	65,3 a				1,56	0,2007 ^{NS}
	R4	-	-	-	47,6 a	13,3 a				4,00	0,0733 ^{NS}
	R1+R2	80,4 b	99,6 ab	99,7 a	86,8 ab	96,3 ab				4,00	0,0069**
	R1+R2+R3	99,7 ab	99,9 a	99,9 a	99,2 b	99,9 a				4,29	0,0047**
	R1+R2+R3+R4	-	-	-	99,8 a	99,9 a				0,98	0,3467 ^{NS}

Letras iguais na mesma linha indicam que, no nível de 5% de significância, não há diferença entre as médias. ** - Significativo a 1% de probabilidade ($p < 0,01$); * - Significativo a 5% de probabilidade ($p < 0,05$); ^{NS} - não significativo ($p > 0,05$).

A combinação R1+R2 já se mostrou suficiente na remoção do glicerol, que foi convertido à álcoois e ácidos orgânicos com sucesso nesses reatores, nas quantidades detectadas na análise de glicerol livre, (**Tabela V.4**).

Mesmo com o aumento da carga orgânica, a média de remoção de glicerol se manteve alta nos dois primeiros reatores. Entretanto, o conjunto de quatro reatores (R1+R2+R3+R4) se mostrou mais estável e apresentou vantagens ao verificarmos um coeficiente de variação de apenas 0,1% (**Tabela V.4**).

1.5 Produção de álcoois, ácidos e 1,3-Propanodiol

No **Capítulo IV** foram apresentados os dados de produção de álcoois, ácidos graxos voláteis e 1,3-Propanodiol (1,3-PD) durante os ensaios com 1,5%, 2% e 3% de glicerol bruto. Dados complementares referentes aos ensaios de partida e 1% de glicerol bruto estão apresentados na **Tabela V.5** junto a análise estatística contemplando todos os ensaios.

As análises de álcoois, AGV e 1,3PD foram realizadas posteriormente à publicação dos artigos dos **Capítulo II** e **Capítulo III**. O artigo do 0 apresenta discussão dos valores obtidos durante os ensaios com 1,5%, 2% e 3% de GB, ensaios estes que apresentaram maiores valores de produção.

Os reatores R1 e R2 mostraram eficiência na geração de 1,3-PD com a maior proporção de GB (3%) resultando nas maiores ($p < 0,01$) médias de 1,3-PD de 2816 ± 1136 mg L⁻¹ e 3105 ± 1013 mg L⁻¹, respectivamente.

Tabela V.5 - Valores médios de álcoois, ácidos e 1,3-Propanodiol dos reatores anaeróbios horizontais de leito fixo e alta taxa (R1, R2, R3 e R4) instalados em série ao final das fases: Ensaio 1 (1% Glicerol Bruto), Ensaio 2 (1,5% Glicerol Bruto), e Ensaio 4 (3% Glicerol Bruto).

(continua)

Parâmetros	Ponto de Coleta	Ensaio								Teste F	Prob {>F}		
		Partida		1		2		3				4	
Acetona	Afluente	0	a	3	a	0	a	38	a	6	a	1,57	0,2119 ^{NS}
Metanol	Afluente	16	a	20	a	42	a	94	a	66	a	2,28	0,0895 ^{NS}
	R1	39	ab	26	b	36	b	35	b	75	a	4,89	0,0050 ^{**}
	R2	30	a	16	a	20	a	31	a	65	a	2,48	0,0695 ^{NS}
	R3	8	a	0	a	0	a	67	a	46	a	2,14	0,1153 ^{NS}

Parâmetros	Ponto de Coleta	Ensaaios								Teste F	Prob {>F}		
		Partida		1		2		3				4	
Etanol	Afluente	0	a	19	a	137	a	53	a	127	a	1,16	0,3502 ^{NS}
	R1	41	a	232	a	254	a	209	a	69	a	1,11	0,3742 ^{NS}
	R2	0	b	0	b	33	b	235	a	33	b	4,57	0,0069**
Ácido Acético	Afluente	0	a	0	a	20	a	0	a	0	a	0,63	0,6466 ^{NS}
	R1	28	a	23	a	46	a	104	a	144	a	2,06	0,1178 ^{NS}
	R2	0	b	0	b	27	b	140	ab	253	a	10,59	0,0000**
	R3	0	b	0	b	0	b	64	a	114	a	4,86	0,0049**
Ácido Propiônico	Afluente	0	a	0	a	51	a	0	a	0	a	0,63	0,6461 ^{NS}
	R1	931	a	414	a	787	a	949	a	1193	a	0,55	0,6988 ^{NS}
	R2	31	c	0	c	158	bc	1344	ab	1539	a	7,43	0,0005**
	R3	0	b	0	b	0	b	335	a	1134	a	4,73	0,0059**
Ácido Isobutírico	R1	0	a	0	a	2	a	3	a	4	a	1,14	0,3609 ^{NS}
	R2	0	b	0	b	2	b	11	a	15	a	14,50	0,0000**
	R3	0	b	0	b	0	b	4	ab	8	a	3,94	0,0130*
Ácido Butírico	R1	37	b	19	b	20	b	89	b	304	a	7,60	0,0004**
	R2	0	b	0	b	6	b	134	b	485	a	29,60	0,0000**
	R3	0	b	0	b	0	b	17	ab	90	a	3,23	0,0295*
Ácido Isovalérico	R2	0	a	0	a	0	a	8	a	4	a	3,02	0,0377*
	R3	0	a	0	a	0	a	3	a	6	a	2,00	0,1255 ^{NS}
Ácido Valérico	R1	165	b	117	b	229	a	626	a	777	a	3,36	0,0255*
	R2	0	c	0	c	0	c	899	b	1655	a	25,98	0,0000**
	R3	0	b	0	b	0	b	125	ab	531	a	3,82	0,0147*
Ácido Capróico	R1	1	b	1	b	5	b	5	b	61	a	4,44	0,0069**
	R2	0	b	0	b	1	b	19	ab	115	a	5,04	0,0043**
	R3	0	b	0	b	0	b	4	ab	14	a	4,65	0,0061**
1,3-Propanodiol	R1	646	b	799	b	285	b	1015	b	2816	a	14,50	0,0000**
	R2	341	bc	227	c	106	c	1423	b	3105	a	23,76	0,0000**
	R3	140	b	49	b	52	b	342	b	1226	a	9,29	0,0001**
	R4	-		-		-		42	b	252	a	6,28	0,0365*

Unidades: mg L⁻¹. Letras iguais na mesma linha indicam que, no nível de 5% de significância, não há diferença entre as médias. ** - Significativo a 1% de probabilidade (p<0,01); * - Significativo a 5% de probabilidade (p<0,05); ^{NS} - não significativo (p>0,05).

(Conclusão)

1.6 Biologia Molecular

O sequenciamento das amostras para identificação dos microrganismos presentes nos reatores permitiu uma avaliação da abundância relativa destes em cada reator do sistema de RAHLF em série.

A sumarização das principais ordens identificadas durante toda a duração do projeto foi realizada na

Tabela V.6.

No **Capítulo III** foram discutidos os resultados do sequenciamento realizado ao final do ensaio 1 (1% GB), e no **Capítulo IV** os resultados da análise realizada ao final do ensaio 2 e 3 (1,5% e 3% GB).

Tabela V.6 - Abundância relativa (%) das principais ordens identificadas nas amostras de lodo dos reatores anaeróbios horizontais de leito fixo e alta taxa (R1, R2, R3 e R4) instalados em série ao final das fases: Ensaio 1 (1% Glicerol Bruto), Ensaio 2 (1,5% Glicerol Bruto), e Ensaio 4 (3% Glicerol Bruto).

Ordem	R1			R2			R3			R4
	1%	1,5%	3%	1%	1,5%	3%	1%	1,5%	3%	3%
<i>Lactobacillales</i>	3,4	0,87	22,77	21,0	1,29	3,16	2,3	0,63	1,32	0,30
<i>Thermoanaerobacterales</i>	2,6	-	1,97	3,8	-	1,65	2,8	-	0,04	0,01
<i>Selenomonadales</i>	61,3	37,02	35,73	6,1	29,10	6,70	1,7	12,64	29,99	6,97
<i>Synergistales</i>	0,8	0,62	1,03	1,8	3,62	8,26	2,5	4,56	4,24	12,95
<i>Bacteroidales</i>	12,4	10,90	15,45	6,0	6,71	5,04	11,8	8,81	11,07	21,01
<i>Clostridiales</i>	2,4	11,42	10,81	8,8	22,85	20,42	10,6	19,02	22,43	11,28
<i>Cloacimonetes</i>	0,1	-	0,04	5,6	-	1,53	1,2	-	2,63	9,14
<i>Enterobacteriales</i>	5,7	22,02	1,00	0,3	5,93	3,80	0,1	2,90	0,11	0,14
<i>Anaerolineales</i>	0,1	0,37	0,30	2,0	2,86	2,47	0,3	1,91	2,83	2,33
<i>Sphingobacteriales</i>	0,2	1,75	-	0,8	0,91	-	1,4	1,42	-	-
<i>Methanobacteriales</i>	4,0	0,01	-	1,6	2,36	-	4,7	17,36	-	-
<i>Methanosarcinales</i>	0,1	0,01	0,09	17,6	1,48	21,90	35,7	8,91	8,31	14,26
<i>Methanomicrobiales</i>	-	0,03	0,03	7,6	2,12	3,20	13,9	17,08	3,05	4,08

2 DISCUSSÃO

2.1 Reator R1

A produção de biogás teve início após 89 dias de operação durante a fase de partida do reator R1, apresentando 1% de H₂ e sendo o restante do biogás apenas CO₂. Após 160 dias de operação o percentual de H₂ se elevou para 51,9% e o melhor resultado da composição do biogás foi atingido durante o ensaio 1 (1% glicerol bruto) com 80,9% de H₂ em sua composição (**Capítulo III**). Rivero *et al.* (2014) obtiveram percentuais de H₂ inferiores ao presente estudo na co-digestão de 1% de glicerol bruto (GB) com 99% de lodo de esgoto em reatores com agitação contínua em reator acidogênico (24,2 – 27,4% H₂), apesar de reduzirem COV de 15,3 para 7,82 kg DQO (m³ d)⁻¹. O melhor percentual de H₂ nos reatores RAHLF, do presente estudo, pode ter sido devido à configuração característica de fluxo pistonado do RAHLF, favorecendo assim a nucleação dos microrganismos anaeróbios, em diferentes gradientes de glicerol bruto.

O ensaio 1 (1% GB – **Capítulo III**) apresentou maior ($p < 0,01$) produção volumétrica de hidrogênio, com uma média de $76,87 \pm 58,07$ L H₂ (m³ d)⁻¹. A diminuição na COV de 25,4 kg DQO (m³ d)⁻¹ na fase de partida e aclimação da microbiota para 13,1 kg DQO (m³ d)⁻¹ durante o ensaio 1, favoreceu a produção de H₂ e ácidos graxos voláteis (AGV). No ensaio 1 foi observada conversões mais elevadas de glicerol livre em H₂ com produção diária de até 0,42 mol H₂ mol⁻¹ glicerol, do que a observada por Vasconcelos *et al.* (2019), em reator UASB com COV de 54,5 Kg DQO (m³ d)⁻¹ obtendo 0,096 mol H₂ por mol⁻¹ glicerol. Tais fatos indicaram que a microbiota pode apresentar dificuldades da conversão do glicerol para H₂ em altas taxas orgânicas.

Os ensaios 3 (2% GB) e 4 (3% GB) (**Capítulo IV**) apesar de menores médias de conversão de GB em H₂, apresentaram semelhanças estatísticas com o ensaio 1 (1% GB), indicando adaptação da microbiota (**Tabela V.3**). Os reatores RAHLF se mostraram eficientes na conversão de H₂, se aproximando até às maiores conversões de trabalhos que utilizaram culturas puras como *Enterobacter aerogenes* e atingiram conversões de 0,69 a 1,12 mol H₂ mol⁻¹ glicerol, em reatores anaeróbios em batelada (NGO *et al.*, 2011; SELEMBO *et al.*, 2009). Jiraprasertwong *et al.* (2020) também observaram queda na produção de biogás em reatores UASB em série, alimentados com água residuária da produção de etanol, quando aplicado COVs maiores que 20,0 Kg DQO (m³ d)⁻¹, que,

segundo os autores, pode ter causado o acúmulo de AGV no reator, atingindo uma concentração inibitória.

Os níveis de conversão do glicerol à H_2 atingiram taxas mais reduzidas quando comparadas às teóricas. Entretanto, diferentes rotas metabólicas da degradação do glicerol podem ter ocorrido, como a produção de 1,3-PD, além da produção de H_2 . Diferentes cargas de glicerol podem favorecer rotas específicas de conversão. Sittijunda e Reungsang (2020) conseguiram identificar o favorecimento da rota de produção de etanol em reatores UASB alimentados com glicerol, com o aumento da COV de 50 para 75 g (L d)^{-1} .

O aumento da produção de 1,3-PD nos ensaios com maiores proporções de GB dificultou a obtenção de maiores produções de hidrogênio. A conversão de glicerol em 1,3-PD por via redutiva não gera hidrogênio e pode consumir NADH da produção de biomassa, causando assim a diminuição na sua produção (SITTIJUNDA; REUNGSANG, 2017; VERAS *et al.*, 2019). Este resultado indica que a carga orgânica mais elevada e resultante do aumento da proporção de GB, causou alteração das vias metabólicas de oxidativa para redutiva, durante a fermentação do glicerol.

A produção de ácido propiônico foi intensa durante todos os ensaios, não apresentando diferença estatística significativa entre as médias ($p > 0,05$) (**Tabela V.5**). A conversão deste ácido, assim como 1,3-PD e ácido láctico, não resulta em produção de H_2 (**Capítulo IV**). Esta relação foi observada por Sittijunda; Reungsang, (2020) durante a operação de um reator UASB alimentado com glicerina pura. Os autores reportaram a diminuição na produção de hidrogênio de 750 para $310 \text{ mmol } H_2 \text{ L}^{-1}$ em resposta ao aumento da COV de 62,5 para $75,0 \text{ g DQO L d}^{-1}$. O aumento da COV pode forçar a seleção de microrganismos modificando a rota metabólica predominante no reator.

No **Capítulo III**, na amostra do reator R1 ao final do ensaio com 1% de GB, foi observado percentual reduzido na abundância relativa do Dominio Archaea de 4% e 96% para o Dominio Bacteria. Tal fato confirmou que o pré tratamento aplicado ao inóculo e as condições operacionais favoreceram os processos fermentativos de geração de AGV, álcoois e H_2 , conforme verificado anteriormente. No inóculo *in natura* e no reator R1 foi verificado, respectivamente predomínio na abundância relativa dos filos Firmicutes (28% e 74%), Cloacimonetes (19% e 0%), Bacteroides (16% e 13%), Proteobacteria (14% e

11%). O Filo Cloacimonetes foi recentemente classificado por bactérias sintróficas, envolvidas na degradação de propionato (AHLERT *et al.*, 2016). Como o inóculo *in natura* foi proveniente de um reator UASB metanogênico, era esperado a presença de bactérias anaeróbias degradadoras de propionato. O filo Firmicutes já é conhecido por possuir bactérias fermentativas capazes de tolerar condições adversas, graças a sua capacidade de formar endosporos, sendo clara sua resistência ao pré-tratamento do lodo recebido pelo reator R1, além de sua dominância em comparação aos outros reatores (FILIPPIDOU *et al.*, 2015). Foi verificado ainda a perpetuação de *Bacteroides* e *Proteobacteria* que também possuem bactérias fermentativas e anaeróbias facultativas, que certamente colaboraram para o processo fermentativo da geração de Hidrogênio verificadas durante a operação (MAINTINGUER *et al.*, 2011).

No **Capítulo IV** (aumento das COVs e acidificação do reator R2) com a aplicação da maior proporção de GB (3%) pode se observar que os filos que mantiveram a abundância relativa semelhante foram Firmicutes com 73%, Bacteroides em 15% e Proteobacteria em 8%. Pertencente ao Firmicutes a ordem Lactobacillales apresentou melhor adaptação quando comparado aos resultados do **Capítulo III** (Partida dos reatores e operação da fase 1). O domínio destes microrganismos conhecidos por serem produtores de ácido láctico também justificam a produção mais reduzida de H₂.

2.2 Reator R2

Com a diminuição da COV com a estratégia apresentada no artigo do **Capítulo III**, durante o ensaio 1 foram verificadas gerações de até 311,9 L CH₄ (m³ d)⁻¹, perfazendo a composição de CH₄ no biogás de 57%, em 200 dias de operação. A produção volumétrica mais elevada foi de 593,3 L CH₄ (m³ d)⁻¹ e ocorreu aos 331 dias de operação, durante o ensaio 2 (1,5% glicerol bruto), descrito no artigo do **Capítulo IV**.

No ensaio 2 apesar da média de pH do afluente do reator R2 ter sido 5,5 ± 0,94, em seu efluente foi registrado uma das maiores médias de pH (7,16 ± 0,93). Tal fato confirmou que a adição de NaHCO₃ (2 g L⁻¹ de reator) gerou alcalinidade e tamponamento, contribuindo para as produções de CH₄ mais elevadas (SPEECE, 2008). Neste mesmo ensaio o reator R2 obteve a maior produção volumétrica de metano, 103,14 ± 85,88 L CH₄ (m³ d)⁻¹ (**Tabela V.3**). Porém, a maior média de percentual de metano no

biogás ($57 \pm 0 \%$) foi obtida durante o ensaio 1. Utilizando reator UASB como segunda fase, para digestão do efluente de um reator fermentativo alimentado com melaço de cana-de-açúcar, Nualsri, Kongjan, *et al.*, (2016), conseguiram atingir produções de metano mais elevadas ($3,14 \text{ L CH}_4 (\text{L d})^{-1}$), com alcalinidade de $6,6 \text{ g CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ e um afluente com pH maiores que 6,5. No presente estudo, a maior média de alcalinidade parcial no efluente do reator R2 foi de $1,66 \pm 1,17 \text{ g CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$, indicando que, para se atingir melhores produções de metano será necessário uma suplementação mais elevada de alcalinizante.

Durante a partida e ensaio 1, não foi detectado H_2 no biogás do reator R2, o que indicou que arqueias metanogênicas hidrogenotróficas estiveram envolvidas nas gerações de metano verificadas. Aos 323 dias de operação, durante o ensaio 2, foi detectado na composição do biogás do reator R2, 3,6% de H_2 . A frequência de adição de NaHCO_3 foi aumentada para duas vezes ao dia durante 1 semana e, com isso, não foi mais detectada a produção de H_2 . Mas como parte do propósito em estudar a viabilização da aplicação do projeto, tornando-o economicamente mais atrativo, com a redução de gastos na suplementação de tamponantes, a partir do ensaio 3 não foi mais adicionado NaHCO_3 na entrada no reator R2. Os resultados apresentados no artigo do 0 mostraram a transformação do reator R2 de metanogênico para fermentativo. Após o aumento da proporção de GB para 2% optou-se pela estratégia de introdução de alcalinizante no reator R3 que possuía um TDH maior comparado ao reator R2, favorecendo assim a metanogênese no reator R3 e a produção de AGV e 1,3-PD no reator R2.

O favorecimento da fermentação no reator R2 pode ser confirmado com consumo de glicerol, uma vez que, no ensaio 1 (1,5% GB), o afluente do reator R2 apresentou uma média de $291 \pm 431 \text{ mg L}^{-1}$ e em seu efluente $9 \pm 17 \text{ mg L}^{-1}$, mostrando uma conversão média de 99,9% do glicerol. Além disso, apenas 30,7% de remoção da DQO foi verificada em R2, confirmando assim a ocorrência da fermentação, resultando em um efluente com DQO de 8933 mg L^{-1} .

A maior média de remoção de DQO ($p < 0,01$) no reator R2 foi reportada no ensaio 2 (artigo do **Capítulo III**), com $36,8 \pm 26,1\%$. Valores reduzidos de consumos de DQO foram verificados em reatores metanogênicos de fluxo contínuo (NUALSRI *et al.*, 2016; RIVERO *et al.*, 2014; SANTANA; OLIVEIRA, 2005). A diminuição na remoção de DQO

pelo reator R2 é consequência do aumento na proporção de GB e inativação da microbiota metanogênica, devido à produção elevada de AGV, operado sem suplementação de alcalinizante na sua entrada após o ensaio 2. Não foram verificadas remoções de DQO por Veroneze *et al.* (2019) em reatores anaeróbios em batelada com 5% de glicerol bruto co-digerido com água residuária de suinocultura, como no presente estudo.

A maior produção volumétrica de hidrogênio ($p > 0,01$) foi observada durante o ensaio com 2% de GB discutido no **Capítulo IV** ($10,64 \pm 18,5 \text{ L H}_2 (\text{m}^3 \text{ d})^{-1}$), assim como o percentual médio mais elevado de H_2 no biogás ($10,0 \pm 10,6 \%$) (**Tabela V.3**). Neste mesmo período a média de CH_4 no biogás foi de $22,9 \pm 14,8\%$. Usualmente, a produção de CH_4 e H_2 no mesmo reator não é estimulada, pois se busca um balanço ou inibição de partes do processo, para que apenas um dos compostos seja produzido. Entretanto, o estímulo dessa produção pode ser interessante, em reatores em série, nos quais os reatores intermediários, operando em fluxo pistonado, podem favorecer um equilíbrio da microbiota e a produção concomitante de CH_4 e H_2 , gerando um biogás com poder calorífico mais elevado.

Após 534 dias de operação, houve interrupção na produção de biogás no reator R2. Inicialmente a hipótese era de que o pH reduzido havia inibido a microbiota, mas a análise de AGV mostrou que a produção se manteve. Então, foi verificado microfissuras nas mangueiras de polietileno que eram usadas na canalização do biogás, resultado de ressecamento devido à exposição ao sol, o que prejudicou a avaliação da produção de biogás durante o ensaio 4.

No **Capítulo III** foi discutida a modificação da abundância relativa entre o inóculo do reator e o final do ensaio 2 (1,5% GB), onde a ordem *Lactobacillales* predominava com 21% de abundância relativa. Em grande parte dos trabalhos descritos é comum uma maior adaptação deste gênero em reatores fermentativos, por se adaptarem a pH ácidos (5,5) (PACHIEGA *et al.*, 2018; WU *et al.*, 2016). Em alguns casos de reatores operados com glicerol bruto, a população de *Clostridium* pode ser inibida por biocinas produzidas por *Lactobacillus* (VERAS *et al.*, 2019). Todavia, durante o **Capítulo IV**, pode ser observado a transição da ordem *Lactobacillales* para a maior abundância relativa da ordem *Clostridiales* (20,4% - Ensaio 4). Membros desta ordem, como o gênero

Clostridium sp., já foi identificado como o principal grupo bacteriano responsável pela hidrólise e acidificação e consequente produção de H_2 (ZHAO *et al.*, 2017). O aumento da ordem *Clostridiales* está ligado ao fato de que o reator R1, com o aumento da proporção de GB, não foi capaz de hidrolisar o GB em sua totalidade, favorecendo os membros desta ordem no reator R2.

2.3 Reator R3

Após 86 dias da partida foi verificado 78,7% de metano na composição do biogás. Entretanto, nas fases de partida e ensaio 1 (artigo do **Capítulo III**), a composição média de metano no biogás foi de $76,3 \pm 7,6 \%$ e $85,7 \pm 0,0 \%$, respectivamente. Rivero *et al.* (2014) utilizando condições similares de COV em reatores de agitação contínua alimentados com glicerol e lodo de esgoto, obtiveram percentuais de metano inferiores ao presente estudo (49,9-62,4%). Tais fatos confirmaram a eficiência elevada dessa configuração de reatores RAHLF.

Durante a operação na proporção de 1,5% GB (Ensaio 2 – **Capítulo IV**) foi registrada a maior produção volumétrica de $306,7 \text{ L CH}_4 (\text{m}^3 \text{ d})^{-1}$. Porém, o ensaio 1 (1% GB) apresentou a maior média de produção volumétrica de metano ($p < 0,01$) ($104,34 \pm 64,42 \text{ L CH}_4 (\text{m}^3 \text{ d})^{-1}$), provavelmente ocasionada pela diminuição da COV. Entretanto, foram verificadas semelhanças estatísticas com os ensaios 2 e 4, mostrando que, o aumento da COV pode não ter sido o único fator que influenciou a diminuição nas produções de metano. Muitos trabalhos aplicando curtos períodos, inferiores a 30 dias, podem obter sucesso no consumo de glicerol bruto, porém a imposição a extensos períodos de alimentação contínua certamente será um delimitador à sobrevivência da microbiota.

Nas configurações em série, os reatores das etapas subsequentes são diretamente beneficiados pela qualidade dos efluentes parcialmente degradados nas fases anteriores desses sistemas. Neste caso, com o estabelecimento da metanogênese no reator R2 durante os ensaios com 1% (**Capítulo III**) e 1,5% (0) de GB, foi obtido um afluente mais facilmente degradável para o reator R3, sem necessidade de suplementação para tamponamento, uma vez que a parte da alcalinidade foi gerada na

biodegradação da configuração em série, aliada, principalmente aos compostos nitrogenados presentes no esgoto sanitário (SPEECE, 2008).

Assim, no reator R3, com eficiências elevadas no consumo de AGV nos ensaios 1 (1% GB) e 2 (1,5%), consequentemente foi verificado melhores produções de metano ao longo da operação. Os menores valores de AGV no efluente do reator R3 ($p < 0,01$) se deram durante os ensaios 1 e 2, respectivamente 636 ± 379 e 375 ± 174 mg L⁻¹. Tais resultados influenciaram diretamente na estabilidade do reator, com pH de 8,39 ($\pm 0,17$) durante o ensaio 1. Além disso, as maiores médias de remoção de DQO foram apresentadas nos ensaios 1 e 2, respectivamente, de 93,6% $\pm 7,3$ e 98,2% $\pm 0,8$, confirmando o estabelecimento da metanogênese (**Tabela V.4**).

Em reatores em série de 3 estágios, com os parâmetros aplicados neste trabalho, pode haver redução na eficiência de remoção de DQO no terceiro reator, pela presença de compostos com biodegradabilidade reduzida. Jiraprasertwong *et al.* (2020) operaram reatores UASB em série alimentados com água residuária da produção de etanol e no terceiro estágio foram obtidas 80% de remoção de DQO. Tais valores obtidos pelos autores (op.cit.) foram inferiores ao presente estudo, que foram de 99,1% de remoção de DQO, confirmando assim a eficiência dos RAHLFs alimentados com glicerol bruto, que contém contaminantes mais dificilmente degradáveis como águas residuárias da produção de etanol.

Além disso, foi verificado no efluente do reator R3 nas fases de partida e no ensaio 1, respectivamente, 3,0 mg glicerol L⁻¹ e 2,0 mg glicerol L⁻¹. A remoção de glicerol foi elevada no RAHLF, com consumos totais de 99,9% das concentrações iniciais impostas, confirmando a eficiência da aplicação de reatores em série do tratamento do glicerol bruto advindo da fabricação do biodiesel.

2.4 Reator R4

Verificou-se a necessidade de implementação de um quarto reator (R4) para operação durante os ensaios 3 (2% GB) e 4 (3% GB) que foram apresentados no artigo do **Capítulo IV**. Uma vez elevada a COV, devido ao aumento de glicerol bruto no afluente para 2% no ensaio 3, houve o consequente aumento na COV dos reatores seguintes. Apesar da grande atividade metanogênica no reator R3, arqueias metanogênicas,

microrganismos anaeróbios estritos e com crescimento lento, não possuíram tempo hábil para converter todo AGV produzido em CH_4 . Tal excedente poderia ser convertido em um próximo reator (R4), graças a seu maior diâmetro e TDH, para favorecer o consumo de AGV, gerando um efluente final de melhor qualidade e maior reaproveitamento energético nos reatores em série.

A implementação do reator R4 em 2020 ocorreu com o início da pandemia de COVID-19, atrapalhando sua melhor implementação, resultando em sua operação sem o sistema auxiliar de aquecimento, não provendo assim condições para atingir melhores produções de CH_4 . Porém, mesmo sem as condições ideais o reator R4 cumpriu seu propósito e atingiu médias de remoção de DQO de $96,8\% \pm 0,7$ e $97,2\% \pm 0,5$ durante os ensaios 3 e 4, respectivamente (**Capítulo IV**).

Não houve diferença estatística ($p > 0,05$) na produção de metano durante os ensaios com 2% e 3% de GB com médias de $32,9 \pm 36,4$ e $22,5 \pm 23,8$ L CH_4 ($\text{m}^3 \text{ d}^{-1}$), respectivamente. Além do fato do reator R4 não possuir auxílio para manutenção de temperatura, o período de adaptação pode não ter sido suficiente para adaptação da microbiota. O ácido propiônico foi o principal ácido produzido no reator R3, requerendo uma maior adaptação da microbiota do reator R4 para sua degradação, por se tratar de um processo endotérmico (**Capítulo IV**).

CONCLUSÕES

- O pré-tratamento ácido aplicado ao inóculo do reator R1 foi eficaz na inativação de microrganismos consumidores de hidrogênio, como arqueias metanogênicas. Porém na tentativa de manter a faixa de pH em 5,5 com a introdução de alcalinizante, resultou em flutuações no pH acima de 6,0, possibilitando o restabelecimento da microbiota metanogênica.
- A redução na COV em resposta ao consequente aumento do TDH influenciou positivamente na produção de biogás e remoção de DQO, podendo ser usados como parâmetros de partida para reatores RAHLF.
- As concentrações de glicerol bruto utilizadas não foram inibitórias para a microbiota, que resultou na geração de H₂ diária de até 0,42 mol H₂ mol⁻¹ glicerol e produções diárias de metano de até 311,9, 283,9 118,0 L CH₄ (m³ d)⁻¹, nos reatores R2, R3 e R4 respectivamente.
- A estratégia de inserção do quarto reator (R4) foi eficiente para remoção da carga orgânica do glicerol bruto, mantendo a média de remoção do sistema em 97,5%.
- A identificação biomolecular em larga escala dos microrganismos presentes no inóculo e nos reatores R1, R2 e R3 confirmou a modificação na composição da microbiota do lodo anaeróbio dos reatores em série. Tais alterações provavelmente foram ocasionadas pelas diferentes condições operacionais, espaciais e temporais impostas pelo RAHLF, montado em série.
- As alterações nas populações dos microrganismos anaeróbios, durante a operação dos reatores, por análises de DGGE realizadas, confirmaram a maior diversidade microbiana nos reatores metanogênicos (R2 e R3) onde ocorreu a metanogênese. Contrariamente, a reduzida diversidade microbiana verificada no reator fermentativo (R1), causada pelo pré-tratamento aplicado ao inóculo, foi necessária para produção de H₂, uma vez que populações de microrganismos consumidores desse biogás foram inibidos pelas condições operacionais impostas.
- A bioconversão do glicerol bruto em produtos de valor agregado foi muito eficaz, principalmente nos reatores R1 e R2 onde foram registradas as gerações mais elevadas de 1,3-Propanodiol e ácido propiônico.

- A carga orgânica elevada aplicada favoreceu a rota redutiva na fermentação do glicerol bruto nestes reatores.
- A produção elevada de ácido propiônico nos primeiros reatores (R1 e R2) causou instabilidades na metanogênese no reator R3. Tal fato causou produções reduzidas de metano devido ao acúmulo de ácido propiônico e sua degradação requerer maior utilização energética por ser um processo endotérmico.
- O fluxo pistonado dos RAHLF permite a estratificação da biomassa dentro de cada sessão do reator, e, possivelmente essa característica em sua configuração seja a chave para a aplicação sustentável do consumo glicerol bruto advindo das usinas de biodiesel.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Durante o presente estudo foram exploradas concentrações ideais dos substratos (glicerol bruto e esgoto sanitário) em reatores anaeróbios horizontais em série para a remoção do glicerol, geração de biogás e produtos de valor agregado. O sistema apresentou robustez na degradação do resíduo nas proporções aplicadas.

Sugestões para a continuidade do presente estudo:

- 1) Aplicação de concentrações acima de 3% de glicerol;
- 2) Recuperação de produtos como o 1,3-Propanodiol após o reator R2;
- 3) Adição de um tanque de equalização após o reator R2, para facilitar o controle de pH na entrada do reator metanogênico;
- 4) Duplicação dos volumes dos reatores R3 e R4 para o aumento do TDH;
- 5) Suplementação de nitrogênio e fósforo para melhorar a relação DQO:N:P e;
- 6) Implementação do pós-tratamento com microalgas para a utilização da biomassa como bioestimulante de plantas oleaginosas utilizadas para a produção de biodiesel.

BIBLIOGRAFIA

ABREU, S. B.; ZAIAT, M. Desempenho de reator anaeróbio-aeróbio de leito fixo no tratamento de esgoto sanitário. **Eng. Sanit. Ambient.**, v. 13, n. 2, p. 181–188, 2008. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-41522008000200008&lng=en&nrm=iso&tlng=pt. Acesso em: 19 jan. 2017.

ADAMES, L. V.; PIRES, L. O.; ADORNO, M. Â. T.; MAINTINGUER, S. I. Hydrogen production in anaerobic continuous flow reactor using crude glycerol from biodiesel production. **Revista Materia**, v. 26, n. 2, 2021.

AHLERT, S.; ZIMMERMANN, R.; EBLING, J.; KÖNIG, H. Analysis of propionate-degrading consortia from agricultural biogas plants. **MicrobiologyOpen**, v. 5, n. 6, p. 1027–1037, 2016. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mbo3.386>.

ANITHA, M.; KAMARUDIN, S. K.; KOFLI, N. T. The potential of glycerol as a value-added commodity. **Chemical Engineering Journal**, v. 295, p. 119–130, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2016.03.012>.

ANP. **Anuário Estatístico Brasileiro do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis 2020**, 2021. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/publicacoes/anuario-estatistico/5809-anuario-estatistico-2020>. .

ANP. **Biodiesel**, 2020. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/biocombustiveis/biodiesel>. Acesso em: 8 out. 2020.

ATHANASOULIA, E.; MELIDIS, P.; AIVASIDIS, A. Co-digestion of sewage sludge and crude glycerol from biodiesel production. **Renewable Energy**, v. 62, n. PA, p. 73–78, 2014. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960148113003339>.

AYDIN, S.; INCE, B.; INCE, O. Application of real-time PCR to determination of combined effect of antibiotics on Bacteria, Methanogenic Archaea, Archaea in anaerobic sequencing batch reactors. **Water Research**, v. 76, p. 88–98, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2015.02.043>.

AYDIN, S.; SHAHI, A.; OZBAYRAM, E. G.; INCE, B.; INCE, O. Use of PCR-DGGE based molecular methods to assessment of microbial diversity during anaerobic treatment of antibiotic combinations. **Bioresource Technology**, v. 192, p. 735–740, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.05.086>.

AYOUB, M.; ABDULLAH, A. Z. Critical review on the current scenario and significance of crude glycerol resulting from biodiesel industry towards more sustainable renewable energy industry. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 5, p. 2671–2686, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2012.01.054>.

BADIA-FABREGAT, M.; RAGO, L.; BAEZA, J. A.; GUIASOLA, A. Hydrogen production from crude glycerol in an alkaline microbial electrolysis cell. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 44, n. 32, p. 17204–17213, 2019. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.03.193>.

BARALDI, E. A.; DAMIANOVIC, M. H. R. Z.; MANFIO, G. P.; FORESTI, E.; VAZOLLER, R. F. Performance of a horizontal-flow anaerobic immobilized biomass (HAIB) reactor and dynamics of the microbial community during degradation of pentachlorophenol (PCP). **Anaerobe**, v. 14, n. 5, p. 268–274, 2008.

BARBIRATO, F.; CHEDAILLE, D.; BORIES, A. Propionic acid fermentation from glycerol: Comparison with conventional substrates. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 47, n. 4, p. 441–446, 1997.

BELLE, A. J.; LANSING, S.; MULBRY, W.; WEIL, R. R. Anaerobic co-digestion of forage radish and dairy manure in complete mix digesters. **Bioresource Technology**, v. 178, n. February, p. 230–237, 2015. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852414012875>. Acesso em: 25 abr. 2017.

BOLAÑOS, R. M. L.; VARESCHE, M. B. A.; ZAIAT, M.; FORESTI, E. Phenol degradation in horizontal-flow anaerobic immobilized biomass (HAIB) reactor under mesophilic conditions. **Water Science and Technology**, v. 44, n. 4, p. 167–174, 2001.

BURNIOL-FIGOLS, A.; VARRONE, C.; LE, S. B.; DAUGAARD, A. E.; SKIADAS, I. V.; GAVALA, H. N. Combined polyhydroxyalkanoates (PHA) and 1,3-propanediol production from crude glycerol: Selective conversion of volatile fatty acids into PHA by mixed microbial consortia. **Water Research**, v. 136, p. 180–191, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.02.029>.

CAVERO-OLGUIN, V. H.; RAHIMPOUR, F.; DISHISHA, T.; ALVAREZ-ALIAGA, M. T.; HATTI-KAUL, R. Propionic acid production from glycerol in immobilized cell bioreactor using an acid-tolerant strain of *Propionibacterium acidipropionici* obtained by adaptive evolution. **Process Biochemistry**, v. 110, n. January, p. 223–230, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2021.08.005>.

CHAPARRO, T. R.; BOTTA, C. M.; PIRES, E. C. Toxicity and recalcitrant compound removal from bleaching pulp plant effluents by an integrated system: Anaerobic packed-bed bioreactor and ozone. **Water Science and Technology**, v. 61, n. 1, p. 199–205, 2010.

CHOUHAN, A. P. S.; SARMA, A. K. Modern heterogeneous catalysts for biodiesel production: A comprehensive review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, n. 9, p. 4378–4399, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2011.07.112>.

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

CNPE, C. N. de P. E. **CNPE mantém percentual de 10% de biodiesel no diesel em 2022**, 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/anp/pt->

br/canais_atendimento/imprensa/noticias-comunicados/cnpe-mantem-percentual-de-10-de-biodiesel-no-diesel-em-2022. .

CORAL, J.; KARP, S. G.; PORTO DE SOUZA VANDENBERGHE, L.; PARADA, J. L.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Batch fermentation model of propionic acid production by propionibacterium acidipropionici in different carbon sources. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 151, n. 2–3, p. 333–341, 2008.

DA SILVA CÉSAR, A.; CONEJERO, M. A.; BARROS RIBEIRO, E. C.; BATALHA, M. O. Competitiveness analysis of “social soybeans” in biodiesel production in Brazil. **Renewable Energy**, v. 133, p. 1147–1157, 2019. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960148118310589>.

DAMIANOVIC, M. H. R. Z. **Degradação de pentaclorofenol (PCP) em reatores anaeróbios horizontais de leito fixo (RAHLF)**. 1997. 175 f. - Universidade de São Paulo, São Carlos, 1997.

DE NARDI, I. R.; VARESCHE, M. B.; ZAIAT, M.; FORESTI, E. Anaerobic degradation of BTEX in a packed-bed reactor. **Water science and technology : a journal of the International Association on Water Pollution Research**, v. 45, n. 10, p. 175–180, 2002.

DIETZ, D.; ZENG, A. P. Efficient production of 1,3-propanediol from fermentation of crude glycerol with mixed cultures in a simple medium. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 37, n. 2, p. 225–233, 2014.

DISHISHA, T.; IBRAHIM, M. H. A.; CAVERO, V. H.; ALVAREZ, M. T.; HATTI-KAUL, R. Improved propionic acid production from glycerol: Combining cyclic batch- and sequential batch fermentations with optimal nutrient composition. **Bioresource Technology**, v. 176, p. 80–87, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.11.013>.

DROZDZYŃSKA, A.; LEJA, K.; CZACZYK, K. Biotechnological production of 1,3-propanediol from crude glycerol. **Biotechnologia**, v. 92, n. 1, p. 92–100, 2011.

DROZDZYŃSKA, 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.

DUDA, R. M.; DA SILVA VANTINI, J.; MARTINS, L. S.; DE MELLO VARANI, A.; LEMOS, M. V. F.; FERRO, M. I. T.; DE OLIVEIRA, R. A. A balanced microbiota efficiently produces methane in a novel high-rate horizontal anaerobic reactor for the treatment of swine wastewater. **Bioresource Technology**, v. 197, p. 152–160, 2015.

FILIPPIDOU, S.; JUNIER, T.; WUNDERLIN, T.; LO, C. C.; LI, P. E.; CHAIN, P. S.; JUNIER, P. Under-detection of endospore-forming Firmicutes in metagenomic data. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 13, p. 299–306, 2015.

FONTENELLE, M.; ALVES, H. J.; MONTEIRO, M. R.; HIGAE, S. M.; DELLA ROVERE, C. A.; PELLIZZER, E. L.; FONTENELLE, I. Evaluation of corrosion caused by the use of in natura biogas in steam generator boilers of carbon steel structural elements.

Materials Research, v. 20, n. 3, p. 725–735, 2017.

FORESTI, E.; ZAIAT, M.; CABRAL, A. K. A.; NERY, V. Horizontal-Flow Anaerobic Immobilized Sludge (HAIS) reactor for paper industry wastewater treatment. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 12, p. 157–163, 1995.

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. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.008>.

HAOSAGUL, S.; VIKROMVARASIRI, N.; SAWASDEE, V.; PISUTPAISAL, N. Impact of acetic acid in methane production from glycerol/acetic acid co-fermentation.

International Journal of Hydrogen Energy, v. 44, n. 56, p. 29568–29574, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.03.204>.

HIMMI, E. H.; BORIES, A.; BOUSSAID, A.; HASSANI, L. Propionic acid fermentation of glycerol and glucose by *Propionibacterium acidipropionici* and *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, n. 4, p. 435–440, 2000.

HUTŇAN, M.; KOLEŠÁROVÁ, N.; BODÍK, I.; CZÖLDEROVÁ, M. Long-term monodigestion of crude glycerol in a UASB reactor. **Bioresource Technology**, v. 130, p. 88–96, 2013.

JIRAPRASERTWONG, A.; SENEESRISAKUL, K.; PORNMAI, K.; CHAVADEJ, S. High methanogenic activity of a three-stage UASB in relation to the granular sludge formation. **Science of the Total Environment**, v. 724, p. 138145, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138145>.

JORDÃO, E. P.; PESSOA, C. A. **Tratamento de Esgotos Domésticos**. 3ª edição. Rio de Janeiro: ABES, 1995.

KANCHANASUTA, S.; SILLAPARASSAMEE, O. Enhancement of hydrogen and methane production from co-digestion of palm oil decanter cake and crude glycerol using two stage thermophilic and mesophilic fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 5, p. 3440–3446, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.01.032>.

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

issues. **Biotechnology Reports**, v. 27, p. e00487, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00487>.

KONG, P. S.; AROUA, M. K.; DAUD, W. M. A. W. Conversion of crude and pure glycerol into derivatives: A feasibility evaluation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 63, p. 533–555, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2016.05.054>.

KUCZMAN, O.; TAVARES, M. H. F.; GOMES, S. D.; GUEDES, L. P. C.; GRISOTTI, G. Cassava starch extraction effluent treatment in a one phase tubular horizontal pilot reactor with support medium. **Engenharia Agrícola**, v. 34, n. 6, p. 1270–1282, 2014. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-69162014000600021&lng=en&nrm=iso&tlng=en. Acesso em: 25 abr. 2017.

KUMAR, L. R.; YELLAPU, S. K.; TYAGI, R. D.; ZHANG, X. A review on variation in crude glycerol composition, bio-valorization of crude and purified glycerol as carbon source for lipid production. **Bioresource Technology**, v. 293, n. August, p. 122155, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122155>.

LEE, J. H.; JUNG, M. Y.; OH, M. K. High-yield production of 1,3-propanediol from glycerol by metabolically engineered *Klebsiella pneumoniae*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, n. 1, p. 1–13, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1100-5>.

LI, D.; LI, W.; ZHANG, K.; ZHANG, G.; ZHANG, H.; ZHANG, D.; LV, P.; WU, J. Nutrient removal by full-scale Bi-Bio-Selector for nitrogen and phosphorus removal process treating urban domestic sewage at low C/N ratio and low temperature conditions. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 140, p. 199–210, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.psep.2020.05.011>.

LINKE, B.; MUHA, I.; WITTUM, G.; PLOGSTIES, V. Mesophilic anaerobic co-digestion of cow manure and biogas crops in full scale German biogas plants: A model for calculating the effect of hydraulic retention time and VS crop proportion in the mixture on methane yield from digester and from digestate sto. **Bioresource Technology**, v. 130, p. 689–695, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.137>.

LUERS, F.; SEYFRIED, M.; DANIEL, R.; GOTTSCHALK, G. Glycerol conversion to 1,3-propanediol by. **FEMS Microbiology Letters**, v. 154, p. 337–345, 1997.

MAINTINGUER, S. I.; FERNANDES, B. S.; DUARTE, I. C. S.; SAAVEDRA, N. K.; ADORNO, M. T. . A. T. V. M. B.; VARESCHE, M. B. A.; MAINTINGUER; S.I.; FERNANDES, B.S.; DUARTE, I.C.; SAAVEDRA, N. K. .; ADORNO, M. T. . A. T. V. M. B.; MAINTINGUER, S. I.; FERNANDES, B. S.; DUARTE, I. C. S.; SAAVEDRA, N. K.; ADORNO, M. T. . A. T. V. M. B.; VARESCHE, M. B. A. Fermentative hydrogen production with xylose by *Clostridium* and *Klebsiella* species in anaerobic batch reactors. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, n. 21, p. 13508–13517, 2011.

MAINTINGUER, S. I.; HATANAKA, R. R.; OLIVEIRA, J. E. de. Glycerol as a Raw

Material for Hydrogen Production. *In*: BIOFUELS - STATUS AND PERSPECTIVE, InTech, 2015. p. 580. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5772/60013>.

MALIN, C.; ILLMER, P. Ability of DNA content and DGGE analysis to reflect the performance condition of an anaerobic biowaste fermenter. **Microbiological Research**, v. 163, n. 5, p. 503–511, 2008.

MARAGKAKI, A. E.; FOUNTOULAKIS, M.; GYPAKIS, A.; KYRIAKOU, A.; LASARIDI, K.; MANIOS, T. Pilot-scale anaerobic co-digestion of sewage sludge with agro-industrial by-products for increased biogas production of existing digesters at wastewater treatment plants. **Waste Management**, v. 59, p. 362–370, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.wasman.2016.10.043>.

MAZARELI, R. C. da S.; DUDA, R. M.; LEITE, V. D.; OLIVEIRA, R. A. de. Anaerobic co-digestion of vegetable waste and swine wastewater in high-rate horizontal reactors with fixed bed. **Waste Management**, v. 52, p. 112–121, 2016.

MEIER, T. R. W.; CREMONEZ, P. A.; MANIGLIA, T. C.; SAMPAIO, S. C.; TELEKEN, J. G.; DA SILVA, E. A. Production of biohydrogen by an anaerobic digestion process using the residual glycerol from biodiesel production as additive to cassava wastewater. **Journal of Cleaner Production**, v. 258, 2020.

MONTEIRO, M. R.; KUGELMEIER, C. L.; PINHEIRO, R. S.; BATALHA, M. O.; DA SILVA CÉSAR, A. Glycerol from biodiesel production: Technological paths for sustainability. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 88, n. February, p. 109–122, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.02.019>.

MOTA, C. J. A.; PINTO, B. P.; DE LIMA, A. L. Glycerol: A Versatile Renewable Feedstock for the Chemical Industry. **Glycerol: A Versatile Renewable Feedstock for the Chemical Industry**, p. 1–110, 2017.

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. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.11.057>.

NIZAMI, A. S.; MURPHY, J. D. What type of digester configurations should be employed to produce biomethane from grass silage?. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 6, p. 1558–1568, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2010.02.006>.

NUALSRI, C.; KONGJAN, P.; REUNGSANG, A. Direct integration of CSTR-UASB reactors for two-stage hydrogen and methane production from sugarcane syrup. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, n. 40, p. 17884–17895, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.07.135>.

OLIVEIRA, S. V. W. B.; MORAES, E. M.; ADORNO, M. A. T.; VARESCHE, M. B. A.; FORESTI, E.; ZAIAT, M. Formaldehyde degradation in an anaerobic packed-bed

bioreactor. **Water Research**, v. 38, n. 7, p. 1685–1694, 2004.

OLIVEIRA, G. H. D.; SANTOS-NETO, A. J.; ZAIAT, M. Removal of the veterinary antimicrobial sulfamethazine in a horizontal-flow anaerobic immobilized biomass (HAIB) reactor subjected to step changes in the applied organic loading rate. **Journal of Environmental Management**, v. 204, p. 674–683, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.09.048>.

OLIVEIRA, L. L. de; SILVEIRA DUARTE, I. C.; SAKAMOTO, I. K.; AMÂNCIO VARESCHE, M. B. Influence of support material on the immobilization of biomass for the degradation of linear alkylbenzene sulfonate in anaerobic reactors. **Journal of Environmental Management**, v. 90, n. 2, p. 1261–1268, 2009.

PACHAURI, N.; HE, B. Value-added Utilization of Crude Glycerol from Biodiesel Production : A Survey of Current Research Activities. **American Society of Agriculture and Biological Engineers**, v. 0300, n. 06, p. 1–16, 2006.

PACHIEGA, R.; SAKAMOTO, I. K.; VARESCHE, M. B.; HATANAKA, R. R.; DE OLIVEIRA, J. E.; MAINTINGUER, S. I. Obtaining and Characterization of Mesophilic Bacterial Consortia from Tropical Sludges Applied on Biohydrogen Production. **Waste and Biomass Valorization**, 2018.

PAN, C.; TAN, G. Y. A.; GE, L.; CHEN, C. L.; WANG, J. Y. Two-stage microbial conversion of crude glycerol to 1,3-propanediol and polyhydroxyalkanoates after pretreatment. **Journal of Environmental Management**, v. 232, n. November 2018, p. 615–624, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.11.118>.

PASSOS, F.; BRESSANI-RIBEIRO, T.; REZENDE, S.; CHERNICHARO, C. A. L. Potential applications of biogas produced in small-scale UASB-based sewage treatment plants in Brazil. **Energies**, v. 13, n. 13, 2020.

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

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

RÁDULY, B.; GYENGE, L.; SZILVESZTER, S.; KEDVES, A.; CROGNALÉ, S. Treatment of corn ethanol distillery wastewater using two-stage anaerobic digestion. **Water Science and Technology**, v. 74, n. 2, p. 431–437, 2016.

RAJASULOCHANA, P.; PREETHY, V. Comparison on efficiency of various techniques in treatment of waste and sewage water – A comprehensive review. **Resource-Efficient Technologies**, v. 2, n. 4, p. 175–184, 2016. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405653716301683>. Acesso em: 2

nov. 2016.

REN21. **Renewables 2019 Global Status Report**. 2019.v. 8. Disponível em: https://www.ren21.net/wp-content/uploads/2019/05/gsr_2019_full_report_en.pdf.

RICCI, M. A.; RUSSO, A.; PISANO, I.; PALMIERI, L.; DE ANGELIS, M.; AGRIMI, G. Improved 1,3-propanediol synthesis from glycerol by the robust *Lactobacillus reuteri* strain DSM 20016. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 6, p. 893–902, 2015.

RIVERO, M.; SOLERA, R.; PEREZ, M. Anaerobic mesophilic co-digestion of sewage sludge with glycerol: Enhanced biohydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 6, p. 2481–2488, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.12.006>.

RODRIGUES, C. V.; NESPECA, M. G.; SAKAMOTO, I. K.; DE OLIVEIRA, J. E.; AMÂNCIO VARESCHE, M. B.; MAINTINGUER, S. I. Bioconversion of crude glycerol from waste cooking oils into hydrogen by sub-tropical mixed and pure cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 4, p. 144–154, 2019.

RODRIGUES, C. V.; OLIVEIRA SANTANA, K.; NESPECA, M. G.; VARELLA RODRIGUES, A.; OLIVEIRA PIRES, L.; MAINTINGUER, S. I. Energy valorization of crude glycerol and sanitary sewage in hydrogen generation by biological processes. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 45, n. 21, p. 11943–11953, 2020.

RODRIGUEZ, R. P.; VICH, D. V.; GARCIA, M. L.; VARESCHE, M. B. A.; ZAIAT, M. Application of horizontal-flow anaerobic immobilized biomass reactor for bioremediation of acid mine drainage. **Journal of Water and Health**, v. 14, n. 3, p. 399–410, 2016.

ROGERS, P.; CHEN, J. S.; ZIDWICK, M. J. **Organic acid and solvent production: Acetic, lactic, gluconic, succinic, and polyhydroxyalkanoic acids**, 2014. 2014.

ROSSI, D. M.; DA COSTA, J. B.; DE SOUZA, E. A.; PERALBA, M. do 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. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2011.08.005>.

SAIA, F. T.; DAMIANOVIC, M. H. R. Z.; CATTONY, E. B. M.; BRUCHA, G.; FORESTI, E.; VAZOLLER, R. F. Anaerobic biodegradation of pentachlorophenol in a fixed-film reactor inoculated with polluted sediment from Santos-São Vicente Estuary, Brazil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, n. 3, p. 665–672, 2007.

SANFORD, S. D.; WHITE, J. M.; SHAH, P. S.; WEE, C.; VALVERDE, M. A.; MEIER, G. R. Feedstock and biodiesel characteristics report. **Renewable Energy Group**, n. 1–136, p. 416, 2009.

SANTANA, A. M. de; OLIVEIRA, R. A. de. Desempenho de reatores anaeróbios de fluxo

ascendente com manta de lodo em dois estágios tratando águas residuárias de suinocultura. **Engenharia Agrícola**, v. 25, n. 3, p. 817–830, 2005.

SANTOS, A. C. dos; OLIVEIRA, R. A.; SANTOS, ARIANE C. DOS; OLIVEIRA, R. A. Tratamento De Águas Residuárias De Suinocultura Em Reatores Anaeróbios Horizontais Seguidos De Reator Aeróbio Em Batelada Sequencial. **Engenharia Agrícola**, v. 31, n. 4, p. 781–794, 2011.

SARTI, A. **Avaliação de Desempenho do Reator Anaeróbio Horizontal de Leito Fixo (RAHLF) no Tratamento de Substrato Sintético Simulando Esgoto Sanitário**. 1998. - Universidade de São Paulo, São Carlos - SP, 1998.

SAWASDEE, V.; HAOSAGUL, S.; PISUTPAISAL, N. Co-digestion of waste glycerol and glucose to enhance biogas production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 44, n. 56, p. 29575–29582, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.03.144>.

SCHWINGEL, A. W.; ORRICO, A. C. A.; DE LUCAS JUNIOR, J.; ORRICO JUNIOR, M. A. P.; ASPILCUETA BORQUIS, R. R.; FAVA, A. F.; WATTE, A.; CAROLINA, A.; ORRICO, A. C. A.; LUCAS, J. De; ANTONIO, M.; ORRICO, P.; RAUL, R.; BORQUIS, A.; FELIPE, A.; SCHWINGEL, A. W.; ORRICO, A. C. A.; DE LUCAS JUNIOR, J.; ORRICO JUNIOR, M. A. P.; ASPILCUETA BORQUIS, R. R.; FAVA, A. F. Laying hen manure in anaerobic Co-Digestion with glycerin containing different glycerol and impurity levels. **Journal of Cleaner Production**, v. 215, p. 1437–1444, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.01.125>.

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

SILVA, S. R.; AGUIAR, M. M. De; MENDONÇA, A. S. F. Correlação entre DBO e DQO em esgotos domésticos para a região da Grande Vitória - ES. **XIX Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental**, n. 1, p. 981–990, 1997.

SILVA, J. A. da; F.M. BRAGA, A.; FERMOSE, F. G.; ZAIAT, M.; SILVA, G. H. R. Evaluation of the influence of trace metals on methane production from domestic sewage, using the Plackett-Burman experimental design. **Journal of Environmental Management**, v. 294, 2021.

SILVA, F. M. S.; OLIVEIRA, L. B.; MAHLER, C. F.; BASSIN, J. P. Hydrogen production through anaerobic co-digestion of food waste and crude glycerol at mesophilic conditions. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 36, p. 22720–22729, 2017.

SINGH, S. P.; PRERNA, P. Review of recent advances in anaerobic packed-bed biogas reactors. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 13, n. 6–7, p. 1569–1575, 2009.

SITTIJUNDA, S.; REUNGSANG, A. Fermentation of hydrogen, 1,3-propanediol and ethanol from glycerol as affected by organic loading rate using up-flow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 45, p. 27558–27569, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.05.149>.

SITTIJUNDA, S.; REUNGSANG, A. Valorization of crude glycerol into hydrogen, 1,3-propanediol, and ethanol in an up-flow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor under thermophilic conditions. **Renewable Energy**, v. 161, p. 361–372, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.07.053>.

SPEECE, R. E. **Anaerobic Biotechnology and Odor/Corrosion Control for Municipalities and Industries**. Nashville, Tennessee: Archae Press, 2008. 2008.

SUN, Y. Q.; SHEN, J. T.; YAN, L.; ZHOU, J. J.; JIANG, L. L.; CHEN, Y.; YUAN, J. L.; FENG, E. M.; XIU, Z. L. Advances in bioconversion of glycerol to 1,3-propanediol: Prospects and challenges. **Process Biochemistry**, v. 71, n. April, p. 134–146, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.05.009>.

TANGKATHITIPONG, P.; INTANOO, P.; BUTPAN, J. Separate production of hydrogen and methane from biodiesel wastewater with added glycerin by two-stage anaerobic sequencing batch reactors (ASBR). **Renewable Energy**, v. 113, p. 1077–1085, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2017.06.056>.

TEMUDO, M. F.; POLDERMANS, R.; KLEEREBEZEM, R.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M. Glycerol fermentation by (open) mixed cultures: A chemostat study. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 100, n. 6, p. 1088–1098, 2008.

VASCONCELOS, E. A. F.; SANTAELLA, S. T.; VIANA, M. B.; DOS SANTOS, A. B.; PINHEIRO, G. C.; LEITÃO, R. C. Composition and ecology of bacterial and archaeal communities in anaerobic reactor fed with residual glycerol. **Anaerobe**, v. 59, p. 145–153, 2019. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1075996419301118>.

VERAS, S. T. S.; ROJAS, P.; FLORENCIO, L.; KATO, M. T.; SANZ, J. L. Production of 1,3-propanediol from pure and crude glycerol using a UASB reactor with attached biomass in silicone support. **Bioresource Technology**, v. 279, n. January, p. 140–148, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.01.125>.

VERONEZE, M. L.; SCHWANTES, D.; GONÇALVES, A. C.; RICHART, A.; MANFRIN, J.; DA PAZ SCHILLER, A.; SCHUBA, T. B.; LUIZA, M.; SCHWANTES, D.; CELSO, A.; JR, G.; RICHART, A. Production of biogas and biofertilizer using anaerobic reactors with swine manure and glycerin doses. **Journal of Cleaner Production**, v. 213, p. 176–184, 2019.

VIVEK, N.; PANDEY, A.; BINOD, P. Biological valorization of pure and crude glycerol into 1,3-propanediol using a novel isolate *Lactobacillus brevis* N1E9.3.3. **Bioresource Technology**, v. 213, p. 222–230, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.02.020>.

VON SPERLING, M. **Princípios do tratamento biológico de águas residuárias – Princípios básicos do tratamento de esgotos**. 1996. - Universidade Federal de Minas Gerais, 1996.

WANG, X.; CUI, H.; SHI, J.; ZHAO, X.; ZHAO, Y.; WEI, Z. Relationship between bacterial diversity and environmental parameters during composting of different raw materials. **Bioresource Technology**, v. 198, p. 395–402, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.09.041>.

WISCHRAL, D.; ZHANG, J.; CHENG, C.; LIN, M.; DE SOUZA, L. M. G.; PESSOA, F. L. P.; PEREIRA, N.; YANG, S. T. Production of 1,3-propanediol by *Clostridium beijerinckii* DSM 791 from crude glycerol and corn steep liquor: Process optimization and metabolic engineering. **Bioresource Technology**, v. 212, p. 100–110, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.020>.

WU, Y.; WANG, C.; LIU, X.; MA, H.; WU, J.; ZUO, J.; WANG, K. A new method of two-phase anaerobic digestion for fruit and vegetable waste treatment. **Bioresource technology**, v. 211, p. 16–23, 2016. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852416303443>. Acesso em: 20 jan. 2017.

XIE, S.; LAWLOR, P. G.; FROST, J. P.; HU, Z.; ZHAN, X. Effect of pig manure to grass silage ratio on methane production in batch anaerobic co-digestion of concentrated pig manure and grass silage. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 10, p. 5728–5733, 2011.

YAO, Y.; LUO, Y.; YANG, Y.; SHENG, H.; LI, X.; LI, T.; SONG, Y.; ZHANG, H.; CHEN, S.; HE, W.; HE, M.; REN, Y.; GAO, J.; WEI, Y.; AN, L. Water free anaerobic co-digestion of vegetable processing waste with cattle slurry for methane production at high total solid content. **Energy**, v. 74, n. C, p. 309–313, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.energy.2014.06.014>.

YAZDANI, S. S.; GONZALEZ, R. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, n. 3, p. 213–219, 2007.

YUN, J.; YANG, M.; MAGOCHA, T. A.; ZHANG, H.; XUE, Y.; ZHANG, G.; QI, X.; SUN, W. Production of 1,3-propanediol using a novel 1,3-propanediol dehydrogenase from isolated *Clostridium butyricum* and co-biotransformation of whole cells. **Bioresource Technology**, v. 247, n. July 2017, p. 838–843, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.180>.

ZAIAT, M. **Desenvolvimento e análise de biorreatores anaeróbios contendo células imobilizadas para o tratamento de águas residuárias: reator anaeróbio horizontal de leito fixo e reator anaeróbio operado em bateladas sequenciais**. 2003. 122 f. - Universidade de São Paulo, São Carlos - SP, 2003.

ZAIAT, M.; CABRAL, A. K. A.; FORESTI, E. Reator Anaeróbio Horizontal de Leito Fixo Para Tratamento de Águas Residuárias: Concepção e Avaliação Preliminar de

Desempenho. **Revista Brasileira de Engenharia**, v. 11, n. 2, p. 33–42, 1994.

ZAIAT, M.; PASSIG, F. H.; FORESTI, E. Aplicação De Reator Anaeróbio Horizontal De Leito Fixo Para Tratamento De Esgoto Doméstico – Parte 1: Modelo Matemático E Critérios Para Projeto. **Gestión ambiental en el siglo XXI**, v. XXI, p. 1–14, 1998.

ZAIAT, M.; VIEIRA, L. G. T.; CABRAL, A. K. A.; NARDI, I. R. de; VELA, F. J.; FORESTI, E. Rational Basis for Designing Horizontal-Flow Anaerobic Immobilized Sludge (HAIS) Reactor for Wastewater Treatment. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 14, n. 1, p. 251–262, 1997. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-66321997000100001&lng=en&nrm=iso&tlng=en.

ZAMARIOLLI DAMIANOVIC, M. H. R.; SAIA, F. T.; DE GODOI, L. A. G.; FORESTI, E. Long-term operation of anaerobic immobilized biomass reactor treating organic wastewater containing sulfate. **Journal of Water Process Engineering**, v. 13, p. 100–106, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jwpe.2016.08.009>.

ZENG, A. P.; SABRA, W. Microbial production of diols as platform chemicals: Recent progresses. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, n. 6, p. 749–757, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2011.05.005>.

ZHAO, Y.; WU, J.; YUAN, X.; ZHU, W.; WANG, X.; CHENG, X.; CUI, Z. The effect of mixing intensity on the performance and microbial dynamics of a single vertical reactor integrating acidogenic and methanogenic phases in lignocellulosic biomass digestion. **Bioresource Technology**, v. 238, p. 542–551, 2017. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852417305874>.

ZHOU, H.; JIANG, J.; ZHAO, Q.; LI, L.; WANG, K.; WEI, L. Effects of organic loading rates on high-solids anaerobic digestion of food waste in horizontal flow reactor: Methane production, stability and mechanism. **Chemosphere**, v. 293, n. January, p. 133650, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.133650>.

ZHOU, J. J.; SHEN, J. T.; JIANG, L. L.; SUN, Y. Q.; MU, Y.; XIU, Z. L. Selection and characterization of an anaerobic microbial consortium with high adaptation to crude glycerol for 1,3-propanediol production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 15, p. 5985–5996, 2017.

APENDICE A – Atividades desenvolvidas durante doutorado sanduíche**PROPOSTA PARA UTILIZAÇÃO DA BIOMASSA DE ALGAS CULTIVADAS EM PÓS-TRATAMENTOS DE EFLUENTES DE REATORES ANAERÓBIOS: AVALIAÇÃO DO EFEITO BIOESTIMULANTE DAS MICROALGAS CHLORELLA VULGARIS E SCENEDESMUS SP. EM SEMENTES DE TOMATE (SOLANUM LYCOPERSICUM)**

Apresentação dos resultados parciais referentes a pesquisa realizada em parceria com Institut National de la Recherche Scientifique (INRS), Quebec City, Canadá; sob supervisão da Dra. Pascale Champagne, durante programa de doutorado sanduiche CAPES-PRINT.

1 INTRODUÇÃO

A integração da digestão anaeróbia com usos emergentes para o efluente digerido pode oferecer oportunidades econômicas adicionais para as empresas. Além de evitar potenciais agentes inibitórios, o uso destes efluentes gerados após a digestão anaeróbia podem ser utilizados para a extração de produtos de valor agregado, cultivo de algas, produção de biocarvão e hidrocarvão (O'CONNOR *et al.*, 2022). O cultivo de microalgas em efluentes de reatores anaeróbios para produção de biomassa e remoção de nutrientes, já vem sendo estudado como estratégia de reciclagem de resíduos no setor de alimentos e agricultura (CHUKA-OGWUDE *et al.*, 2020).

A disposição regular de efluentes ricos em nutrientes em corpos d'água pode levar a fenômenos de eutrofização devido à proliferação descontrolada de algas (micro e macro). Este problema é particularmente crítico quando tais efluentes com altas cargas orgânicas e inorgânicas são lançadas em ambientes aquáticos com baixas taxas de dispersão, como lagos ou estuários (FONSECA *et al.*, 2021). A estratégia de uso de microalgas para recuperação destes micros e macronutrientes pode resultar em processos de remediação com redução de emissões, economia de energia e baixo custo quando comparado aos processos convencionais (APANDI *et al.*, 2019; NITSOS *et al.*, 2020).

Nutrientes como nitrogênio e fósforo, e a água necessários para o cultivo de microalgas estão prontamente disponíveis em águas residuárias de reatores anaeróbios. A utilização destes pode gerar cortes de custos significativos para o cultivo de microalgas,

ao mesmo tempo em que se trata as águas residuais a níveis próprios para despejo (CHIA *et al.*, 2018).

Wang *et al.*, (2010) utilizaram a espécie de microalga *Chlorella vulgaris* e obtiveram remoções de 93,6% de nitrogênio total e 89,2% de fosforo total do efluente de um reator anaeróbio plug-flow utilizado no tratamento de esterco bovino. Shin *et al.*, (2015) atingiriam remoções de 86,6% de nitrogênio e 90,5% de fósforo com o cultivo de *Scenedesmus bijuga* no efluente proveniente da estação de tratamento de resíduos de alimentos.

A biomassa de microalgas obtida durante seu cultivo em efluentes de reatores anaeróbios pode ser convertida em uma variedade de produtos. Os lipídios da biomassa podem ser convertidos em biodiesel (GONZÁLEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2018; KOUTRA *et al.*, 2018), a biomassa também pode ser usada como ração animal, ou biofertilizante (CHUKA-OGWUDE *et al.*, 2020; STOUVENAKERS *et al.*, 2019) e na fermentação, para produção de bioetanol e biobutanol (CHEN *et al.*, 2018). Esta biomassa do cultivo de microalgas também pode ser utilizada como matéria-prima para a digestão anaeróbia (CORREA *et al.*, 2019; GONZÁLEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2018). Porém, nos últimos anos o potencial efeito bioestimulante que as algas possuem sob algumas plantas é algo que vem despertando grande interesse e estimulando novas pesquisas, principalmente pelo seu benefício na agricultura (GONÇALVES, 2021; RACHIDI *et al.*, 2020; RONGA *et al.*, 2019).

De acordo com a regulamentação feita pela União Europeia, os bioestimulantes de plantas são definidos principalmente por meio de sua ação alegada, ou seja, pela resposta que provocam na planta e não somente por sua composição (EUROPEAN COMMISSION, 2016).

Os bioestimulantes vegetais são compostos naturais que desencadeiam processos fisiológicos e moleculares que modulam o rendimento e a qualidade das culturas, embora sua função principal não seja fornecer nutrientes (fertilizantes) nem proteger as plantas contra pragas e patógenos do solo ou foliares (Produtos Fitossanitários) (DU JARDIN, 2015; ROUPHAEL; COLLA, 2018).

Uma grande variedade de compostos biologicamente ativos extraídos de algas e cianobactérias (fenóis, terpenóides, ácidos graxos livres, polissacarídeos e carotenoides,

dentre outros) demonstraram ter efeitos promissores na bioestimulação de cultivares (GONÇALVES, 2021; SINGH *et al.*, 2017). De acordo com a literatura, metabólitos de algas podem desempenhar um papel importante na fertilização do solo, proteção de plantas contra estresse biótico e abiótico e no desenvolvimento vegetal. Além disso, microalgas e cianobactérias também apresentam fitohormônios, que são conhecidos por sua atividade como promotores de crescimento de plantas (HAN *et al.*, 2018; LU; XU, 2015).

Apesar de ainda poucos estudos e a lacuna de como cada espécie de alga pode afetar determinada espécie de planta, os bioestimulantes à base de microalgas apresentam alta eficiência, biodegradabilidade e ausência de fitotoxicidade, tornando-os produtos promissores para a produção vegetal (NAVARRO-LÓPEZ *et al.*, 2020). Dentre os efeitos reportados destaca-se sua atuação benéfica na germinação de sementes, crescimento das plantas, rendimento, floração e produção de frutos, bem como na vida útil pós-colheita (KUSVURAN, 2021; MUTALE-JOAN *et al.*, 2020; PUGLISI *et al.*, 2020; RACHIDI *et al.*, 2020). Neste sentido, o presente estudo tem como objetivo a avaliação do efeito bioestimulador das microalgas *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus* sp. com diferentes pré-tratamentos, referente a germinação de sementes de tomate.

2 MATERIAIS E MÉTODO

2.1 Cultivo

As microalgas *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus* sp. foram isoladas de culturas do Laboratório de Bioprocessos do INRS, Quebec, QC, Canada. As culturas foram reativadas em Erlenmeyer de 100 mL e posteriormente transferidas para um Erlenmeyer de 500 mL até atingirem a concentração de massa seca de 600 mg L⁻¹. A biomassa foi medida como massa seca filtrando 5 mL de amostras de cultura em filtros de microfibra de vidro previamente pesados (GC-50). Os filtros com as células foram lavados duas vezes com água deionizada, secos em estufa a 105°C por 8 h, depois transferidos para um dessecador para equilibrar a temperatura de laboratório e pesados (precisão de ± 0,01 mg) (RANGLOVÁ *et al.*, 2019).

As culturas foram mantidas em mesa agitadora a 110 rpm, dentro de estufa incubadora a 20°C, em ciclos de 12 h de luz, a 150 µmol m⁻² s⁻¹ e 12 h no escuro. Todas as

culturas foram crescidas em meio BBM autoclavado com as concentrações descritas por Andersen (2005).

2.2 Pré-tratamento

Para o ensaio com ruptura das células das algas foi aplicado um pré-tratamento com aplicação de ultrassom. Foi utilizado um sonicador com microprobeira (Branson 150, 40kHz) com amplitude a 50% em pulsos de 50 ms ligado, 50 ms desligado durante 5 minutos. A amostra foi mantida em banho de gelo para evitar aquecimento. Antes do tratamento a cultura de algas foi centrifugada (5000 rpm, 5 minutos), o sobrenadante foi utilizado em outro tratamento, e a biomassa suspendida novamente em água destilada, mantendo a concentração de 600 mg L⁻¹.

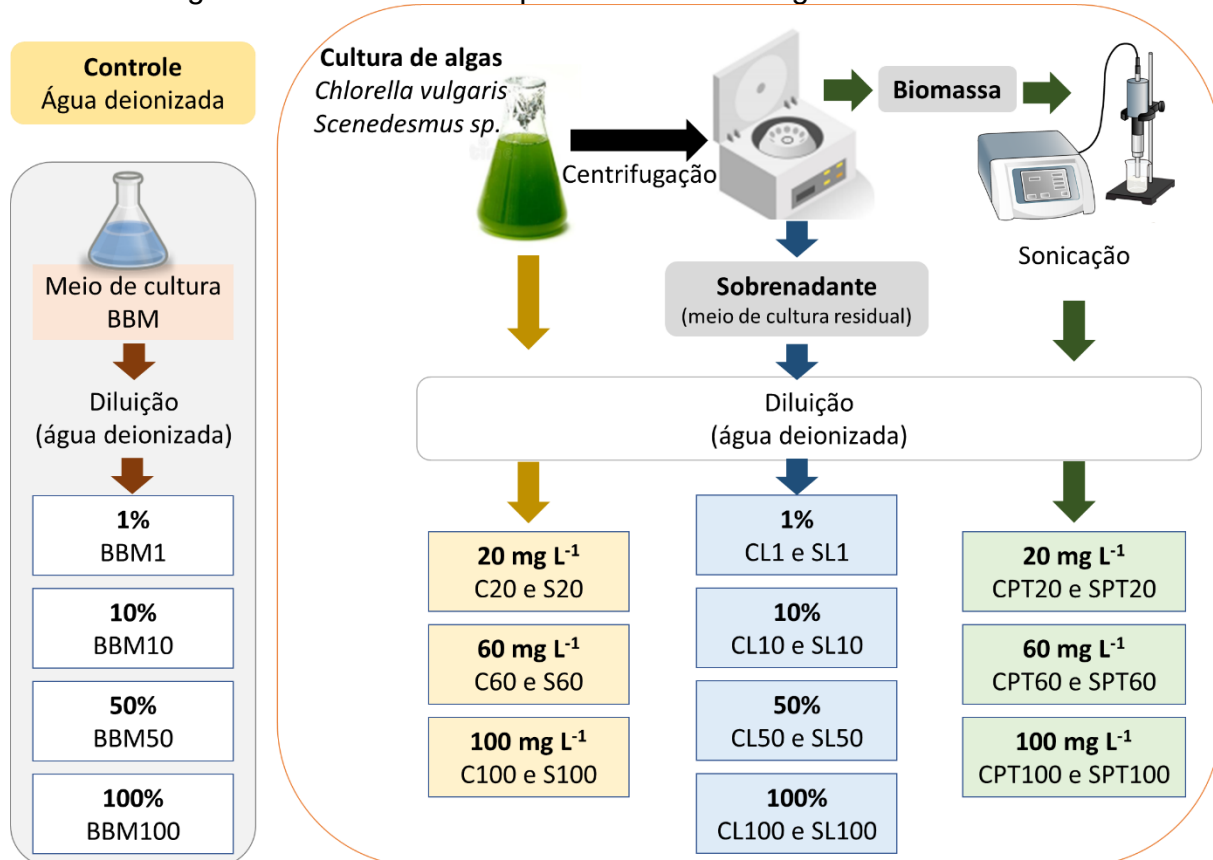
2.3 Design experimental e inoculação

Para o teste foram utilizadas sementes comerciais de tomate da fabricante McKenzie (Super Sweet 100 F1 VF). Papel de filtro qualitativo Whatman G1 foi autoclavado e posteriormente inserido em placas de petri de 90x15mm descartáveis. Os tratamentos foram realizados em triplicada de placas, onde cada placa continha 10 sementes. Em cada placa foi inoculado 3 mL da solução sob as sementes, para cada tratamento. As placas com as sementes inoculadas foram seladas com Parafilm e mantidas na estufa a 20°C.

O fluxograma da **Figura 1** sumariza as etapas e diferentes tratamentos realizados. Além do controle com água destilada, foi realizado um controle com o meio de cultura BBM, diluído em água deionizada nas concentrações de 1, 10, 50 e 100% (BBM puro) e chamados de BBM1, BBM10, BBM50 e BBM100. O tratamento com a cultura fresca das algas, sem nenhum pré-tratamento, foi realizado nas concentrações de 20, 60 e 100 mg L⁻¹ (peso seco). Os tratamentos com *Chlorella* foram nomeados de C20, C60 e C100 e os com *Scenedesmus* S20, S60, S100. O tratamento com aplicação de sonicação para ruptura das células foi realizado nas concentrações de 20, 60 e 100 mg L⁻¹ e os tratamentos com *Chlorella* foram nomeados de CPT20, CPT60 e CPT100 e os com *Scenedesmus* SPT20, SPT60, SPT100. O sobrenadante obtido após a centrifugação foi diluído em água deionizada nas concentrações de 1, 10, 50 e 100% e os tratamentos com *Chlorella* nomeados de CL1, CL10, CL50 e CL100, e com *Scenedesmus* de SL1,

SL10, SL50 e SL100. O controle experimental foi realizado com a inoculação de 3 ml de água deionizada estéril em triplicata.

Figura 1 - Fluxograma com os diferentes tratamentos com as culturas de microalgas *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus sp.* e controle com água e meio de cultura BBM



2.4 Avaliação do efeito bioestimulante

As placas com as sementes foram fotografadas diariamente do quarto ao sexto dia após inoculação (**Figura 2**), e as radículas das sementes medidas através do software ImageJ (National Institutes of Health, US). O índice de germinação foi calculado de acordo com a equação 1 (NAVARRO-LÓPEZ *et al.*, 2020).

$$\text{Índice de Germinação (\%)} = \frac{G \times T}{G_c \times T_c} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

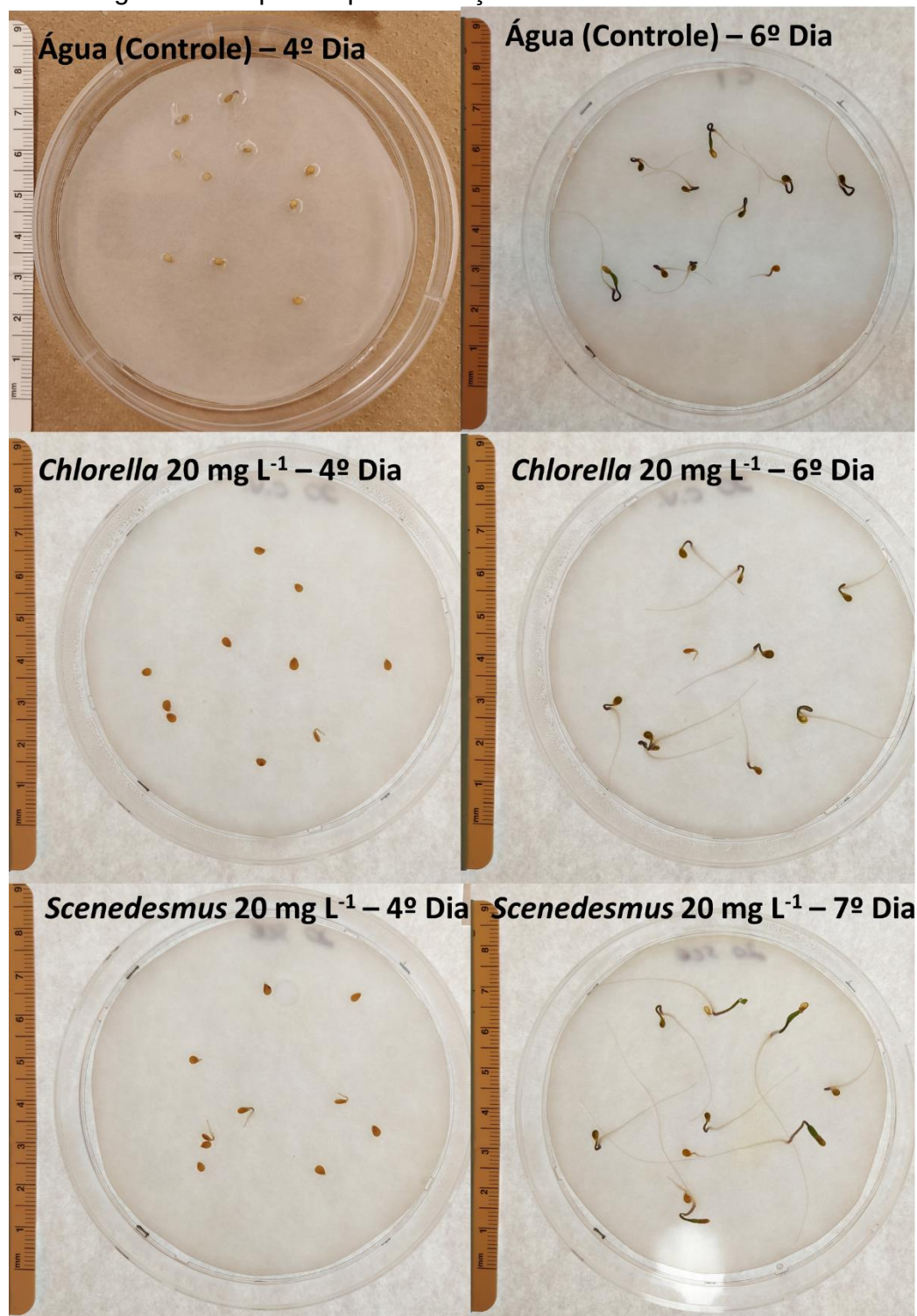
G: Número de sementes germinadas no tratamento

T: Tamanho da radícula das sementes do tratamento

Gc: Número de sementes germinadas no controle com água destilada

Tc: Tamanho da radícula das sementes do controle com água destilada

Figura 2 - Fotografias das placas para medição das radículas das sementes



A pandemia de COVID19 causou atrasos no andamento da pesquisa devido as restrições impostas pelo governo de Quebec, QC em resposta ao agravamento dos casos na cidade. O andamento do projeto foi prejudicado, necessitando adaptações e modificações. As análises da biomassa (carboidratos, proteínas, lipídeos, nitratos, pigmentos) necessárias para se efetivar maiores conclusões, serão posteriormente realizadas pelo pós-doutorando Gustavo Leite no laboratório do INRS. Os resultados parciais obtidos estão apresentados na próxima seção.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para avaliar a atividade bioestimulante de extratos ou produtos de microalgas duas abordagens podem ser realizadas: análise química completa da composição elementar, teor e perfil de aminoácidos e teor de fito hormônios. A segunda estratégia busca avaliar diretamente os efeitos na planta tais como a avaliação do crescimento de radículas e o cálculo do índice de germinação de sementes, realizadas neste presente estudo (NAVARRO-LÓPEZ *et al.*, 2020).

Para determinar o índice de germinação (IG) foi necessário levar em conta que um IG de 100% é atribuído à água deionizada (controle) e, portanto, apenas os tratamentos que apresentaram valores superiores a 100% foram considerados como tendo atividade bioestimulante. Após 4 dias de incubação o maior IG ocorreu no ensaio com a cultura de algas *Scenedesmus* que receberam pré-tratamento com ultrassom na concentração de 100 mg L⁻¹ (SPT100) (**Figura 3**). O tratamento SPT100 obteve um IG médio de 568% no quarto dia, e atingiu o tamanho de radícula de 14,11 ±6,36 mm (**Figura 4**).

Referente aos tratamentos utilizando as culturas de algas puras sem nenhum pré-tratamento (C20, C60, C100, S20, S60, S100), todas as concentrações testadas apresentaram IG abaixo de 100% no quarto dia. Os tratamentos com o meio de cultura BBM em diferentes concentrações, foram realizados para verificação de como os nutrientes poderiam contribuir ou não para o favorecimento da germinação. Após 4 dias os tratamentos com BBM não favoreceram a germinação, apresentando IG abaixo de 100%. A utilização da cultura fresca não favoreceu o início da germinação, podendo ter sido atrapalhada pelo metabolismo ainda ativo das células das algas. Ronga *et al.*, (2019), conseguiram atingir IG de até 153% com a espécie de microalga *Arthrospira*

platensis utilizando 4 mL do extrato na concentração de 50 mg L⁻¹ após a liofilização da cultura de algas.

Com ensaios realizados apenas com o meio de cultura em que as algas se desenvolveram (CL1, CL10, CL50, CL100, SL 1, SL10, SL50, SL100), buscava-se averiguar se as moléculas produzidas pelo metabolismo das microalgas poderiam ter efeito bioestimulante vegetal. Os melhores IG atingidos com este meio de cultura residual foram de 478,2 ±93,3% e 478,6 ±81,6%, para 1% (CL1) e 10% (CL10), respectivamente. Pode se observar, principalmente no meio de cultura residual de *Scenedesmus* sp., que o aumento da concentração reduziu o IG (**Figura 3**).

Figura 3 – Índice de Germinação das sementes tratadas com as culturas de microalgas de *Chlorella vulgaris* (C.) e *Scenedesmus* sp. (S.) e controle após 4 dias de incubação, considerando o controle de água deionizada (100%).

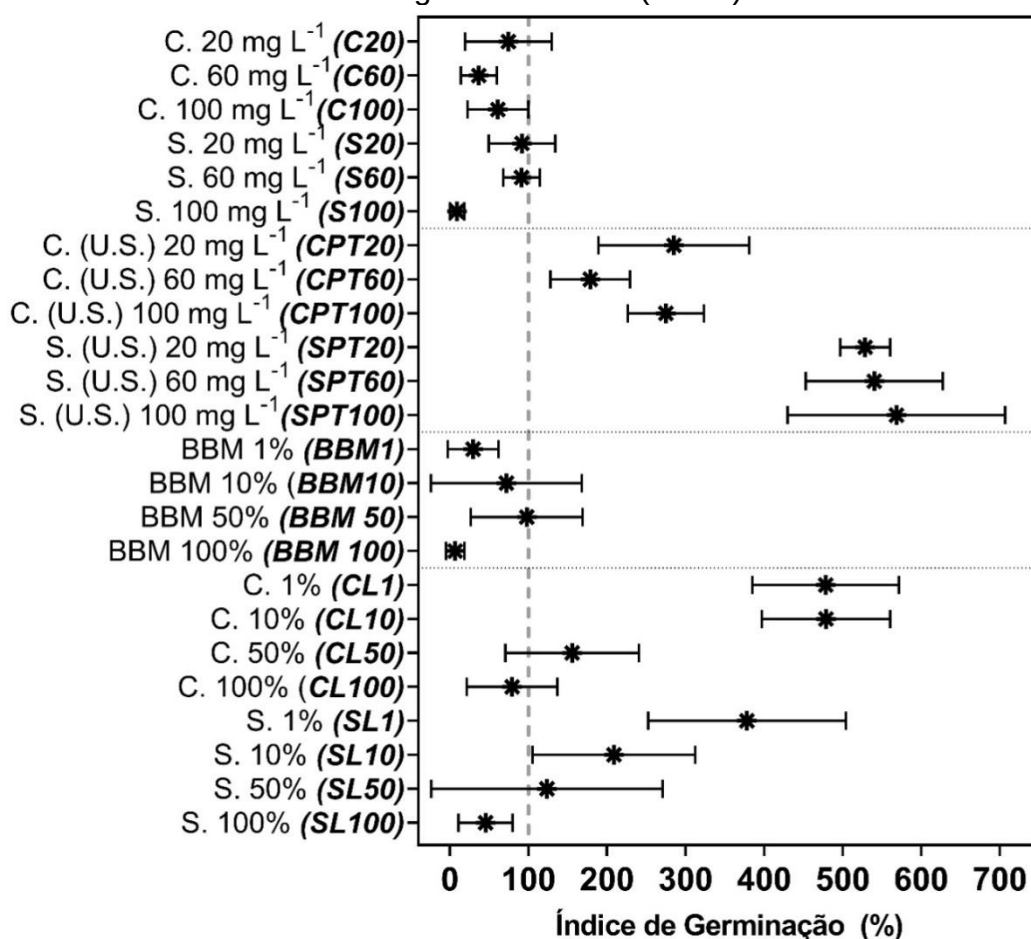
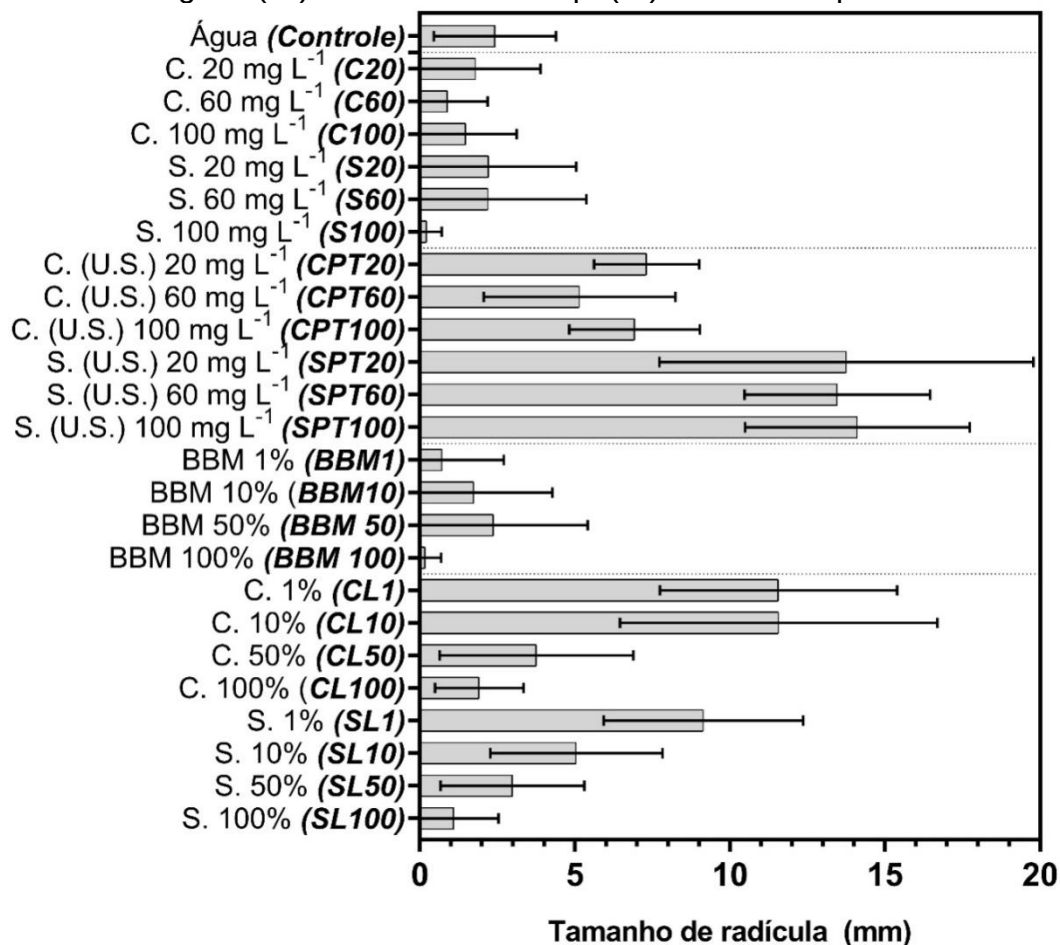


Figura 4 - Tamanho da radícula das sementes tratadas com as culturas das microalgas *Chlorella vulgaris* (C.) e *Scenedesmus* sp. (S.) e controle após 4 dias de incubação



Após 6 dias de incubação, todos os tratamentos com as microalgas apresentaram efeito bioestimulante (IG > 100%), exceto o tratamento S100 (cultura fresca de *Scenedesmus* sp. 100 mg L⁻¹). Ao utilizar a cultura de células de microalgas vivas, o tratamento com maior concentração de células foi capaz de manter suas atividades metabólicas ainda utilizando água e assim diminuindo a disponibilidade para as sementes, retardando a germinação.

No sexto dia os tratamentos aplicados com ambas as espécies de microalgas apresentaram capacidade de bioestimulação do enraizamento durante a germinação das sementes de tomate. O meio de cultura residual sem a presença da biomassa das algas também obteve sucesso na bioestimulação, podendo ser referente a biomoléculas secretadas pelas algas ou resultado da liberação de produtos após a morte das células. Porém as menores concentrações foram mais favoráveis, e pode se notar uma tendencia

de inibição quanto mais próximo do uso do meio de cultura residual puro (CL100 e SL100) (**Figura 5**).

Diversas biomoléculas são produzidas pelas algas e a liberação destas no meio que são cultivadas pode ter gerado respostas inibitórias a germinação das sementes. O ácido abscísico regula a maturação das sementes e as respostas ao estresse nas plantas (TAN *et al.*, 1997). Níveis elevados de ácido abscísico reduzem a síntese de etileno que inibe o transporte de auxina e a biossíntese (MCADAM; BRODRIBB, 2016). O ácido abscísico e as citocininas são reguladores da resposta celular a estresses abióticos. Em microalgas, as vias biossintéticas de ácido abscísico e citocininas são reguladas para cima e para baixo, respectivamente, após uma deficiência de N (LU *et al.*, 2014). As giberelinas regulam a germinação de sementes, alongamento do caule, expansão das folhas e flores (BOSE *et al.*, 2013). As giberelinas e auxinas atuam sinergicamente, e os níveis de giberelinas são regulados positivamente pelas auxinas. Por outro lado, existem efeitos antagônicos entre os níveis de giberelinas e ácido abscísico, bem como entre os níveis de giberelinas e citocinina (STIRK *et al.*, 2009; TSAVKELOVA *et al.*, 2006). A quantificação destas moléculas no meio de cultura residual é de extrema importância para determinar possíveis influências e até avaliar a conduta de descarte deste meio gerado no cultivo de microalgas.

Os maiores IG observados no sexto dia de incubação foram $327 \pm 6\%$ e $316 \pm 14\%$ para as concentrações de 20 e 100 mg L⁻¹ de *Scenedesmus* sp. com pré-tratamento de sonicação (**Figura 5**). Para a avaliação de extração de diclorometano em *C. vulgaris*, Stirk *et al.*, (2021) utilizando sonicação atingiu a extração de até 3,3% sob o peso da biomassa seca. Um estudo de bioatividade utilizando *Chlorella* mostrou que os extratos de diclorometano apresentaram maior atividade antioxidante nos ensaios de DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) e ácido β -caroteno-linoleico em comparação com extratos metanoicos (AREMU *et al.*, 2016). A ruptura das células com a aplicação de ultrassom pode ter contribuído para liberação deste e demais compostos que atuaram ativamente no metabolismo da semente de tomate.

Os resultados de IG obtidos com as sementes de tomate se mostraram superiores aos observados por Navarro-López *et al.*, (2020) na avaliação da bioestimulação vegetal de sementes de agrião utilizando cultura de *Scenedesmus obliquus*. Os autores testaram

diferentes concentrações (0,1; 0,5 e 2 g L⁻¹) da cultura de algas com e sem pré-tratamento de sonicação, obtendo o melhor IG (140%) com a concentração de 0,1 g L⁻¹. Isto indica que as quantidades necessárias na fase de germinação podem ser mantidas abaixo de 100 mg L⁻¹ de matéria seca, não dependendo do alcance de altas densidades de culturas de microalgas. Resultados similares foram obtidos por Ranglová *et al.*, (2021) durante a avaliação do efeito bioestimulante de duas concentrações (0,5 e 2 g L⁻¹) de *Chlorella vulgaris* (MACC-1) em sementes de feijão moyashi, o efeito estimulante foi observado apenas na menor concentração de massa seca com IG de 115,7%.

Figura 5 - Índice de Germinação das sementes tratadas com as culturas de microalgas de *Chlorella vulgaris* (C.) e *Scenedesmus* sp. (S.) e controle após 4 dias de incubação, considerando o controle de água deionizada (100%).

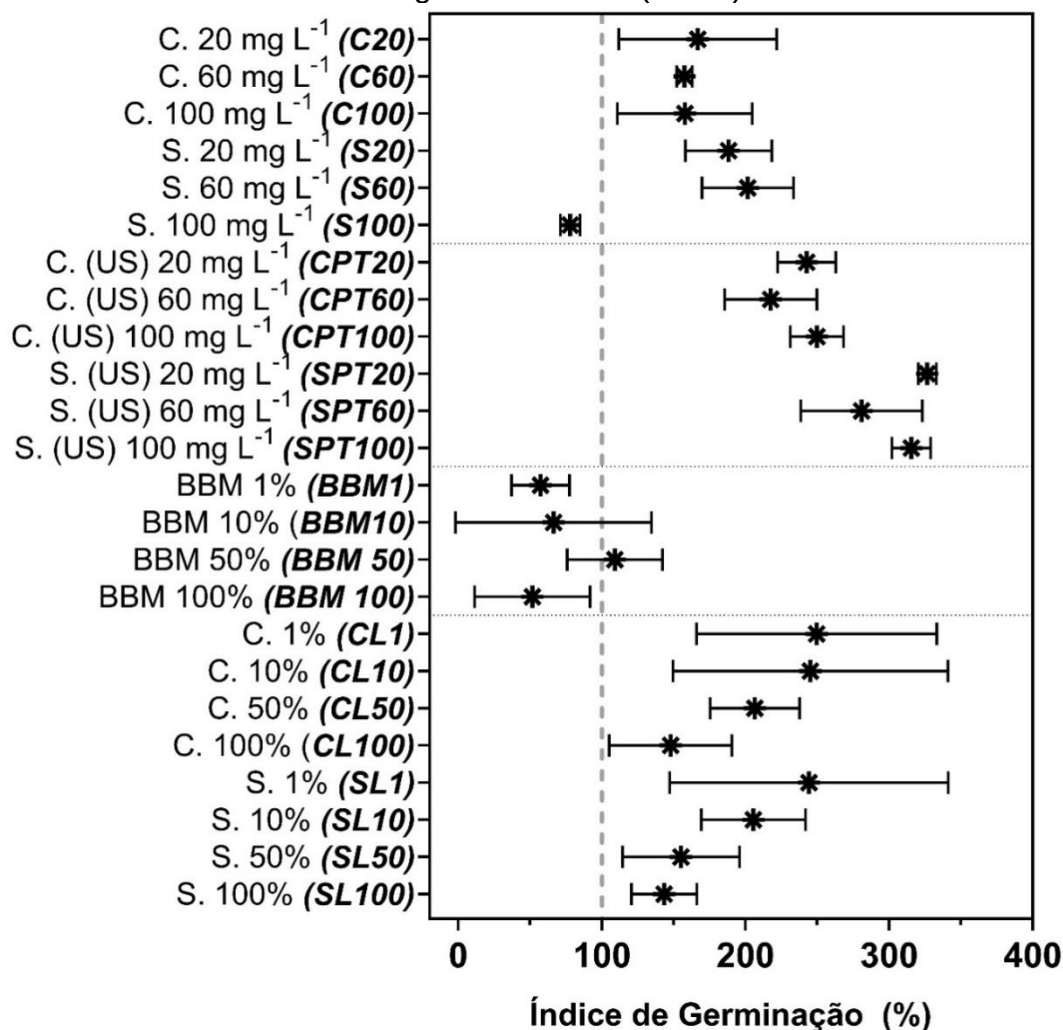
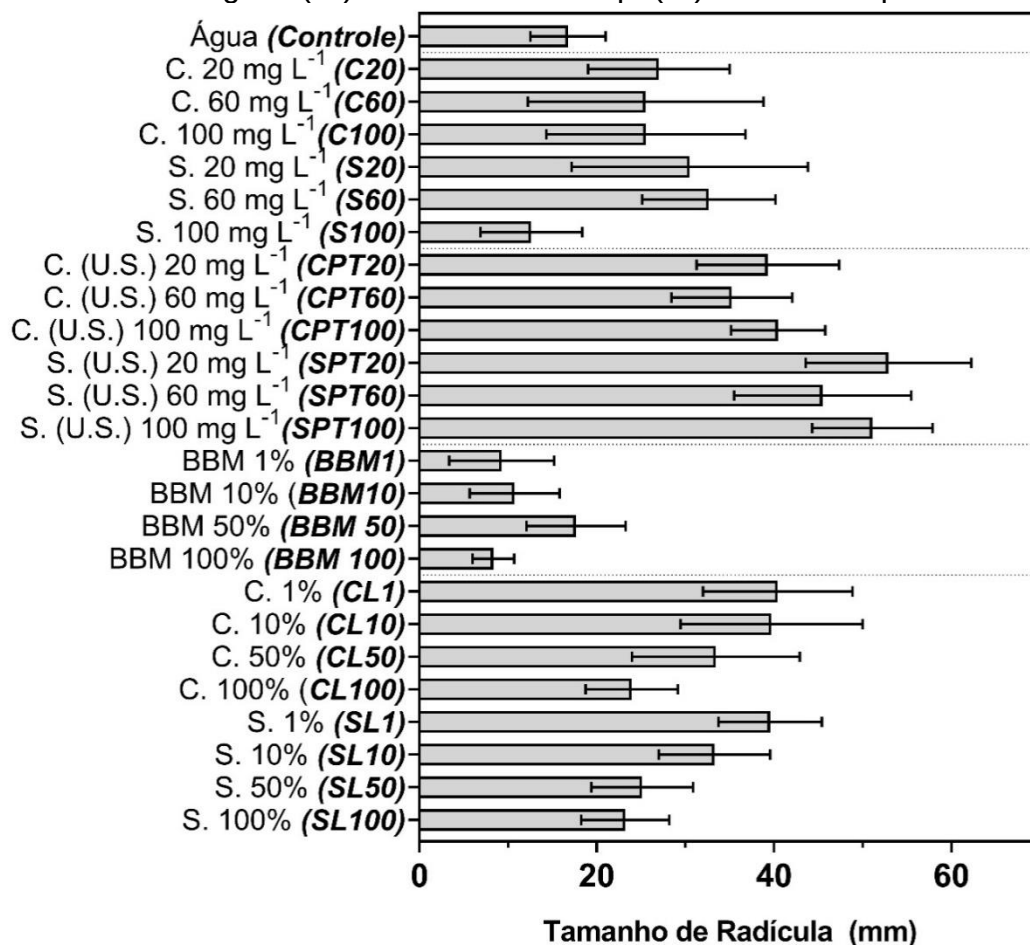


Figura 6 - Tamanho da radícula das sementes tratadas com as culturas de microalgas de *Chlorella vulgaris* (C.) e *Scenedesmus* sp. (S.) e controle após 6 dias de incubação



4 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Os tratamentos utilizando produtos provenientes da cultura das microalgas *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus* sp. foram eficientes na bioestimulação da germinação de sementes de tomate.

O pré-tratamento utilizando ultrassom apresentou maiores índices de germinação devido a liberação de compostos intracelulares, sendo os melhores resultados atribuídos a cultura de *Scenedesmus* sp.

A utilização de cultura viva de microalga apresentou efeito bioestimulante apenas após o sexto dia, indicando que estas podem competir com as sementes nos primeiros dias utilizando a água disponível.

O meio de cultura residual gerado no cultivo das algas possui melhor capacidade bioestimulante em menores concentrações, quando utilizado puro sua capacidade bioestimulante é reduzida.

A caracterização da biomassa das microalgas utilizadas no estudo permitirá uma maior elucidação e formação de teorias sobre os mecanismos estimulados no metabolismo das sementes de tomate durante a germinação.

O estudo mais profundo sobre moléculas presentes no meio de cultura residual será essencial para responder perguntas como: (i) Qual a mínima concentração eficaz para bioestimulação? (ii) Qual a concentração destas moléculas de acordo com o tempo de cultivo das microalgas sem a substituição do meio de cultivo? (iii) A concentração de moléculas que diminuíram o efeito bioestimulante durante a utilização do meio residual 100% poderiam ser empregadas como herbicidas?

Futuras pesquisas aplicando a separação da biomassa e o meio de cultivo, coletados em diferentes fases de crescimento da cultura de microalgas, podem definir a utilização de dois produtos distintos: Biomassa e Meio de cultura residual; ambos com elevado valor agregado para utilização na agricultura.

Referências

ANDERSEN, R. A. *Algal Culturing Techniques*. Burlington, MA: Elsevier Academic Press, 2005. 2005.

APANDI, N.; MOHAMED, R. M. S. R.; AL-GHEETHI, A.; GANI, P.; IBRAHIM, A.; KASSIM, A. H. M. Scenedesmus Biomass Productivity and Nutrient Removal from Wet Market Wastewater, A Bio-kinetic Study. **Waste and Biomass Valorization**, v. 10, n. 10, p. 2783–2800, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s12649-018-0313-y>.

AREMU, A. O.; MASONDO, N. A.; MOLNÁR, Z.; STIRK, W. A.; ÖRDÖG, V.; VAN STADEN, J. Changes in phytochemical content and pharmacological activities of three *Chlorella* strains grown in different nitrogen conditions. **Journal of Applied Phycology**, v. 28, n. 1, p. 149–159, 2016.

BOSE, S. K.; YADAV, R. K.; MISHRA, S.; SANGWAN, R. S.; SINGH, A. K.; MISHRA, B.; SRIVASTAVA, A. K.; SANGWAN, N. S. Effect of gibberellic acid and calliterpenone on plant growth attributes, trichomes, essential oil biosynthesis and pathway gene expression in differential manner in *Mentha arvensis* L. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 66, p. 150–158, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.02.011>.

CHEN, Y. di; HO, S. H.; NAGARAJAN, D.; REN, N. qi; CHANG, J. S. Waste

biorefineries — integrating anaerobic digestion and microalgae cultivation for bioenergy production. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 50, p. 101–110, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.11.017>.

CHIA, S. R.; CHEW, K. W.; SHOW, P. L.; YAP, Y. J.; ONG, H. C.; LING, T. C.; CHANG, J. S. Analysis of Economic and Environmental Aspects of Microalgae Biorefinery for Biofuels Production: A Review. **Biotechnology Journal**, v. 13, n. 6, p. 1–10, 2018.

CHUKA-OGWUDE, D.; OGBONNA, J.; MOHEIMANI, N. R. A review on microalgal culture to treat anaerobic digestate food waste effluent. **Algal Research**, v. 47, n. August 2019, p. 101841, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101841>.

CORREA, D. F.; BEYER, H. L.; FARGIONE, J. E.; HILL, J. D.; POSSINGHAM, H. P.; THOMAS-HALL, S. R.; SCHENK, P. M. Towards the implementation of sustainable biofuel production systems. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 107, n. February, p. 250–263, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.03.005>.

DU JARDIN, P. Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. **Scientia Horticulturae**, v. 196, p. 3–14, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.021>.

EUROPEAN COMMISSION. **Proposal for a Regulation Laying Down Rules on the Making Available on the Market of Ce Marked Fertilising Products and Amending Regulations Technical Report EC 1069/2009 and EC1107/2009**. Brussels, Belgium: [s. n.], 2016. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A52016PC0157>. .

FONSECA, A. L.; NEWTON, A.; CABRAL, A. Local and meso-scale pressures in the eutrophication process of a coastal subtropical system: Challenges for effective management. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 250, n. April 2020, p. 107109, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2020.107109>.

GONÇALVES, A. L. The use of microalgae and cyanobacteria in the improvement of agricultural practices: A review on their biofertilising, biostimulating and biopesticide roles. **Applied Sciences (Switzerland)**, v. 11, n. 2, p. 1–21, 2021.

GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, L. M.; CORREA, D. F.; RYAN, S.; JENSEN, P. D.; PRATT, S.; SCHENK, P. M. Integrated biodiesel and biogas production from microalgae: Towards a sustainable closed loop through nutrient recycling. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 82, n. September 2017, p. 1137–1148, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2017.09.091>.

GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, L. M.; ZHOU, L.; ASTALS, S.; THOMAS-HALL, S. R.; ELTANAHY, E.; PRATT, S.; JENSEN, P. D.; SCHENK, P. M. Biogas production coupled to repeat microalgae cultivation using a closed nutrient loop. **Bioresource Technology**, v. 263, n. March, p. 625–630, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.05.039>.

HAN, X.; ZENG, H.; BARTOCCI, P.; FANTOZZI, F.; YAN, Y. Phytohormones and effects on growth and metabolites of microalgae: A review. **Fermentation**, v. 4, n. 2, p. 1–15, 2018.

KOUTRA, E.; GRAMMATIKOPOULOS, G.; KORNAROS, M. Selection of microalgae intended for valorization of digestate from agro-waste mixtures. **Waste Management**, v. 73, p. 123–129, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.12.030>.

KUSVURAN, S. Microalgae (*Chlorella vulgaris* Beijerinck) alleviates drought stress of broccoli plants by improving nutrient uptake, secondary metabolites, and antioxidative defense system. **Horticultural Plant Journal**, v. 7, n. 3, p. 221–231, 2021.

LU, Y.; TARKOWSKA, D.; TUREČKOVÁ, V.; LUO, T.; XIN, Y.; LI, J.; WANG, Q.; JIAO, N.; STRNAD, M.; XU, J. Antagonistic roles of abscisic acid and cytokinin during response to nitrogen depletion in oleaginous microalga *Nannochloropsis oceanica* expand the evolutionary breadth of phytohormone function. **Plant Journal**, v. 80, n. 1, p. 52–68, 2014.

LU, Y.; XU, J. Phytohormones in microalgae: A new opportunity for microalgal biotechnology?. **Trends in Plant Science**, v. 20, n. 5, p. 273–282, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2015.01.006>.

MCADAM, S. A. M.; BRODRIBB, T. J. Linking turgor with ABA biosynthesis: Implications for stomatal responses to vapor pressure deficit across land plants. **Plant Physiology**, v. 171, n. 3, p. 2008–2016, 2016.

MUTALE-JOAN, C.; REDOUANE, B.; NAJIB, E.; YASSINE, K.; LYAMLOULI, K.; LAILA, S.; ZEROUAL, Y.; HICHAM, E. A. Screening of microalgae liquid extracts for their bio stimulant properties on plant growth, nutrient uptake and metabolite profile of *Solanum lycopersicum* L. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 2020.

NAVARRO-LÓPEZ, E.; RUÍZ-NIETO, A.; FERREIRA, A.; GABRIEL ACIÉN, F.; GOUVEIA, L. Biostimulant Potential of *Scenedesmus obliquus* Grown in Brewery Wastewater. **Molecules**, v. 25, n. 3, 2020.

NITSOS, C.; FILALI, R.; TAIDI, B.; LEMAIRE, J. Current and novel approaches to downstream processing of microalgae: A review. **Biotechnology Advances**, v. 45, n. March, p. 107650, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107650>.

O'CONNOR, J.; MICKAN, B. S.; RINKLEBE, J.; SONG, H.; SIDDIQUE, K. H. M.; WANG, H.; KIRKHAM, M. B.; BOLAN, N. S. Environmental implications, potential value, and future of food-waste anaerobic digestate management: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 318, n. May, p. 115519, 2022. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301479722010921>.

PUGLISI, I.; LA BELLA, E.; ROVETTO, E. I.; LO PIERO, A. R.; BAGLIERI, A. Biostimulant effect and biochemical response in lettuce seedlings treated with a

scenedesmus quadricauda extract. **Plants**, v. 9, n. 1, 2020.

RACHIDI, F.; BENHIMA, R.; SBABOU, L.; EL ARROUSSI, H. Microalgae polysaccharides bio-stimulating effect on tomato plants: Growth and metabolic distribution. **Biotechnology Reports**, v. 25, p. e00426, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00426>.

RANGLOVÁ, K.; LAKATOS, G. E.; CÂMARA MANOEL, J. A.; GRIVALSKÝ, T.; SUÁREZ ESTRELLA, F.; ACIÉN FERNÁNDEZ, F. G.; MOLNÁR, Z.; ÖRDÖG, V.; MASOJÍDEK, J. Growth, biostimulant and biopesticide activity of the MACC-1 Chlorella strain cultivated outdoors in inorganic medium and wastewater. **Algal Research**, v. 53, 2021.

RANGLOVÁ, K.; LAKATOS, G. E.; MANOEL, J. A. C.; GRIVALSKÝ, T.; MASOJÍDEK, J. Rapid screening test to estimate temperature optima for microalgae growth using photosynthesis activity measurements. **Folia Microbiologica**, v. 64, n. 5, p. 615–625, 2019.

RONGA, D.; BIAZZI, E.; PARATI, K.; CARMINATI, D.; CARMINATI, E.; TAVA, A. **Microalgal biostimulants and biofertilisers in crop productions**, MDPI AG, 2019.

ROUPHAEL, Y.; COLLA, G. Synergistic biostimulatory action: Designing the next generation of plant biostimulants for sustainable agriculture. **Frontiers in Plant Science**, v. 871, n. November, p. 1–7, 2018.

SHIN, D. Y.; CHO, H. U.; UTOMO, J. C.; CHOI, Y. N.; XU, X.; PARK, J. M. Biodiesel production from Scenedesmus bijuga grown in anaerobically digested food wastewater effluent. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 215–221, 2015.

SINGH, R.; PARIHAR, P.; SINGH, M.; BAJGUZ, A.; KUMAR, J.; SINGH, S.; SINGH, V. P.; PRASAD, S. M. Uncovering potential applications of cyanobacteria and algal metabolites in biology, agriculture and medicine: Current status and future prospects. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. APR, p. 1–37, 2017.

STIRK, W. A.; BÁLINT, P.; VAMBE, M. M.; KULKARNI, M. G.; VAN STADEN, J.; ÖRDÖG, V. Effect of storage on plant biostimulant and bioactive properties of freeze-dried Chlorella vulgaris biomass. **Journal of Applied Phycology**, 2021.

STIRK, W. A.; NOVÁK, O.; HRADECKÁ, V.; PÉNČÍK, A.; ROLČÍK, J.; STRNAD, M.; VAN STADEN, J. Endogenous cytokinins, auxins and abscisic acid in Ulva fasciata (Chlorophyta) and Dictyota humifusa (Phaeophyta): Towards understanding their biosynthesis and homeostasis. **European Journal of Phycology**, v. 44, n. 2, p. 231–240, 2009.

STOUVENAKERS, G.; DAPPRICH, P.; MASSART, S.; JIJAKLI, M. H. **Plant Pathogens and Control Strategies in Aquaponics**, 2019.

TAN, B. C.; SCHWARTZ, S. H.; ZEEVAART, J. A. D.; MCCARTY, D. R. Genetic control

of abscisic acid biosynthesis in maize. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 22, p. 12235–12240, 1997.

TSAVKELOVA, E. A.; KLIMOVA, S. Y.; CHERDYNTSEVA, T. A.; NETRUSOV, A. I. Hormones and hormone-like substances of microorganisms: A review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 229–235, 2006.

WANG, L.; WANG, Y.; CHEN, P.; RUAN, R. Semi-continuous cultivation of *Chlorella vulgaris* for treating undigested and digested dairy manures. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, n. 8, p. 2324–2332, 2010.

ANEXO 1 – Licença para reprodução de artigo publicado

Licence to Publish

SPRINGER NATURE

Licensee:	Springer Science+Business Media LLC	(the 'Licensee')
Journal Name:	BioEnergy Research	(the 'Journal')
Manuscript Number:	BERE-D-21-00502R2	
Proposed Title of Article:	Bioenergy Recovery from Anaerobic Co-Digestion of Crude Glycerol and Domestic Sewage In-Series Reactor: Microbial Characterization and System Performance	(the 'Article')
Author(s) [Please list all named Authors]:	Luan Vieira Adames, Ana Paula Jacobus, Isabel Sakamoto, Carolina Zampol Lazaro, Lorena Oliveira Pires, Sandra Imaculada Maintinguer	(the 'Author')
Corresponding Author Name:	Luan Vieira Adames	

1 Grant of Rights

- For good and valuable consideration, the Author hereby grants to the Licensee the perpetual, exclusive, world-wide, assignable, sublicensable and unlimited right to: publish, reproduce, copy, distribute, communicate, display publicly, sell, rent and/ or otherwise make available the article identified above, including any supplementary information and graphic elements therein (e.g. illustrations, charts, moving images) (the "Article") in any language, in any versions or editions in any and all forms and/or media of expression (including without limitation in connection with any and all end-user devices), whether now known or developed in the future. Without limitation, the above grant includes: (i) the right to edit, alter, adapt, adjust and prepare derivative works; (ii) all advertising and marketing rights including without limitation in relation to social media; (iii) rights for any training, educational and/or instructional purposes; (iv) the right to add and/or remove links or combinations with other media/works; and (v) the right to create, use and/or license and/or sublicense content data or metadata of any kind in relation to the Article (including abstracts and summaries) without restriction. The above rights are granted in relation to the Article as a whole or any part and with or in relation to any other works.
- Without limiting the rights granted above, Licensee is granted the rights to use the Article for the purposes of analysis, testing, and development of publishing- and research-related workflows, systems, products, projects, and services; to confidentially share the Article with select third parties to do the same; and to retain and store the Article and any associated correspondence/files/forms to maintain the historical record, and to facilitate research integrity investigations. The grant of rights set forth in this clause (b) is irrevocable.
- The Licensee will have the right, but not the obligation, to exercise any or all of the rights granted herein. If the Licensee elects not to publish the Article for any reason, all publishing rights under this Agreement as set forth in clause 1.a) above will revert to the Author.

2 Copyright

Ownership of copyright in the Article will be vested in the name of the Author. When reproducing the Article or extracts from it, the Author will acknowledge and reference first publication in the Journal.

3 Use of Article Versions

- For purposes of this Agreement: (i) references to the "Article" include all versions of the Article; (ii) "Submitted Manuscript" means the version of the Article as first submitted by the Author; (iii) "Accepted Manuscript" means the version of the Article accepted for publication, but prior to copy-editing and typesetting; and (iv) "Version of Record" means the version of the Article published by the Licensee, after copy-editing and typesetting. Rights to all versions of the Manuscript are granted on an exclusive basis, except for the Submitted Manuscript, to which rights are granted on a non-exclusive basis.
- The Author may make the Submitted Manuscript available at any time and under any terms (including, but not limited to, under a CC BY licence), at the Author's discretion. Once the Article has been published, the Author will include an acknowledgement and provide a link to the Version of Record on the publisher's website: "This preprint has not undergone peer review (when applicable) or any post-submission improvements or corrections. The Version of Record of this article is published in [insert journal title], and is available online at [https://doi.org/\[insert DOI\]](https://doi.org/[insert DOI])".
- The Licensee grants to the Author (i) the right to make the Accepted Manuscript available on their own personal, self-maintained website immediately on acceptance, (ii) the right to make the Accepted Manuscript available for public release on any of the following twelve (12) months after first publication (the "Embargo Period"): their employer's internal website; their institutional and/or

funder repositories. Accepted Manuscripts may be deposited in such repositories immediately upon acceptance, provided they are not made publicly available until after the Embargo Period.

The rights granted to the Author with respect to the Accepted Manuscript are subject to the conditions that (i) the Accepted Manuscript is not enhanced or substantially reformatted by the Author or any third party, and (ii) the Author includes on the Accepted Manuscript an acknowledgement in the following form, together with a link to the published version on the publisher's website: "This version of the article has been accepted for publication, after peer review (when applicable) but is not the Version of Record and does not reflect post-acceptance improvements, or any corrections. The Version of Record is available online at: [http://dx.doi.org/\[insert DOI\]](http://dx.doi.org/[insert DOI]). Use of this Accepted Version is subject to the publisher's Accepted Manuscript terms of use <https://www.springernature.com/gp/open-research/policies/accepted-manuscript-terms>". Under no circumstances may an Accepted Manuscript be shared or distributed under a Creative Commons or other form of open access licence.

- d) The Licensee grants to the Author the following non-exclusive rights to the Version of Record, provided that, when reproducing the Version of Record or extracts from it, the Author acknowledges and references first publication in the Journal according to current citation standards. As a minimum, the acknowledgement must state: "First published in [Journal name, volume, page number, year] by Springer Nature".
 - i. to reuse graphic elements created by the Author and contained in the Article, in presentations and other works created by them;
 - ii. the Author and any academic institution where they work at the time may reproduce the Article for the purpose of course teaching (but not for inclusion in course pack material for onward sale by libraries and institutions);
 - iii. to reuse the Version of Record or any part in a thesis written by the same Author, and to make a copy of that thesis available in a repository of the Author(s)' awarding academic institution, or other repository required by the awarding academic institution. An acknowledgement should be included in the citation: "Reproduced with permission from Springer Nature"; and
 - iv. to reproduce, or to allow a third party to reproduce the Article, in whole or in part, in any other type of work (other than thesis) written by the Author for distribution by a publisher after an embargo period of 12 months.

4 Warranties & Representations

Author warrants and represents that:

- a)
 - i. the Author is the sole copyright owner or has been authorised by any additional copyright owner(s) to grant the rights defined in clause 1,
 - ii. the Article does not infringe any intellectual property rights (including without limitation copyright, database rights or trade mark rights) or other third party rights and no licence from or payments to a third party are required to publish the Article,
 - iii. the Article has not been previously published or licensed, nor has the Author committed to licensing any version of the Article under a licence inconsistent with the terms of this Agreement,
 - iv. if the Article contains materials from other sources (e.g. illustrations, tables, text quotations), Author has obtained written permissions to the extent necessary from the copyright holder(s), to license to the Licensee the same rights as set out in clause 1 but on a non-exclusive basis and without the right to use any graphic elements on a stand-alone basis and has cited any such materials correctly;
- b) all of the facts contained in the Article are according to the current body of research true and accurate;
- c) nothing in the Article is obscene, defamatory, violates any right of privacy or publicity, infringes any other human, personal or other rights of any person or entity or is otherwise unlawful and that informed consent to publish has been obtained for any research participants;
- d) nothing in the Article infringes any duty of confidentiality owed to any third party or violates any contract, express or implied, of the Author;
- e) all institutional, governmental, and/or other approvals which may be required in connection with the research reflected in the Article have been obtained and continue in effect;

- f) all statements and declarations made by the Author in connection with the Article are true and correct; and
- g) the signatory who has signed this agreement has full right, power and authority to enter into this agreement on behalf of all of the Authors.

5 Cooperation

- a) The Author will cooperate fully with the Licensee in relation to any legal action that might arise from the publication of the Article, and the Author will give the Licensee access at reasonable times to any relevant accounts, documents and records within the power or control of the Author. The Author agrees that any Licensee affiliate through which the Licensee exercises any rights or performs any obligations under this Agreement is intended to have the benefit of and will have the right to enforce the terms of this Agreement.
- b) Author authorises the Licensee to take such steps as it considers necessary at its own expense in the Author's name(s) and on their behalf if the Licensee believes that a third party is infringing or is likely to infringe copyright in the Article including but not limited to initiating legal proceedings.

6 Author List

Changes of authorship, including, but not limited to, changes in the corresponding author or the sequence of authors, are not permitted after acceptance of a manuscript.

7 Post Publication Actions

The Author agrees that the Licensee may remove or retract the Article or publish a correction or other notice in relation to the Article if the Licensee determines that such actions are appropriate from an editorial, research integrity, or legal perspective.

8 Controlling Terms

The terms of this Agreement will supersede any other terms that the Author or any third party may assert apply to any version of the Article.

9 Governing Law

This Agreement will be governed by, and construed in accordance with, the laws of New York State. The courts of New York, N.Y. will have exclusive jurisdiction.