

**ANA JÚLIA VIANA CAVALEIRO**

**EFEITO DE SOBRECARGAS DE ÁCIDO OLEICO NA  
ACTIVIDADE DE CONSÓRCIOS MICROBIANOS  
ANAERÓBIOS DESENVOLVIDOS EM  
PROCESSOS DE LEITO FIXO**



**UNIVERSIDADE DO MINHO**  
ESCOLA DE ENGENHARIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA BIOLÓGICA  
1999

**ANA JÚLIA VIANA CAVALEIRO**

**EFEITO DE SOBRECARGAS DE ÁCIDO OLEICO NA  
ACTIVIDADE DE CONSÓRCIOS MICROBIANOS  
ANAERÓBIOS DESENVOLVIDOS EM  
PROCESSOS DE LEITO FIXO**

Dissertação para o Mestrado em Tecnologia do Ambiente



**UNIVERSIDADE DO MINHO**  
ESCOLA DE ENGENHARIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA BIOLÓGICA  
1999

## Agradecimentos

Desejo expressar os meus mais sinceros agradecimentos...

... à Professora Madalena Alves, pela sua disponibilidade, simpatia e pela forma excelente como me orientou ao longo de todo o percurso experimental e na elaboração desta tese;

... ao Professor Manuel Mota, pela sua orientação e contribuição, com o seu vasto conhecimento e experiência, para a realização deste trabalho;

... ao técnico Manuel Santos, pelo trabalho e apoio prestados, que se revelaram absolutamente indispensáveis;

... aos meus colegas, pelos incentivos e contribuição em todas as fases deste projecto;

... aos meus pais, à minha irmã, ao Jorge e a todos os meus amigos, pelo apoio e interesse manifestados;

... à Fundação para a Ciência e a Tecnologia, pela atribuição da bolsa de mestrado BM/17538/98.

## Sumário

Com este trabalho procurou-se estudar o efeito de sobrecargas de ácido oleico no desenvolvimento da biomassa num filtro anaeróbio, avaliando paralelamente o seu desempenho.

O digestor foi alimentado com um efluente lácteo sintético contendo oleato, aumentando-se cinco vezes a carga orgânica aplicada, quer através do aumento da concentração (choque orgânico), quer através da diminuição do tempo de retenção hidráulico (choque hidráulico).

O desempenho do digestor foi avaliado durante 286 dias em termos de eficiência de remoção de CQO (Carência Química de Oxigénio) solúvel e teores em AGV (Ácidos Gordos Voláteis) e SV (Sólidos Voláteis) presentes na corrente de saída. Ambas as perturbações do estado (pseudo)estacionário de funcionamento do digestor provocaram uma nítida deterioração do seu desempenho, verificando-se uma diminuição da eficiência de remoção de CQO solúvel (de um valor médio de 94.3 % para 30.2 %, no choque orgânico, e 73.2 %, no choque hidráulico) e um aumento dos AGV e SV à saída. Estes efeitos foram mais acentuados no caso do choque orgânico, verificando-se ainda uma recuperação mais lenta após esta situação.

Utilizando uma metodologia previamente desenvolvida para permitir a recolha de amostras de biomassa durante a operação do digestor, estudou-se o seu desenvolvimento nas duas situações de instabilidade. O choque hidráulico induziu uma diminuição da quantidade de biomassa aderida, observando-se um efeito contrário no caso do choque orgânico. A actividade metanogénica específica de alguns grupos tróficos fundamentais envolvidos no processo exibiu uma tendência decrescente até à finalização das perturbações introduzidas, recuperando posteriormente. Os efeitos observados foram mais acentuados na situação de sobrecarga orgânica, verificando-se também uma recuperação mais lenta. As actividades metanogénicas em propionato e butirato foram profundamente inibidas, enquanto que a actividade em etanol foi estimulada, nas condições de choque hidráulico. O forte efeito inibitório do oleato de sódio sobre as bactérias acidogénicas traduziu-se na ausência de actividade por parte deste grupo trófico durante 8 horas ou mais. A resistência das bactérias metanogénicas acetoclásticas à toxicidade do oleato de sódio foi superior no caso do choque hidráulico, tendo-se observado um aumento do valor do índice de toxicidade, representativo de um efeito de adaptação.

## Abstract

The aim of this work was the study of the biomass development in an anaerobic fixed-film reactor under toxic shock loading conditions, as well as the performance of the digester.

The reactor was fed with a synthetic dairy waste containing oleate. The applied organic loading rate was increased 5 times, by increasing the concentration (organic shock) or by lowering the hydraulic retention time (hydraulic shock).

The performance of the digester was followed by soluble COD (Chemical Oxygen Demand) removal efficiency and effluent VFA (Volatile Fatty Acids) and VS (Volatile Solids) levels. Under organic and hydraulic shock conditions the soluble COD removal efficiency was reduced (from 94.3 % to 30.2 % and 73.2 %, respectively), and the VFA and VS accumulated in the effluent. These effects were more accentuated in the organic shock conditions, and the recovery was slower in this situation.

An anaerobic fixed-bed reactor configuration previously developed, that allowed the regular withdrawal of some accumulated biomass, was used to study the biomass characteristics during the shocks. The hydraulic shock reduced the concentration of adhered biomass. A decrease in the specific methanogenic activity was observed in both shock situations, being this effect again more accentuated in the organic shock. Also, in this situation the recovery was slower. The propionic and butiric methanogenic activities were strongly inhibited, while the methanogenic activity in ethanol was stimulated, under hydraulic shock conditions. The lack of acidogenic activity during the first 8 hours or more, in both shocks, suggests a strong inhibitory effect of oleic acid on this trophic group. The tolerance of acetoclastic bacteria to sodium oleate was higher under hydraulic shock conditions, and it was observed that the toxicity index  $IC_{50}$  increased during this situation.

# Índice

<b>Agradecimentos</b>	1
<b>Sumário</b>	2
<b>Abstract</b>	3
<b>Índice</b>	4
<b>Lista de Tabelas</b>	6
<b>Lista de Figuras</b>	7
<b>Lista de Abreviaturas</b>	9
<b>1. Revisão Bibliográfica</b>	10
<b>1.1 Introdução</b>	10
<b>1.2 O processo de degradação anaeróbia</b>	12
1.2.1 Microbiologia e bioquímica	12
1.2.2 Requisitos nutricionais	15
1.2.2.1 <i>Macronutrientes</i>	16
1.2.2.2 <i>Micronutrientes</i>	17
1.2.3 Condições ambientais	17
1.2.3.1 <i>Temperatura</i>	17
1.2.3.2 <i>pH e alcalinidade</i>	19
1.2.3.3 <i>Potencial redox</i>	20
1.2.3.4 <i>Toxicidade e inibição</i>	20
<b>1.3 Tecnologias de tratamento anaeróbio de efluentes líquidos</b>	24
1.3.1 Processos de leito fixo	24
<b>1.4 Aplicação do processo de digestão anaeróbia ao tratamento de efluentes contendo lípidos</b>	28
1.4.1 Efeito inibitório dos AGCL	30
1.4.2 Efeito da adsorção dos lípidos e AGCL na superfície da biomassa	33

---

<b>1.5</b>	<b>Operação em estado não estacionário</b>	36
1.5.1	Choque térmico	37
1.5.2	Choque orgânico	38
1.5.3	Choque hidráulico	40
1.5.4	Choque tóxico	41
<b>1.6</b>	<b>Monitorização e controlo do processo de digestão anaeróbia</b>	42
<b>1.7</b>	<b>Objectivos</b>	46
<b>2.</b>	<b>Materiais e Métodos</b>	47
<b>2.1</b>	<b>Instalação experimental</b>	47
<b>2.2</b>	<b>Análises de rotina</b>	49
2.2.1	Carência química de oxigénio (CQO)	49
2.2.2	Ácidos gordos voláteis (AGV)	50
2.2.3	Sólidos voláteis (SV)	51
<b>2.3</b>	<b>Modo de operação</b>	51
<b>2.4</b>	<b>Amostragem da biomassa</b>	52
<b>2.5</b>	<b>Caracterização da biomassa</b>	53
2.5.1	Separação e quantificação	53
2.5.2	Testes de actividade metanogénica específica	53
2.5.3	Testes de actividade acidogénica	58
2.5.4	Testes de toxicidade metanogénica	59
<b>3.</b>	<b>Resultados e Discussão</b>	61
<b>3.1</b>	<b>Operação e desempenho do digestor</b>	61
<b>3.2</b>	<b>Caracterização da biomassa</b>	68
3.2.1	Distribuição e crescimento da biomassa no suporte	69
3.2.2	Actividade metanogénica específica dos diferentes grupos tróficos	72
3.2.3	Actividade acidogénica em lactose	76
3.2.4	Toxicidade do oleato sobre as bactérias metanogénicas acetoclásticas	77
<b>4.</b>	<b>Conclusões</b>	86
<b>5.</b>	<b>Referências Bibliográficas</b>	88
<b>Apêndice A: Calibração do transdutor de pressão</b>		A.1
<b>Apêndice B: Dados experimentais</b>		B.1

---

## Lista de Tabelas

Tabela 1.1 Valores teóricos do tempo de relaxação para diferentes substâncias e populações microbianas presentes em digestores anaeróbios (SOTO et al., 1992).....	43
Tabela 2.1 Dimensões e características do suporte e do leito. ....	48
Tabela 2.2 Descrição das condições operacionais e duração de cada etapa de operação.....	52
Tabela 3.1 Valores médios dos parâmetros operatórios relativos a cada uma das etapas de funcionamento.....	63
Tabela 3.2 Evolução dos parâmetros representativos do desempenho do reactor durante a Etapa II e III de funcionamento e nas cerca de 100 horas imediatamente subsequentes. ...	66
Tabela 3.3 Biomassa aderida, oclusa e total e fracção de biomassa aderida relativamente à biomassa total retida (%) durante e após o choque orgânico. ....	69
Tabela 3.4 Biomassa aderida, oclusa e total e fracção de biomassa aderida relativamente à biomassa total retida (%) durante e após o choque hidráulico. ....	70
Tabela 3.5 Compilação dos valores de actividade metanogénica específica ( $\text{mLCH}_4\text{/PTN/gSV.dia}$ ) determinados no início ( $t=0$ ) e final ( $t=95\text{h}$ ) do choque e cerca de 35 dias após o retorno às condições pré-choque, bem como do valor mínimo observado e respectivo tempo de ocorrência (horas).....	74
Tabela 3.6 Compilação dos valores de actividade acidogénica em lactose determinados durante e após o choque hidráulico. ....	76
Tabela 3.7 Índice de toxicidade do oleato de sódio sobre as bactérias acetoclásticas. ....	82
Tabela 3.8 Compilação de valores da literatura relativamente à toxicidade do oleato de sódio sobre as bactérias metanogénicas acetoclásticas (adaptado de ALVES, 1998). ....	83



## Lista de Figuras

Figura 1.1 Esquema do processo de digestão anaeróbia (adaptado de GUJER E ZEHNDER, 1983). .....	13
Figura 1.2 Esquema de um filtro anaeróbio de fluxo ascendente.....	25
Figura 2.1 Representação esquemática da instalação experimental utilizada. ....	47
Figura 2.2 Vista da secção do biorreactor. ....	48
Figura 2.3 Medição da pressão no interior de um frasco selado com o transdutor de pressão portátil. ....	54
Figura 3.1 Evolução das condições operacionais e desempenho do digestor ao longo do tempo de operação. CQO total alimentada e TRH (a), eficiência de remoção e carga orgânica aplicada (b), AGV totais presentes na corrente de saída (c) e SV à saída do digestor (d). ....	62
Figura 3.2 Evolução dos teores em AGV presentes à saída do digestor durante a Etapa II (a) e III (b) de funcionamento e nas cerca de 100 horas imediatamente subsequentes. ....	65
Figura 3.3 Variação da concentração de substrato não acidificado à saída do digestor ao longo do tempo de operação.....	65
Figura 3.4 Evolução ao longo do tempo da fracção de biomassa aderida relativamente à biomassa total retida, durante o choque orgânico (a) e choque hidráulico (b) e durante as cerca de 100 horas subsequentes.....	71
Figura 3.5 Evolução da actividade metanogénica específica em acetato (a), H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> (b), propionato (c), butirato (d) e etanol (e), ao longo das Etapas II e III de operação do digestor e durante as cerca de 100 horas subsequentes. ....	73
Figura 3.6 Variação da actividade acidogénica em lactose durante e após o choque hidráulico. ....	77
Figura 3.7 Produção específica de metano durante os testes de toxicidade efectuados às amostras recolhidas no início (t=0 horas) do choque orgânico (a) e algum tempo após o retorno às condições pré-choque (t≈35 dias) (b). ....	79
Figura 3.8 Produção específica de metano durante os testes de toxicidade efectuados à amostra recolhida no início (t=0 horas) do choque hidráulico (a) e algum tempo após o retorno às condições pré-choque (t≈35 dias) (b). ....	80

---

Figura 3.9 Variação percentual da actividade acetoclástica com a concentração de oleato determinada nos testes de toxicidade efectuados às amostras recolhidas no início ( $t=0$ ) e algum tempo após o retorno às condições pré-choque ( $t\approx 35$ dias), no caso da Etapa II (a) e da Etapa III (b) .....	81
Figura 3.10 Evolução da produção específica máxima de metano devido a substrato residual ao longo das Etapas II e III e durante as cerca de 100 horas subsequentes. ....	84
Figura 3.11 Valores da taxa inicial de conversão de substrato residual em função da concentração deste, obtidos para as situações de choque orgânico e choque hidráulico.....	85

## Lista de Abreviaturas

AGCL	Ácidos gordos de cadeia longa
AGV	Ácidos gordos voláteis
ATP	Adenosina tri-fosfato
CQO	Carência química de oxigénio (ML <sup>-3</sup> )
EGSB	Digestor anaeróbio de manto de lamas de leito expandido
GC	Cromatografia gasosa
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IC <sub>50</sub>	Índice de toxicidade
PTN	Pressão e temperatura normais
SSV	Sólidos suspensos voláteis (ML <sup>-3</sup> )
SV	Sólidos voláteis (ML <sup>-3</sup> )
TRH	Tempo de retenção hidráulico (T)
TRS	Tempo de retenção de sólidos (T)
UASB	Digestor anaeróbio de manto de lamas de fluxo ascendente

### **NOTAS:**

1. Por uma questão de legibilidade, optou-se por capitalizar a letra que designa a unidade *litro*. Assim, o convencional l é substituído por L.
2. As unidades da Carência Química de Oxigénio, que, em rigor, devem ser mgO<sub>2</sub>/L ou gO<sub>2</sub>/L são substituídas por mg/L ou g/L ou mesmo por mgCQO/L ou gCQO/L.

# 1. Revisão Bibliográfica

## 1.1 Introdução

Com a intensificação das preocupações ambientais e a aplicação de leis mais restritivas, é evidente a necessidade actual de se desenvolverem métodos de tratamento de águas residuais cada vez mais eficientes. Os efluentes industriais revelam-se particularmente problemáticos, devido à sua elevada carga poluente e possibilidade de flutuações de caudal e concentração. Podem ainda conter substâncias tóxicas e ser desequilibrados em termos de nutrientes (NACHAIYASIT E STUCKEY, 1995).

Os processos biológicos têm sido largamente utilizados no tratamento de efluentes municipais e industriais, revelando-se, na maior parte dos casos, mais económicos e eficientes do que os processos físico-químicos (RINZEMA, 1988). Durante as duas últimas décadas o processo de digestão anaeróbia assumiu gradualmente um papel importante no tratamento de águas residuais, tornando-se uma alternativa economicamente viável face aos processos aeróbios tradicionais.

São referidas na literatura diversas vantagens dos processos anaeróbios face aos aeróbios, nomeadamente: reduzidas necessidades nutricionais, baixa produção de sólidos, menor consumo de energia, baixos custos de capital e operação, produção de metano, capacidade da biomassa preservar a sua actividade após longos períodos sem operar e tolerância a condições ambientais adversas (LETTINGA *et al.*, 1980, ECKENFELDER *et al.*, 1988, RINZEMA, 1988, HALL, 1992, NACHAIYASIT E STUCKEY, 1995, VAN LIER *et al.*, 1997). Por outro lado, as limitações vulgarmente referidas para este tipo de processos, nomeadamente longos períodos de tempo para o arranque, elevados tempos de retenção, sensibilidade a tóxicos e instabilidade, têm vindo a ser ultrapassadas pelo crescente conhecimento da bioquímica, fisiologia e ecologia do processo, a par do desenvolvimento de novas configurações de reactores altamente eficientes (LETTINGA *et al.*, 1980, ECKENFELDER *et al.*, 1988, RINZEMA, 1988).

De facto, nos últimos anos verificaram-se enormes avanços no desenvolvimento da tecnologia em digestão anaeróbia, nomeadamente no desenho de reactores de alta carga, onde a retenção da biomassa permite individualizar os tempos de retenção dos sólidos (TRS) e do líquido. Desde o final dos anos sessenta, com o aparecimento do filtro anaeróbio de fluxo ascendente (YOUNG E MCCARTY, 1967), até à actualidade, surgiram novas configurações de digestores, os quais são particularmente atractivos para o tratamento de efluentes complexos (LETTINGA *et al.*, 1997).

Os caudais e composição das águas residuais podem ser muito variáveis. Uma vez que os processos anaeróbios são sensíveis a variações bruscas das condições ambientais e operacionais, será extremamente importante estudar a resposta destes sistemas face a diferentes situações de choque. O conhecimento do comportamento dos reactores em condições de instabilidade permitirá evitar a falha do processo, através da adopção de medidas preventivas e correctivas adequadas, e pode contribuir para o desenvolvimento de modificações apropriadas na configuração e operação do sistema, melhorando a sua estabilidade e eficiência (DELORME E KAPUSCINSKI, 1990).

Actualmente a aplicação dos processos de degradação anaeróbia ainda se encontra muito centrada no tratamento de efluentes facilmente biodegradáveis, embora se tenha vindo a demonstrar que as bactérias envolvidas no processo têm capacidade para degradar uma larga gama de compostos orgânicos recalcitrantes, tais como compostos aromáticos policíclicos, compostos orgânicos clorados ou ácidos gordos de cadeia longa (SPEECE, 1996, ALVES *et al.*, 1999a e 1999b, ARAYA, 1999). A possibilidade de “construir” consórcios específicos para degradar determinados compostos tóxicos, de modo a acelerar o processo de adaptação natural, surge como um potencial campo de investigação futura (VERSTRAETE E VANDEVIVERE, 1997). SPEECE (1996) sugere que a capacidade potencial de degradação e destruição de compostos tóxicos, demonstrada pelos processos de digestão anaeróbia, poderá vir a ser um critério importante na selecção dos tratamentos anaeróbios face aos aeróbios.

É importante conhecer a sensibilidade dos microrganismos envolvidos no processo de digestão anaeróbia a diferentes compostos potencialmente inibitórios, e avaliar a sua eventual capacidade de adaptação. A aplicação dos processos de digestão anaeróbia a efluentes contendo lípidos é fortemente condicionada pela formação de uma camada de ácidos gordos de cadeia longa envolvendo os agregados de biomassa. Os ácidos gordos de cadeia longa, além de serem altamente tóxicos para as bactérias envolvidas no

processo, particularmente para as acetoclásticas (ALVES *et al.*, 1997), provocam a flutuação dos grânulos, conduzindo à lavagem das células (“washout”). Os resultados obtidos com a aplicação de sistemas de manto de lamas a este tipo de efluentes não se apresentam muito promissores, pelo que outros sistemas devem ser investigados, nomeadamente os de leito fixo. As potencialidades da aplicação de um filtro anaeróbio de fluxo ascendente ao tratamento de um efluente sintético contendo elevada concentração de ácido oleico foram evidenciadas por PEREIRA (1998).

## 1.2 O processo de degradação anaeróbia

### 1.2.1 Microbiologia e bioquímica

A digestão anaeróbia é um processo biológico através do qual a matéria orgânica é convertida principalmente em metano e dióxido de carbono, na ausência de oxigénio. É um sistema complexo, onde ocorrem interações entre as diferentes etapas, sendo por isso fundamental a existência de uma relação equilibrada e coordenada entre os diferentes grupos tróficos de bactérias presentes (NACHAIYASIT E STUCKEY, 1995, ALVES *et al.*, 1995). Na Figura 1.1 encontra-se representado um esquema do processo de digestão anaeróbia, sendo possível distinguir pelo menos 7 etapas, as quais podem ser agrupadas em 4 sequências principais de degradação.

A fase de **hidrólise** (assinalada na Figura 1.1 com o número 1) consiste na conversão dos biopolímeros (proteínas, hidratos de carbono e lípidos) nos seus monómeros (aminoácidos, açúcares e ácidos gordos de cadeia longa, respectivamente), através da acção de enzimas extracelulares produzidas por bactérias hidrolíticas. É normalmente um processo lento, sendo os lípidos, no caso geral, hidrolisados mais lentamente do que as outras macromoléculas (HENZE E HARREMÕES, 1983).

Na etapa seguinte (**acidogénese** ou **fermentação**) os produtos da hidrólise são transportados para o interior da célula, onde são transformados em acetato, produtos intermediários (ácidos gordos voláteis (AGV), álcoois) e hidrogénio. A população acidogénica representa cerca de 90% da população bacteriana total dos digestores anaeróbios e apresenta reduzidos tempos de duplicação, pelo que esta nunca será a etapa limitante do processo (GUJER E ZEHNDER, 1983, MOSEY, 1983).

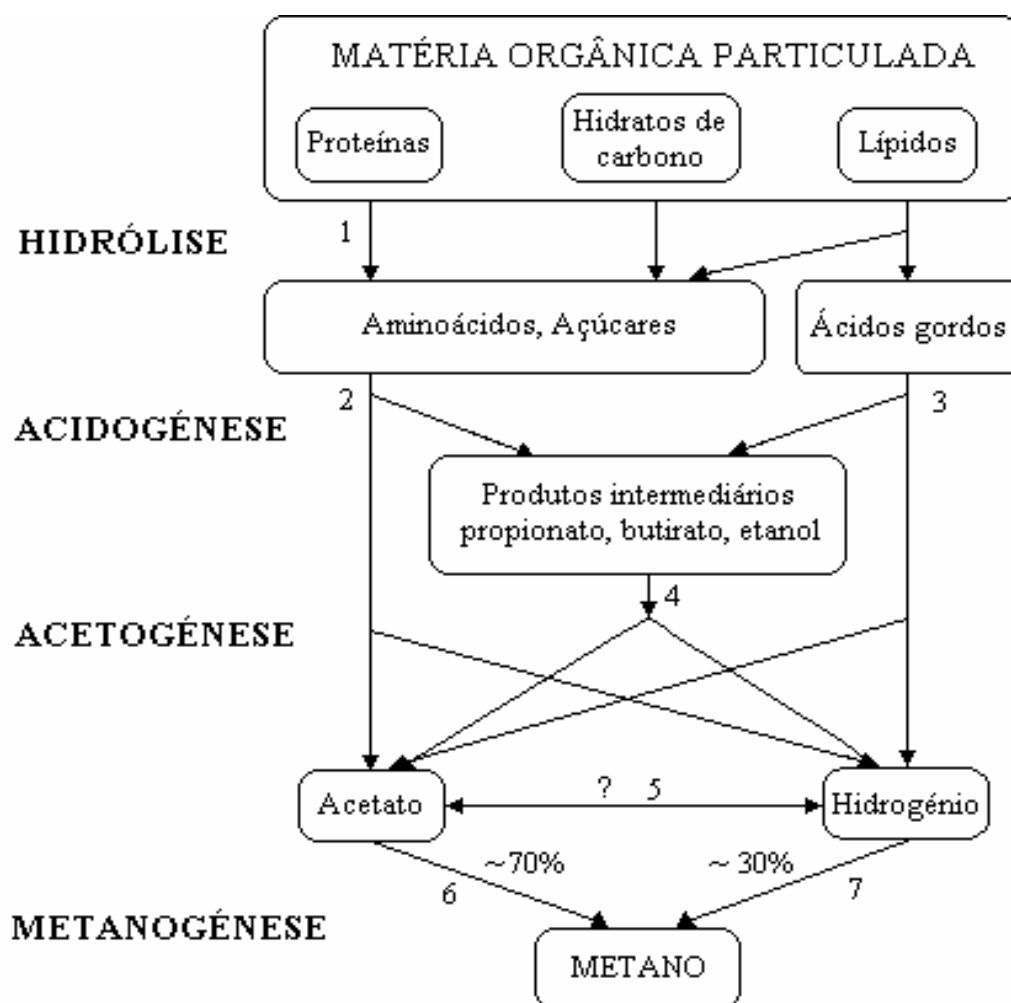


Figura 1.1 Esquema do processo de digestão anaeróbia (adaptado de GUJER E ZEHNDER, 1983).  
 1. Hidrólise de biopolímeros. 2. Fermentação. 3. Oxidação de ácidos gordos de cadeia longa (AGCL). 4. Oxidação de produtos intermediários. 5. Homoacetogênese. 6. Conversão de acetato a metano. 7. Conversão de hidrogénio a metano.

O hidrogénio desempenha um papel preponderante na distribuição dos produtos desta fase (WOLIN, 1974). Quando a pressão parcial de hidrogénio é inferior a  $10^{-4}$  atm forma-se preferencialmente acetato e hidrogénio, sendo este o percurso metabólico mais rentável em termos energéticos (MOSEY E FERNANDEZ, 1984). Se a pressão parcial de hidrogénio exceder  $10^{-4}$  atm são possíveis duas respostas, no sentido de contrariar este aumento de concentração, nomeadamente produção de butirato e produção de propionato. Em consequência de sobrecargas orgânicas ou hidráulicas, ou de choques térmicos, a concentração de hidrogénio aumenta significativamente, sendo

acompanhada pela acumulação de propionato (LAU E FANG, 1997), supondo-se que esta resulta de uma alteração da população acidogénica dominante (MARCHAIM E KRAUSE, 1993, INANC *et al.*, 1996).

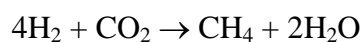
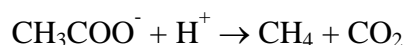
A etapa da **acetogénese** consiste na transformação dos produtos da fermentação em acetato, dióxido de carbono e hidrogénio, por acção das bactérias homoacetogénicas (etapa 5 na Figura 1.1) e das bactérias sintróficas (também chamadas produtoras obrigatórias de hidrogénio). As bactérias homoacetogénicas produzem acetato a partir de  $H_2/CO_2$  ou de compostos orgânicos multicarbonados (ex.: açúcares), pelo que a sua capacidade de utilizarem uma grande variedade de substratos pode ser um factor determinante da sua presença em digestores anaeróbios (ZEHNDER E STUMM, 1988). O papel desempenhado por estas bactérias no processo não está ainda plenamente esclarecido.

As transformações acetogénicas realizadas pelas bactérias sintróficas são termodinamicamente desfavoráveis em condições normais, verificando-se que só se tornam exergónicas se a concentração de hidrogénio for da ordem de  $10^{-4}$  atm ou inferior. Normalmente tal é assegurado pelas bactérias metanogénicas hidrogenotróficas ou, no caso de existir sulfato no meio, pelas bactérias sulfato-redutoras, através de um processo vulgarmente designado por “transferência de hidrogénio inter-espécies” (DOLFING, 1988). Este tipo de associação, em que um microrganismo produtor de um metabolito cresce apenas na presença de outro, consumidor desse mesmo metabolito, designa-se por associação sintrófica, e requer uma proximidade física dos dois tipos de bactérias envolvidas, verificando-se que a cooperação entre os dois grupos tróficos é óptima quando a distância entre eles for mínima (SCHINK E THAUER, 1988). A existência de sintrofias dificulta o isolamento e estudo das bactérias produtoras de hidrogénio em cultura pura.

As espécies sintróficas também estão envolvidas na  $\beta$ -oxidação dos ácidos gordos de cadeia longa, AGCL (etapa 3 na Figura 1.1), devido à incapacidade das bactérias acidogénicas para degradarem estes compostos. Como surgem em situações de sintrofia, são raras as publicações sobre o isolamento de associações de microrganismos capazes de degradar AGCL, estando actualmente descritos apenas quatro consórcios, dois mesófilos e dois termófilos (Hwu, 1997).



A etapa final do processo de digestão anaeróbia é a **metanogénese**, a qual é muitas vezes o passo controlador da globalidade do processo de digestão anaeróbia. As bactérias metanogénicas pertencem ao reino das *Arqueobactérias* e degradam apenas um número limitado de substratos, nomeadamente acetato (bactérias metanogénicas acetoclásticas), metanol, metilaminas, formato, e  $H_2+CO_2$  (bactérias metanogénicas hidrogenofílicas), apresentando-se em seguida algumas das transformações que ocorrem nesta fase:



A conversão de acetato é responsável pela produção de cerca de 70 % do metano no processo de degradação anaeróbia, pelo que assume uma importância particular (JERIS E MCCARTY, 1965). Por outro lado, as bactérias metanogénicas acetoclásticas representam o elo mais fraco de toda a cadeia de degradação, no que respeita à sua resistência a condições adversas, tais como choques orgânicos e hidráulicos e presença de substâncias tóxicas (COLLERAN, comunicação pessoal, citada em ALVES, 1998). Até à data apenas foram identificados dois géneros de bactérias metanogénicas acetoclásticas: *Methanosaeta* (ex. *Methanothrix*) e *Methanosarcina*.

As bactérias metanogénicas hidrogenotróficas consomem hidrogénio, mantendo a sua concentração em níveis baixos, o que possibilita a actuação das bactérias acetogénicas, e ajudam a controlar o potencial redox do meio.

### 1.2.2 Requisitos nutricionais

Para assegurar a eficiência e estabilidade do processo de degradação anaeróbia é essencial a satisfação dos requisitos nutricionais dos grupos bacterianos presentes, uma vez que a limitação de nutrientes origina um crescimento deficiente. Os processos anaeróbios caracterizam-se por uma baixa produção celular, pelo que as necessidades em nutrientes são, conseqüentemente, reduzidas (LEMA *et al.*, 1992). Segundo LEMA *et al.* (1992) as concentrações necessárias encontram-se directamente relacionadas com a

concentração de substrato a utilizar pelos microrganismos, sendo suficientes, em muitos casos, as quantidades presentes no efluente a tratar.

A satisfação dos requisitos nutricionais das bactérias metanogénicas em particular é fundamental, dado que a metanogénese é normalmente a etapa limitante da globalidade do processo de digestão anaeróbia.

### **1.2.2.1 Macronutrientes**

O **enxofre** é um dos elementos presentes na coenzima M (ácido 2-mercaptoetanosulfónico), a qual está envolvida nas reacções metanogénicas (FERRY, 1992). MOUNTFORD E ASHER (1979) verificaram que para o crescimento das bactérias metanogénicas eram necessárias concentrações de 10 a 27 mg/L de sulfureto, embora este seja tóxico para concentrações superiores a 100 mg/L na sua forma não ionizada (H<sub>2</sub>S). O sulfureto pode precipitar alguns metais essenciais, tais como o ferro, níquel e cobalto, reduzindo a sua disponibilidade no meio (SPEECE, 1983).

Embora o ião amónio seja, aparentemente, a fonte de **azoto** preferida pelas bactérias metanogénicas, a ureia e a glutamina também podem ser usadas como tal (BELAY *et al.*, 1984), e várias espécies têm a capacidade de fixar o azoto molecular, num processo energeticamente dispendioso para as células (BELAY *et al.*, 1984, BOMAR *et al.*, 1985, LOBO E ZINDER, 1988). A adição de ião amónio faz normalmente aumentar a taxa de crescimento das bactérias metanogénicas, embora um excesso de azoto conduza ao aparecimento de azoto amoniacal, o qual terá de ser posteriormente eliminado.

Quando se revela necessária a adição de **fósforo** ao digestor, este pode ser fornecido sob a forma de ácido fosfórico ou como um sal de fosfato (HALL, 1992). ALPHENAAR (1994) observou que precipitados inorgânicos de fosfato podem funcionar como fonte interna de fósforo em digestores anaeróbios.

A estimativa das necessidades em azoto e fósforo pode ser obtida a partir da taxa de crescimento da população bacteriana e da composição celular (LEMA *et al.*, 1992, LETTINGA, 1995). Assim, utiliza-se frequentemente para tal a relação CQO/N/P, onde CQO significa carência química de oxigénio. HENZE E HARREMÕES (1983) referiram razões CQO/N de 400/7 para sistemas a operar com cargas orgânicas mássicas elevadas (de 0.8 a 1.2 Kg CQO/Kg SSV.dia) e da ordem de 1000/7 para sistemas a operar com cargas

orgânicas baixas (inferiores a 0.5 Kg CQO/Kg SSV.dia). Segundo SPEECE E MCCARTY (1964), a razão mássica entre a concentração de azoto e fósforo no substrato deverá ser aproximadamente 7.

### **1.2.2.2 Micronutrientes**

Os elementos requeridos pelas bactérias metanogénicas em quantidades traço (micronutrientes) incluem o sódio, potássio, cálcio, magnésio, ferro, níquel, cobalto, zinco, molibdénio, cobre e manganês (OREMLAND, 1988). TAKASHIMA E SPEECE (1989) verificaram que entre estes elementos, o ferro, o níquel e o cobalto eram essenciais para se obter uma elevada conversão de acetato em metano.

O **ferro** está presente nos citocromos e ferredoxinas, os quais estão envolvidos no metabolismo como fonte de electrões.

O **níquel** é um dos constituintes do factor  $F_{430}$ , o qual se encontra envolvido nos passos terminais das reacções metanogénicas. A detecção de elevados níveis de níquel na membrana celular sugere que este pode estar envolvido na estabilidade estrutural (JARREL E SPROTT, 1982).

O **cobalto** está presente em moléculas (corrinoídes) envolvidas na actividade da metiltransferase e desidrogenase (JARREL E SPROTT, 1982, TAKASHIMA E SPEECE, 1990). FLORÊNCIO *et al.* (1997) observaram que o cobalto era o único micronutriente que afectava a metanogénese a partir do metanol, estimulando os grupos tróficos que utilizam directamente o metanol (i.e., as bactérias metanogénicas metilotróficas e as acetogénicas).

## **1.2.3 Condições ambientais**

### **1.2.3.1 Temperatura**

A temperatura afecta significativamente a actividade dos microrganismos e, em menor grau, as constantes de equilíbrio físico-químico do meio, revelando-se um dos factores que mais influencia a eficiência do processo de digestão anaeróbia (SOTO *et al.*, 1992). VAN LIER *et al.* (1997) referem, no entanto, que a temperatura não é um factor limitante

na aplicação destes sistemas de tratamento, desde que se escolha a configuração mais adequada a cada caso.

Normalmente são consideradas três gamas de temperatura: termófila ( $> 45\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), mesófila ( $20\text{-}45\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) e psicrófila ( $< 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) (COATES, 1991). Na realidade, a diferenciação entre estas gamas, no interior dos reactores, poderá não ser tão clara, devido à existência de bactérias termotolerantes, que exibem actividade em zonas intermédias de temperatura (LEMA *et al.*, 1992). As gamas termófila e mesófila são privilegiadas para o funcionamento das bactérias envolvidas no processo de digestão anaeróbia, observando-se um crescimento máximo das bactérias metanogénicas para temperaturas entre  $30\text{ e }38\text{ }^{\circ}\text{C}$ , na gama mesófila, e entre  $49\text{ e }57\text{ }^{\circ}\text{C}$ , na gama termófila.

A operação a temperaturas termófilas possibilita a obtenção de maiores taxas de remoção, uma vez que estas estirpes bacterianas possuem taxas de crescimento superiores às mesófilas. Desta forma, torna-se possível a aplicação de cargas orgânicas mais elevadas e a operação com tempos de retenção hidráulicos (TRH) inferiores (ZINDER, 1988, UGURLU E FORSTER, 1992, VAN LIER *et al.*, 1993, LAU E FANG, 1997). No entanto, o processo termófilo revela-se instável, principalmente devido a maior sensibilidade a flutuações de temperatura, a variações na carga orgânica aplicada e à presença de tóxicos (PARKIN E OWEN, 1986, UGURLU E FORSTER, 1992, VAN LIER *et al.*, 1993). Inclusivamente, as concentrações de agentes tóxicos inibitórias da metanogénese termófila são significativamente inferiores às que inibem os sistemas mesófilos (UGURLU E FORSTER, 1992). HWU (1997) observou que em condições termófilas o oleato de sódio apresentava uma taxa de degradação superior à observada em condições mesófilas, mas o índice de toxicidade relativamente à actividade acetoclástica ( $\text{IC}_{50}$ ) era substancialmente menor a temperaturas elevadas ( $0.35\text{-}0.79\text{ mM}$  a  $55^{\circ}\text{C}$  e  $2.35\text{-}4.30\text{ mM}$  a  $30^{\circ}\text{C}$ ), tornando difícil a escolha entre os dois processos.

VAN LIER *et al.* (1994) referiram a importância do tratamento anaeróbio termófilo, especialmente para efluentes produzidos a altas temperaturas, como por exemplo os de destilarias e de produção de papel e pasta de papel. Por outro lado, se for possível operar os digestores à temperatura ambiente (ex.:  $10\text{-}25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) os custos de energia associados aos sistemas de aquecimento podem ser eliminados (NACHAIYASIT E STUCKEY, 1995, LAU E FANG, 1997).

### 1.2.3.2 pH e alcalinidade

O pH afecta:

- a taxa de crescimento dos microrganismos, pelo que variações deste parâmetro podem causar alterações importantes na constituição microbiana dos consórcios,
- o metabolismo, nomeadamente a utilização das fontes de carbono e energia, as reacções de síntese e a produção de metabolitos extracelulares (SAKHAROVA E RABOTNOVA, 1976),
- a morfologia e a estrutura, com consequências para os fenómenos de adesão e floculação (FORAGE *et al.*, 1985).

Os microrganismos são altamente sensíveis a variações de pH, embora nem todos os grupos tróficos apresentem o mesmo grau de sensibilidade relativamente a este parâmetro (LEMA *et al.*, 1992). Os diferentes grupos bacterianos têm actividades máximas para valores de pH não muito diferentes (LEMA E MENDEZ, 1988), situando-se na vizinhança da neutralidade. Segundo estes autores, valores de pH entre 7 e 7.4 são óptimos para as bactérias hidrolíticas e acetogénicas e pH 6 é óptimo para as bactérias fermentativas. As bactérias metanogénicas apresentam um óptimo de pH entre 6.6 e 7.6. (ZEHNDER *et al.*, 1980) e, uma vez que são normalmente responsáveis pela cinética global do processo e são mais sensíveis a factores ambientais, geralmente considera-se esta gama de pH como a apropriada para o funcionamento do processo de digestão anaeróbia.

A toxicidade de determinados compostos é influenciada pelo pH, nomeadamente:

- o ião amónio ( $\text{NH}_4^+$ ) - para valores elevados de pH forma-se preferencialmente a sua forma não ionizada ( $\text{NH}_3$ ), que penetra na membrana celular (MCCARTY, 1964),
- os ácidos voláteis e o  $\text{H}_2\text{S}$  - para valores baixos de pH verifica-se um deslocamento dos equilíbrios ácido-base destes compostos no sentido das formas não ionizadas (ANDREWS E GRAEF, 1971, SÄRNER, 1986).

As formas não ionizadas penetram na membrana celular e provocam o aumento da concentração intracelular de hidrogénio. A extrusão do excesso de protões consome ATP (adenosina tri-fosfato), diminuindo a sua disponibilidade para o crescimento e metabolismo (FUKUZAKI *et al.*, 1990).

A produção de ácidos voláteis como produtos intermediários no processo de digestão anaeróbia pode provocar uma descida acentuada do pH do meio, se a alcalinidade do sistema for insuficiente. A alcalinidade é uma medida representativa da capacidade

tampão do meio, traduzindo esta a resistência do processo a variações de pH causadas por diferentes agentes. Permite determinar antecipadamente qual a tolerância em ácidos gordos voláteis para que o valor de pH se mantenha na gama pretendida, e está intimamente relacionada com a estabilidade do processo, salientando-se que quanto maior for a capacidade tampão, maior será a resistência a choques orgânicos. Para a maioria dos casos práticos, uma alcalinidade entre 2500 e 5000 mg CaCO<sub>3</sub>/L é suficiente para se obter um adequado poder tampão no sistema (GRADY E LIM, 1980). Quando o poder tampão do efluente a tratar é fraco, revela-se necessário proceder à correcção do pH, através da adição de um reagente alcalino.

### ***1.2.3.3 Potencial redox***

As bactérias metanogénicas são organismos anaeróbios estritos, cuja actividade só é possível com potenciais redox inferiores a -200 mV. O potencial redox normal é da ordem dos -260 mV a pH 7, o que corresponde a uma concentração de hidrogénio de 6.8 ppm nos gases de digestão.

### ***1.2.3.4 Toxicidade e inibição***

Os processos anaeróbios são efectuados por um consórcio microbiano complexo, pelo que os vários grupos bacterianos presentes podem exhibir diferentes respostas face a uma determinada substância tóxica. As bactérias metanogénicas são particularmente susceptíveis a uma larga gama de componentes, sendo geralmente as acetoclásticas as mais sensíveis à toxicidade, embora alguns compostos possam ter um maior efeito inibitório sobre os microrganismos acidogénicos (SPEECE, 1996).

Dependendo dos efeitos que provocam, os compostos inibitórios podem ser classificados da seguinte forma (ALVAREZ *et al.*, 1988, SOTO *et al.*, 1992):

- inibidores metabólicos → causam uma inibição reversível, recuperando-se a actividade original após o seu desaparecimento do meio,
- inibidores fisiológicos → os seus efeitos mantêm-se durante algum tempo após o desaparecimento da substância do meio, uma vez que afectam os constituintes sub-celulares das bactérias,
- agentes bactericidas → conduzem à morte da flora bacteriana.

Uma vez que estas substâncias afectam principalmente as etapas acetogénica e metanogénica do processo de digestão anaeróbia, as suas consequências imediatas poderão ser muito similares às resultantes de choques orgânicos, térmicos ou hidráulicos, provocando uma diminuição da produção de metano e posterior acidificação do reactor (SOTO *et al.*, 1992).

Tem-se tornado claro que muitos dos compostos tradicionalmente referidos como inibidores podem ser efectivamente biodegradados por um consórcio anaeróbio adaptado (LETTINGA, 1995). Por outro lado, a biomassa estruturada em grânulos apresenta uma resposta à toxicidade diferente da biomassa dispersa. Por exemplo, relativamente à toxicidade do oleato de sódio, cuja acção se exerce ao nível da parede celular, verificou-se que o índice de toxicidade aumentava com a diminuição da área específica da biomassa, o que significa uma maior resistência da biomassa granular do que da biomassa dispersa (HWU, 1997).

A tolerância das bactérias metanogénicas ao **oxigénio** varia de espécie para espécie, ou mesmo de estirpe para estirpe, de acordo com as condições ambientais. A presença desta substância pode inibir as bactérias metanogénicas e provocar o crescimento de organismos aeróbios ou facultativos na superfície dos agregados granulares, deteriorando as suas características de sedimentação. No entanto, os resultados obtidos por KATO (1994) indicam que na prática não foi observado qualquer efeito adverso do oxigénio sobre a eficiência do sistema de tratamento, devido ao efeito de protecção das bactérias metanogénicas resultante do facto de se encontrarem no interior de grânulos e da presença de bactérias facultativas (as quais que têm tempos de duplicação curtos e consomem o oxigénio dissolvido).

Na presença de sulfatos e baixos valores de pH verifica-se a formação de **sulfureto** de hidrogénio, o qual pode penetrar na membrana celular e provocar a inibição das bactérias metanogénicas. MCCARTY (1964) refere a existência de efeitos tóxicos para concentrações de sulfureto superiores a 200 mg/L, embora RINZEMA (1988) tenha observado um possível efeito de protecção fornecido pela estrutura granular da biomassa.

As espécies **NH<sub>3</sub>** e **NH<sub>4</sub><sup>+</sup>** formam-se durante o processo de tratamento anaeróbio, por biodegradação de compostos orgânicos nitrogenados. Para valores elevados de pH forma-se preferencialmente a forma não ionizada (NH<sub>3</sub>), a qual pode exercer um efeito tóxico ou inibitório. MCCARTY (1964) aponta 1500 a 3000 mg de amónia total

$(\text{NH}_3+\text{NH}_4^+)/\text{L}$  como concentrações moderadamente inibitórias, verificando-se efeitos tóxicos para concentrações superiores a 3000 mg/L.

Os **ácidos voláteis** (acético, propiónico e butírico), além de serem utilizados como substrato pelas bactérias, podem também funcionar como inibidores, uma vez que para valores baixos de pH se formam preferencialmente as suas formas não ionizadas, as quais podem penetrar na membrana celular (GONÇALVES, 1988). Os efeitos da acumulação dos ácidos voláteis manifestam-se principalmente ao nível da população metanogénica (POHLAND, 1992), sendo o ácido propiónico o mais tóxico para este grupo de bactérias. Em reactores operando normalmente, a concentração total de ácidos voláteis, expressa em termos de ácido acético, não deve ultrapassar os 2000 a 3000 mg/L, sendo desejável que se mantenha em valores inferiores aos 500 mg/L (BARFORD, 1988).

Os **ácidos gordos de cadeia longa** (AGCL), formados por hidrólise dos lípidos, são inibitórios da metanogénese, embora possam precipitar em solução sob a forma de sais de cálcio. MCCARTY (1964) referiu que o ácido oleico provocava inibição da metanogénese em concentrações da ordem dos 500 mg/L; na presença de cálcio são toleradas concentrações da ordem dos 2000 a 3000 mg/L.

Alguns **metais pesados** podem ter um efeito adverso no processo de degradação anaeróbia, quando presentes em solução (na sua forma ionizada), podendo afectar a produção de metano por inibição directa da metanogénese ou através da inibição de outros grupos tróficos presentes no consórcio (GONÇALVES, 1988, HICKEY *et al.*, 1989). A toxicidade destes metais pode resultar da interferência com certos grupos funcionais enzimáticos ou com precursores metabólicos (POHLAND, 1992). Como principais causadores de toxicidade apontam-se o crómio, cobre, níquel, cádmio, chumbo, zinco e ferro.

Os **catiões** de sódio, potássio, cálcio e magnésio têm um efeito estimulante a baixa concentração, podendo ser inibidores a concentração elevada. Segundo MCCARTY (1964) as concentrações estimulatórias situam-se na gama dos 75 a 4000 mg/L, ocorrendo inibição moderada para concentrações de 1 a 5 g/L e uma inibição forte para concentrações de 3 a 12 g/L, dependendo do catião. Misturas destes catiões podem exercer efeitos mais complexos, uma vez que alguns actuam antagonicamente e outros sinergisticamente.



Os **inibidores metabólicos específicos** são utilizados na realização de estudos bioquímicos ou ecológicos (OREMLAND, 1988). São conhecidas algumas substâncias que bloqueiam a formação de metano, quer devido ao facto de serem tóxicas para as bactérias metanogénicas, quer através da alteração dos padrões de fluxo dos electrões, podendo ser também, em maior ou menor grau, inibidoras das outras bactérias anaeróbias. O uso do ácido 2-bromoetanosulfónico (BES) como inibidor específico das bactérias metanogénicas tem ganho popularidade. Este composto é um análogo estrutural da coenzima M, que se encontra exclusivamente nas bactérias metanogénicas (BALCH E WOLFE, 1979), pelo que pode ser usado para inibir apenas a componente metanogénica de uma população bacteriana mista.

Os processos anaeróbios de conversão microbiana podem ser negativamente afectados por um vasto conjunto de **compostos antropogénicos e recalcitrantes**, embora alguns destes sejam susceptíveis de sofrerem bioconversão, se se garantirem condições adequadas de aclimatização da biomassa e se se efectuar uma correcta selecção do processo a aplicar (RINZEMA, 1988, POHLAND, 1992). Estas substâncias podem ser inibidoras da metanogénese, mesmo a concentrações muito baixas, podendo esta frequentemente decorrer após adaptação das culturas.

O efeito inibitório de certos compostos pode diminuir ou mesmo desaparecer após adaptação da biomassa, podendo esta ser real ou resultar indirectamente da degradação ou modificação biológica da substância inibitória por alguns dos organismos presentes (ALVAREZ *et al.*, 1988). Um tratamento eficiente e estável de águas residuais contendo uma elevada toxicidade pode ser alcançado através de condições de operação que permitam a adaptação da biomassa e a sua retenção em quantidades apropriadas no interior do reactor (SPEECE, 1996). O potencial de adaptação é retido pela biomassa durante longos períodos de tempo, funcionando como uma “memória” microbiana, o que permite que a posterior re-introdução da substância tóxica no processo origine um efeito inibitório menos severo (SPEECE, 1996). Por outro lado, doses reduzidas de um contaminante tóxico podem ser adicionadas propositadamente, a intervalos regulares, procurando manter a biomassa num estado de aclimatização que permita a sua disponibilidade no caso da substância tóxica surgir no processo (SPEECE, 1996).

HANAKI *et al.* (1994b) referem que a aplicação de tecnologias de imobilização de células no tratamento de águas residuais pode oferecer diversas vantagens relativamente aos processos convencionais, nomeadamente permitir uma maior retenção da biomassa no

interior do reactor, promover a protecção das células relativamente a materiais inibitórios e possibilitar a utilização selectiva de determinadas espécies particulares de bactérias.

### **1.3 Tecnologias de tratamento anaeróbio de efluentes líquidos**

O tanque séptico, introduzido nos finais do século XIX em França e Reino Unido, é o digestor anaeróbio mais simples, sendo ainda actualmente usado em algumas áreas rurais para disposição dos efluentes domésticos (RINZEMA, 1988, SCHINK, 1988). Em meados dos anos cinquenta foi introduzida a agitação mecânica, o que melhorou substancialmente o contacto entre as bactérias e os resíduos a tratar (FINNEGAN, 1994). Nestes sistemas não há retenção de biomassa, sendo o TRH (tempo de retenção hidráulico) igual ao TRS e da ordem dos 20 a 30 dias, pelo que a redução do tempo de retenção aumenta o risco de “washout” da biomassa, devido às baixas taxas de crescimento das bactérias anaeróbias (IZA *et al.*, 1991). A introdução de sistemas com retenção de biomassa (denominados de alta carga) permite a independência do TRH relativamente ao TRS, sendo considerada como um dos passos mais importantes no desenvolvimento da tecnologia anaeróbia. Tornou-se, assim, possível a operação com TRH muito menores, o que promove uma maior tolerância do sistema a choques orgânicos e à presença de substâncias tóxicas (SPEECE, 1983). De entre os processos com retenção de biomassa podem salientar-se os digestores de fluxo ascendente de manto de lamas (UASB - “Upflow Anaerobic Sludge Blanket”), desenvolvido em finais dos anos setenta (LETTINGA *et al.*, 1980), os digestores de leito expandido ou fluidizado (SWITZENBAUM E JEWELL, 1980), os processos de contacto (NÄHLE, 1991) e os processos de leito fixo (YOUNG E MCCARTY, 1967). Uma vez que neste trabalho se operou um filtro anaeróbio, este tipo de tratamento será abordado em seguida com mais pormenor.

#### **1.3.1 Processos de leito fixo**

O digestor de leito fixo ou filtro anaeróbio, desenvolvido por Young e McCarty em 1963, consiste numa coluna contendo um enchimento de características muito variáveis, o qual pode ser constituído por materiais naturais ou artificiais e estar disposto de forma

ordenada ou aleatória (YOUNG E MCCARTY, 1967, DAHAB E YOUNG, 1982, REYNOLDS, 1986, ALVES, 1998). No seu interior é possível reter grandes quantidades de biomassa, por adesão à superfície do suporte e oclusão nos espaços vazios da matriz. Estes reactores podem ser operados com fluxo ascendente ou descendente, com ou sem recirculação, e a biomassa pode encontrar-se na forma floculada ou granular (PARIS, 1983, YOUNG, 1991).

Na Figura 1.2 encontra-se esquematizado um filtro anaeróbio de fluxo ascendente.



Figura 1.2 Esquema de um filtro anaeróbio de fluxo ascendente.

As velocidades ascensionais aplicadas são, em geral, relativamente reduzidas, por forma a prevenir o “washout” do material não aderido, uma vez que este contribui significativamente para a eficiência deste tipo de processos (HALL, 1992). Por esta razão, quando se recorre à utilização de uma corrente de recirculação, a taxa de recirculação aplicada não deve ser muito elevada. No entanto, a recirculação do efluente é recomendável, porque funciona como protecção do filtro em caso de elevadas variações do caudal influente ou em casos de toxicidade, promovendo ainda a mistura e homogeneização do conteúdo do reactor (GROBICKI E STUCKEY, 1991, NACHAIYASIT E STUCKEY, 1995). A recirculação da biomassa presente na corrente de saída permite a retenção de maiores quantidades de sólidos biológicos no interior do reactor, possibilitando a aplicação de cargas orgânicas mais elevadas e melhorando o desempenho e eficiência do sistema.

Entre as diversas vantagens dos filtros anaeróbios destacam-se as seguintes (PARIS, 1983):

- elevado TRS, originando um efluente com baixos teores de sólidos,
- elevada estabilidade, apresentando grande resistência a sobrecargas orgânicas e hidráulicas, a variações súbitas de pH ou à presença de substâncias tóxicas,
- possibilidade de trabalhar intermitentemente, verificando-se um rápido restabelecimento da sua actividade após semanas ou meses sem ser alimentado.

São-lhe apontados também alguns inconvenientes, nomeadamente problemas de colmatação do leito, dificuldade de contacto entre substrato e biomassa, formação de caminhos preferenciais e limitações difusionais (YOUNG E MCCARTY, 1967, PARIS, 1983, YOUNG, 1983).

YOUNG (1991) concluiu que o TRH era o parâmetro que mais afectava a performance dos digestores anaeróbios de leito fixo. Por outro lado, relativamente à influência do meio de suporte no desempenho de um filtro anaeróbio, a característica mais importante é a capacidade do meio redistribuir o fluxo dentro da matriz, permitindo um eficiente contacto entre o substrato e a biomassa contida no reactor (DAHAB E YOUNG, 1982, SONG E YOUNG, 1986).

Num filtro anaeróbio de fluxo ascendente considera-se como secundário o papel desempenhado pela fracção de biomassa aderida, devido à sua baixa concentração relativamente à biomassa total acumulada. No entanto, a adesão proporciona uma imobilização mais estável relativamente à oclusão, originando uma maior resistência desta forma de biomassa a choques hidráulicos ou tóxicos, relativamente à fracção que se encontra dispersa nos vazios da matriz (SPEECE E PARKING, 1983). O tipo de suporte utilizado é determinante na distribuição entre as referidas formas de biomassa, uma vez que a adesão dos microrganismos é fortemente influenciada pelas características físico-químicas da superfície (nomeadamente hidrofobicidade, interacções electrostáticas, rugosidade, porosidade e tamanho dos poros) (MESSING E OPPERMAN, 1979, MOZES *et al.*, 1988). Mais do que a porosidade interna, a existência de pequenas rugosidades com tamanho semelhante ao das células favorece a fixação dos microrganismos, protegendo-os dos efeitos da tensão de corte (HUYSMAN *et al.*, 1983, ALVES, 1998). LIU *et al.* (1991) propuseram e validaram um modelo que simula o comportamento de um filtro anaeróbio, segundo o qual a biomassa aderida aumenta com o aumento da carga

orgânica até um determinado valor de espessura. Aumentos posteriores da carga orgânica provocam a acumulação da biomassa na forma oclusa, o que deteriora a qualidade do efluente final.

A concentração de biomassa presente em filtros anaeróbios de fluxo ascendente é maior na base do reactor (DAHAB E YOUNG, 1982, ALVES *et al.*, 1998a). Em geral, a concentração de substrato diminui acentuadamente a seguir à entrada, mantendo-se em níveis baixos ao longo da altura do reactor, o que sugere que a degradação ocorre essencialmente na base do digestor. No entanto, o tipo de comportamento hidrodinâmico também influencia a forma dos perfis de substrato.

Um dos problemas associados ao estudo de filtros anaeróbios é a impossibilidade de amostrar convenientemente a biomassa imobilizada sem alterar o padrão de funcionamento do reactor. Desta forma, o estudo deste tipo de digestores tem sido extremamente limitado pela dificuldade em caracterizar o comportamento e conhecer a evolução da biomassa ao longo do tempo. Normalmente efectua-se a caracterização da biomassa apenas no final da operação. Procurando obviar esta limitação, HANAKI *et al.* (1994a) procederam à remoção e caracterização das fracções de biomassa presentes ao fim de diferentes períodos de tempo, em diversos filtros anaeróbios operados em paralelo e em condições operatórias idênticas, num total de 25 digestores alimentados com diferentes tipos de substratos e em diferentes condições de tempo de retenção. Concluíram que mesmo em condições pseudo-estacionárias relativamente à produção de metano e à qualidade do efluente tratado, a biomassa apresentava um comportamento não estacionário. KENNEDY E DROSTE (1986) caracterizaram o biofilme formado num filtro anaeróbio de fluxo descendente, removendo periodicamente um módulo vertical constituinte da matriz de suporte. Para estudar o desenvolvimento do biofilme num filtro percolador anaeróbio parcialmente submerso, JIMENO *et al.* (1990) desenvolveram um digestor de filme fixo onde à entrada e à saída se encontravam acoplados pequenos tubos paralelos, que eram removidos para análise do biofilme. ALVES *et al.* (1998a) desenvolveram um digestor de leito fixo especialmente desenhado para permitir a amostragem de biomassa e suporte ao longo da operação, sem introdução de perturbações significativas no funcionamento do sistema. Este baseia-se na distribuição do leito fixo de um biorreactor por mini-biorreactores colocados em paralelo, tendo sido esta a configuração utilizada neste trabalho.

As interações entre a biomassa e o suporte em filtros anaeróbios são altamente dependentes do tipo de substrato e do tipo de suporte utilizado, assim como das condições operatórias aplicadas. As previsões do comportamento, baseadas em estudos prévios, podem falhar completamente caso os parâmetros anteriormente referidos sejam diferentes (ALVES *et al.*, 1998).

#### **1.4 Aplicação do processo de digestão anaeróbia ao tratamento de efluentes contendo lípidos**

Os lípidos são biomoléculas insolúveis em água e constituem uma das mais importantes substâncias de reserva de animais e plantas. Quimicamente são ésteres carboxílicos derivados de um único álcool, o glicerol, sendo designados por glicéridos. Os ácidos carboxílicos podem ser saturados (sem ligações duplas) ou insaturados (contém uma ou mais ligações duplas por molécula), sendo os mais frequentes o ácido oleico e o linoleico. A configuração em torno destas ligações duplas é quase invariavelmente *cis*, de preferência à configuração mais estável *trans* (MORRISON E BOYD, 1993). De entre as várias famílias de lípidos existentes, os tri-ésteres de glicerol e ácidos gordos são os mais abundantes na natureza.

Os lípidos são constituintes importantes da matéria orgânica dos efluentes e, embora estejam presentes nas águas residuais domésticas apenas em concentrações entre os 40 a 100 mg/L (FORSTER, 1992), a sua presença nos efluentes industriais é alvo de particular atenção. Lacticínios, refinarias e matadouros são exemplos de indústrias cujos efluentes contém lípidos em concentrações elevadas (RINZEMA, 1988).

Os principais problemas associados ao tratamento anaeróbio de efluentes contendo lípidos são a forte inibição das bactérias acetoclásticas e acetogénicas pelos AGCL (KOSTER E CRAMER, 1987, RINZEMA *et al.*, 1994, HWU, 1997) e a adsorção de lípidos e AGCL na biomassa, tornando-a flutuante e sujeita a eliminação por lavagem (“*washout*”) (HWU, 1997). Na prática, e devido aos problemas que introduzem nos sistemas de tratamento biológico, é usual proceder à separação prévia da matéria gorda por métodos físico-químicos (ex.: flutuação). No entanto, a fracção líquida remanescente, na forma emulsionada ou coloidal, é ainda prejudicial ao tratamento anaeróbio de efluentes (HWU *et al.*, 1996).

A hidrólise dos lípidos produz glicerol e AGCL, sendo esta uma reacção rápida, o que favorece a acumulação de AGCL no interior dos digestores. Estes ácidos mantêm cerca de 95 % da carga orgânica original e comportam-se como detergentes quando presentes em meio aquoso, o que é atribuído à sua estrutura composta por uma cauda apolar e por uma extremidade carboxílica polar.

À semelhança dos monómeros resultantes da hidrólise das proteínas e hidratos de carbono, o glicerol formado por hidrólise dos lípidos segue a via acidogénica; os AGCL são convertidos a acetato e  $H_2$  pelas bactérias acetogénicas produtoras obrigatórias de hidrogénio, através do mecanismo de  $\beta$ -oxidação (WENG E JERIS, 1976). Este consiste, basicamente, na remoção sucessiva de moléculas de acetato dos AGCL até que reste apenas acetato ou propionato, dependendo do número de átomos de carbono (RINZEMA *et al.*, 1994). Na realidade, ainda não se encontram claramente diferenciados na literatura todos os passos envolvidos na degradação anaeróbia dos AGCL, pelo que a  $\beta$ -oxidação tem sido encarada como o passo limitante deste processo (HWU, 1997).

WENG E JERIS (1976) propuseram dois mecanismos possíveis para a degradação do oleato:

- o ácido oleico é inicialmente convertido a ácido pelargónico, o qual origina acetato e propionato via  $\beta$ -oxidação; o propionato é convertido a acetato e formato, o qual origina  $H_2$  e  $CO_2$ ,
- o oleato é reduzido a estearato, o qual é degradado a acetato via  $\beta$ -oxidação.

Segundo estes autores, a primeira via tem um papel secundário na degradação do oleato, já que nos seus estudos não foram detectados níveis significativos de propionato como intermediário.

Estas reacções só são termodinamicamente favoráveis se a pressão parcial de hidrogénio for mantida em níveis baixos, inferiores a  $10^{-4}$  atm, o que é conseguido através de associações sintróficas com bactérias metanogénicas hidrogenotróficas ou sulfato-redutoras (ANGELIDAKI E AHRING, 1995). Verifica-se, assim, que a degradação dos AGCL por  $\beta$ -oxidação depende grandemente da actividade das bactérias metanogénicas, tendo-se observado que não ocorria degradação durante a fase acidogénica, onde não há produção de metano (HANAKI *et al.*, 1981).

Segundo RINZEMA *et al.* (1994), uma concentração baixa de AGCL ou lípidos na alimentação promove o crescimento das bactérias acetogénicas da  $\beta$ -oxidação.

De forma geral, pensa-se que os problemas associados ao tratamento de efluentes contendo lípidos resultam da adsorção dos AGCL à superfície da biomassa. A adsorção anaeróbia é um processo físico-químico, pelo que não se verificam diferenças entre biomassa granular activa e inactiva (Hwu *et al.*, 1998). Recentemente Hwu *et al.* (1998) estudaram a adsorção de ácido oleico na biomassa granular, em reactor fechado, verificando que após a adsorção ocorria uma dessorção, induzida pela produção de biogás (as bolhas de gás, ao ascenderem da superfície do grânulo para a fase aquosa através da camada adsorvida, causam perturbação e expulsão do oleato). No entanto, uma vez que a dessorção é mediada biologicamente, não se verificará em grânulos inactivos ou em grânulos activos inibidos a altas concentrações de AGCL. A produção de metano, que era praticamente nula durante a fase de adsorção, provavelmente devido ao efeito tóxico dos AGCL, aumentou significativamente com a dessorção, quer simultaneamente (a baixas concentrações), quer subsequentemente (a concentrações mais altas). Estes autores propuseram um modelo em quatro fases, procurando descrever o fenómeno de biossorção dos AGCL pelos grânulos activos. Segundo este, após a primeira adsorção-dessorção, verifica-se novamente o desaparecimento dos AGCL da fase aquosa, em consequência de uma nova adsorção (se a concentração inicialmente imposta de AGCL for elevada) ou de uma boa biodegradação (a baixas concentrações). Durante esta fase geralmente observa-se uma significativa produção de metano, possivelmente devido a adaptação da biomassa ou à formação de canais na camada adsorvida que permitem a passagem do biogás. Finalmente, a biodegradação dos AGCL prossegue, verificando-se a sua conversão completa a metano. Desta forma, é sugerido que a adsorção é um pré-requisito para a biodegradação dos AGCL, enquanto que a dessorção é uma consequência. A adsorção inicial ocorre rapidamente, mas o estabelecimento do equilíbrio de adsorção é um processo relativamente lento, pelo que em situações temporárias de sobrecarga apenas uma parte dos AGCL não degradados se acumulará (KEURENTJES E RINZEMA, 1986).

#### **1.4.1 Efeito inibitório dos AGCL**

No início da década de 60 McCarty descreveu a inibição do processo de digestão anaeróbia provocada pelos AGCL (McCARTY, 1964). Diversos autores referiram o seu efeito inibitório a baixas concentrações (HANAKI *et al.*, 1981, ROY *et al.*, 1985, KOSTER E



CRAMER, 1987, RINZEMA, 1988), relacionando a sensibilidade das bactérias anaeróbias com a estrutura da parede celular: as espécies Gram+ (ex.: bactérias acetogénicas capazes de degradar AGCL) e as bactérias metanogénicas têm semelhanças a nível da parede celular, sendo mais facilmente inibidas do que as espécies Gram-.

Embora pouco se conheça sobre a microbiologia da digestão dos lípidos em reactores anaeróbios, vários autores defendem que o mecanismo de toxicidade dos AGCL está relacionado com a adsorção da superfície activa ácida destes compostos na membrana celular, afectando as funções de transporte e de protecção da célula (GALBRAITH *et al.*, 1973, KOSTER E CRAMER, 1987, RINZEMA, 1988). Este facto poderia sugerir que a toxicidade dos AGCL estava relacionada com a razão concentração de AGCL/concentração de biomassa, mas KOSTER E CRAMER (1987) e RINZEMA *et al.* (1994) demonstraram que o efeito inibitório é meramente dependente da concentração dos AGCL.

HANAKI *et al.* (1981) estudaram o efeito inibitório dos AGCL em cada uma das etapas da digestão anaeróbia, em reactor fechado, verificando o aparecimento de uma longa fase de latência na produção de metano a partir de acetato e na degradação de AGCL e de n-butirato, representativa da inibição das bactérias metanogénicas acetoclásticas e das bactérias acetogénicas produtoras obrigatórias de H<sub>2</sub>. No caso das bactérias metanogénicas hidrogenotróficas a produção de metano prosseguiu sem período de latência, embora se tenha observado um decréscimo na taxa de conversão do hidrogénio. Desta forma, verifica-se que as bactérias metanogénicas acetoclásticas parecem ser mais afectadas pelo efeito inibitório dos AGCL do que as bactérias metanogénicas hidrogenotróficas. Por sua vez, a própria inibição das bactérias acetoclásticas também afecta a degradação dos AGCL, uma vez que estes são transformados através do mecanismo de  $\beta$ -oxidação, o qual conduz à formação de acetato (KOSTER E CRAMER, 1987).

Os trabalhos publicados sugerem que os AGCL, quando presentes acima de determinada concentração, exercem um efeito bactericida nas bactérias metanogénicas, não se evidenciando mecanismos de adaptação à toxicidade destes compostos. Segundo RINZEMA *et al.* (1994) as bactérias metanogénicas acetoclásticas não se adaptam ao efeito tóxico dos AGCL, nem após uma exposição repetida a concentrações tóxicas, nem após uma exposição prolongada a concentrações sub-tóxicas. No entanto, a recuperação após uma fase de latência muitas vezes observada em ensaios em reactor fechado é atribuída ao crescimento de algumas bactérias sobreviventes, levando ao desenvolvimento de

uma população acetogénica capaz de degradar os AGCL à medida que estes se vão formando, evitando assim a sua acumulação (ANGELIDAKI E AHRING, 1992, RINZEMA *et al.*, 1994). Desta forma, a resposta de um consórcio microbiano anaeróbio à adição de lípidos pode depender do grau de adaptação aos lípidos, embora a adição directa de AGCL acima de determinada concentração resulte em inibição e falha do processo (ANGELIDAKI E AHRING, 1992).

A questão da adaptação da biomassa anaeróbia à toxicidade e biodegradabilidade dos lípidos tem sido estudada, essencialmente, em ensaios em reactor fechado. Estes revelam-se importantes se realizados como complemento de operações de longo termo de digestores, pois permitem avaliar as características potenciais da biomassa e a sua evolução ao longo do tempo e com as condições operatórias (ALVES, 1998). Em estudos recentes sobre o efeito da presença de AGCL no desenvolvimento da biomassa em filtros anaeróbios, efectuados numa escala de tempo mais alargada, ALVES *et al.* (1999b) concluíram que para o tratamento de um efluente contendo oleato de sódio (e eventualmente uma mistura de AGCL) é benéfico expor a biomassa a lípidos, no sentido de desenvolver tolerância aos AGCL, podendo-se interpretar esse acréscimo de tolerância como um efeito de adaptação.

De forma geral, a toxicidade dos AGCL aumenta com o número de ligações duplas, no caso dos ácidos gordos insaturados (KOSTER E CRAMER, 1987), e será tanto maior quanto mais elevada for a concentração inicial do AGCL, devido a uma maior adsorção (Hwu *et al.*, 1998). Por outro lado, é afectada pelo tipo de biomassa, sendo essencial seleccionar um inóculo apropriado (ex.: através de testes de toxicidade) antes de iniciar o tratamento de um efluente que contenha AGCL (Hwu *et al.*, 1996). Encontra-se ainda directamente relacionada com a área específica da biomassa, sofrendo de maior efeito tóxico aquela cuja área superficial for maior, donde se conclui que a biomassa granular é mais resistente à toxicidade dos AGCL do que a biomassa suspensa (Hwu *et al.*, 1997a).

A presença de iões cálcio (ou magnésio) reduz o efeito inibitório dos AGCL, diminuindo a sua concentração na forma solúvel através da formação de precipitados. Esta concentração depende das concentrações relativas de cálcio e do AGCL e do produto de solubilidade do sal de cálcio-AGCL (ROY *et al.*, 1985). RINZEMA *et al.* (1989) verificaram que a adição de quantidades estequiométricas de  $\text{Ca}^{2+}$  a um digestor UASB alimentado com ácido láurico preveniu a inibição, até concentrações do referido AGCL de 1500 mg/L, face aos 100 mg/L inibitórios na ausência de iões cálcio. Também

HANAKI *et al.* (1981) constataram que a adição de  $\text{CaCl}_2$  reduzia a fase de latência que antecedia a produção de metano na ausência de íons cálcio, em ensaios em reactor fechado. No entanto, salienta-se que esta redução da inibição só é efectiva se não tiver ocorrido contacto entre a biomassa e o AGCL, ou, no caso de haver exposição, se esta não tiver sido superior a algumas horas (HANAKI *et al.*, 1981).

Para temperaturas elevadas, a toxicidade dos AGCL torna-se maior, podendo este facto resultar das diferenças na composição da membrana celular das espécies mesófilas e termófilas. No entanto, em condições termófilas a recuperação da metanogénese após intoxicação, bem como a própria taxa de degradação dos AGCL, tornam-se mais rápidas (HWU, 1997).

HANAKI *et al.* (1981) concluíram que o oleato era menos inibitório do que uma mistura de AGCL e HWU *et al.* (1998) referiram que uma mistura de AGCL era mais rapidamente adsorvida pelos grânulos de um reactor UASB do que o oleato, indiciando a existência de efeitos sinérgicos. KOSTER E CRAMER (1987) observaram que, devido à existência de sinergias, uma mistura de AGCL pode exercer um maior efeito bactericida do que o conjunto dos ACGL individuais a actuarem independentemente.

#### **1.4.2 Efeito da adsorção dos lípidos e AGCL na superfície da biomassa**

A aplicação da tecnologia anaeróbia ao tratamento de efluentes contendo lípidos é fortemente condicionada pela adsorção dos lípidos e AGCL à superfície da biomassa, provocando o seu “encapsulamento”, o que além de afectar o transporte de substratos e produtos torna a biomassa flutuante e sujeita a eliminação por “washout” (RINZEMA *et al.*, 1989).

SAYED *et al.* (1987) evidenciaram a ocorrência deste fenómeno de adsorção ao observarem a existência de uma discrepância entre a remoção de CQO solúvel e a produção de metano obtida ao estudarem o tratamento de um efluente contendo lípidos. HANAKI *et al.* (1981) referiram que os AGCL produzidos através da hidrólise dos lípidos aderiam à biomassa em 24 horas. SAM-SOON *et al.* (1991) utilizaram um UASB no tratamento de um efluente sintético contendo oleato como única fonte de carbono e

observaram que os grânulos inicialmente inoculados se desintegraram e que a biomassa foi encapsulada por uma massa esbranquiçada e gelatinosa.

Do ponto de vista termodinâmico a desintegração granular é previsível, uma vez que a pH neutro os AGCL se comportam como detergentes, diminuindo a tensão superficial. Desta forma, a agregação de bactérias hidrofóbicas, como são a maior parte das acetogénicas (consumidoras de AGCL) é desfavorável, aumentando a possibilidade de “washout” destas bactérias (HWU *et al.*, 1997b).

Assim, embora haja evidência de que a biomassa granular é mais resistente à toxicidade dos AGCL do que a biomassa dispersa ou floculenta, é também um facto que a granulação e a estabilidade granular são problemáticas no tratamento de efluentes contendo lípidos (SAM-SOON *et al.*, 1991, HWU *et al.*, 1997a). A aplicação de sistemas de manto de lamas do tipo UASB e EGSB (digestor anaeróbio de manto de lamas de leito expandido) ao tratamento daqueles efluentes tem sido objecto de investigação recente (RINZEMA *et al.*, 1989, HWU *et al.*, 1997a, HWU *et al.*, 1997b), sendo relatada por vários autores a falha destes sistemas no tratamento de efluentes com elevada carga lipídica, em consequência de problemas de flutuação e “washout” (SAMSON *et al.*, 1985, RINZEMA, 1988).

HWU *et al.* (1997a) observaram que a biomassa que era arrastada na corrente de saída de um digestor UASB apresentava uma elevada capacidade de biodegradação de oleato, concluindo que a sua recirculação aumentava a eficiência do sistema. PEREIRA (1998) verificou que a recirculação da biomassa, num filtro anaeróbio de fluxo ascendente alimentado com um efluente sintético contendo elevada concentração de oleato, era vantajosa para o desempenho do sistema, promovendo a minimização do efeito de “washout” da biomassa flutuante e a diluição da carga tóxica aplicada, conduzindo a uma menor inibição da população acetogénica e metanogénica.

Contrariamente aos observado nos testes em reactor fechado, a flutuação da biomassa num reactor UASB depende mais do TRH do que da concentração de AGCL. Assim, o facto do “washout” da biomassa devido a flutuação ocorrer para concentrações de tóxico inferiores aos limites de toxicidade (HWU *et al.*, 1998) evidencia o facto da flutuação constituir o principal problema do tratamento anaeróbio de efluentes contendo lípidos em digestores de manto de lamas, sobrepondo-se ao efeito inibitório dos AGCL sobre a população bacteriana (RINZEMA, 1988). Além disso, sabe-se que a adição de sais

de cálcio diminui o efeito inibitório dos AGCL, mas não previne os problemas de flutuação (HANAKI *et al.*, 1981, RINZEMA, 1988).

Desta forma, surge a possibilidade do digestor anaeróbio de leito fixo ser a configuração mais adequada para o tratamento deste tipo de efluentes, uma vez que o meio de suporte actua como um factor físico de protecção contra o “washout”, sendo potencialmente atractivo para a retenção da biomassa (ALVES, 1998).

Recentemente ALVES *et al.* (1999a) estudaram comparativamente o desenvolvimento da biomassa em digestores de leito fixo alimentados com diferentes teores de lípidos, operando inicialmente um reactor com um efluente lácteo sintético com lípidos (leite gordo) e outro com um efluente lácteo sintético sem lípidos (leite magro). A alteração gradual da composição original do substrato alimentado a ambos os reactores para oleato como única fonte de carbono, permitiu avaliar o efeito de uma pré-exposição aos lípidos sobre a biomassa desenvolvida na presença de AGCL. Estes autores concluíram que o biofilme formado na presença de lípidos, embora com menor concentração de sólidos por unidade de superfície, era mais resistente à presença de oleato do que o biofilme formado na ausência de lípidos. Com efeito, mais de 50 % deste biofilme foi removido do suporte após a introdução do oleato na alimentação.

Hwu (1997) observou que embora a biomassa granular seja mais resistente à toxicidade do oleato, apresenta uma menor capacidade de degradação do mesmo, relativamente à biomassa floculenta, pelo que poderá ser mais vantajosa a utilização de biomassa dispersa no tratamento de efluentes contendo AGCL. ALVES *et al.* (1999b) verificaram que a taxa de degradação do oleato adsorvido na biomassa floculenta se apresentava superior à taxa de degradação do oleato adicionado à biomassa adaptada mas não encapsulada, e que a adição de oleato retardava a degradação do oleato adsorvido. Surge, assim, a hipótese do material adsorvido à superfície da biomassa não ser oleato, mas sim um intermediário da sua degradação. Desta forma, a realização de ciclos sequenciais de adsorção-degradação poderá trazer vantagens relativamente a um sistema contínuo (ALVES, 1988). Do ponto de vista do tratamento de efluentes com elevada carga em oleato em filtros anaeróbios, o efeito combinado da recirculação da biomassa e a utilização de um inóculo aclimatizado é benéfico, melhorando a eficiência do sistema de tratamento (PEREIRA, 1998).

## 1.5 Operação em estado não estacionário

A manutenção da estabilidade no processo de digestão anaeróbia revela-se particularmente importante, uma vez que, em consequência de processos inibitórios complexos e da lenta dinâmica do sistema, uma perturbação do seu funcionamento pode conduzir à ocorrência de largos períodos de inactividade, antes do retorno ao seu estado normal de funcionamento.

A perturbação de um digester anaeróbio pode resultar de diversas causas, nomeadamente de (SOTO *et al.*, 1992):

- sobrecargas (orgânicas ou hidráulicas) do equipamento,
- aumento ou diminuição da temperatura (choque térmico),
- aparecimento de substâncias tóxicas ou inibitórias no processo, presentes na corrente de entrada ou formadas durante o processo degradativo,
- modificações importantes das condições físico-químicas: pH, potencial redox, temperatura,
- modificações importantes das características internas do reactor: “washout” da biomassa, colmatação por sólidos, etc.,
- alterações progressivas no equipamento (que podem afectar principalmente a qualidade da biomassa desenvolvida e a velocidade de transferência de matéria).

Nos quatro primeiros pontos são apresentadas as causas mais frequentes de perda de estabilidade e perturbação dos equipamentos durante o seu funcionamento.

Revela-se notória a necessidade de desenvolver modelos representativos do crescimento dinâmico desequilibrado das populações microbianas presentes nos consórcios metanogénicos em situações de instabilidade, para aplicação ao dimensionamento e operação dos sistemas anaeróbios de tratamento. Paralelamente, será importante realizar estudos experimentais que permitam a recolha rigorosa de dados, para verificação das bases desses modelos. Uma forma de obter informação sobre o comportamento microbiano em estado transiente é estudar reactores biológicos que foram temporariamente perturbados, por exemplo através de modificações do caudal aplicado e/ou da concentração de substrato (DELORME E KAPUSCINCKI, 1990).

### 1.5.1 Choque térmico

Os efeitos de um choque térmico dependem do valor de temperatura aplicado, do tempo de exposição às condições de choque e da composição bacteriana da biomassa (VAN LIER *et al.*, 1996).

Uma diminuição da temperatura provoca uma redução da actividade de todos os microrganismos envolvidos no processo de digestão anaeróbia, afectando principalmente os de crescimento mais lento e os que intervêm na etapa limitante (NACHAIYASIT E STUCKEY, 1995, SOTO *et al.*, 1992). Este efeito é reversível, contrariamente ao verificado após um aumento de temperatura, que pode provocar uma deterioração irreversível do processo (VAN LIER *et al.*, 1993).

HAWKES *et al.* (1995) descreveram o efeito dum choque térmico a 55 °C num filtro anaeróbio mesófilo à escala piloto. Os ácidos voláteis à saída do digester aumentaram significativamente e a remoção de CQO baixou de 60-70 % para 10 %.

LAU E FANG (1997) estudaram o efeito de choques térmicos sobre a actividade de grânulos termófilos em reactores UASB, através do aumento e diminuição da temperatura aplicada. Observaram que estes choques reduziam significativamente o desempenho do reactor, provocando uma diminuição da eficiência de remoção de CQO e uma menor produção de biomassa. Além disso, verificaram a ocorrência de “washout” da biomassa, diminuição do pH e acumulação de ácidos gordos (particularmente propionato). No entanto, ambos os reactores foram capazes de recuperar o seu funcionamento normal num período de dezoito dias após a correcção do pH e reajuste da temperatura ao seu valor inicial. O “washout” da biomassa poderá ter resultado da desintegração granular, uma vez que foi sugerido que o aumento de temperatura acelera o decaimento dos microrganismos fermentativos, os quais se pensa serem responsáveis pela estrutura dos grânulos. Assim, o seu decaimento conduziria à desintegração granular, com o conseqüente “washout” da biomassa. Os resultados dos testes de actividade metanogénica efectuados demonstraram que a actividade dos biogrânulos foi mais adversamente afectada pelo aumento de temperatura do que pela sua diminuição (verificando-se neste último caso, aparentemente, uma adaptação dos grânulos, após alguns dias de aclimatização), e que as bactérias metanogénicas acetotróficas eram menos sensíveis ao choque térmico do que os outros grupos tróficos.

O material usado como enchimento, em reactores anaeróbios de filme fixo, exerce uma influência importante no desempenho deste tipo de digestores, durante a fase de arranque e em condições de estado estacionário. ALONSO (1996), ao estudar a resposta à diminuição súbita da temperatura de 30 para 20 °C, de dois filtros anaeróbios de fluxo descendente contendo diferentes materiais de suporte, observou que o reactor com enchimento menos poroso era mais afectado pela perturbação introduzida, concluindo que o material de suporte também influencia o comportamento destes reactores em situações de choque.

### 1.5.2 Choque orgânico

Um choque orgânico resulta do aumento da carga orgânica aplicada ao sistema, podendo ser consequência de um aumento da concentração alimentada, mantendo-se o caudal constante, ou de um aumento do caudal, mantendo-se constante a concentração alimentada.

Quando se aumenta a carga orgânica aplicada a um reactor anaeróbio, verifica-se (SOTO *et al.*, 1992, DELORME E KAPUSCINSKI, 1990):

- um aumento da concentração de hidrogénio molecular na fase gasosa e aquosa, devido à impossibilidade dos microrganismos hidrogenofílicos, bem como dos sulfato- e nitrato-redutores, quando presentes, metabolizarem o hidrogénio produzido em excesso pelos microrganismos acidogénicos,
- uma acumulação de AGV (principalmente ácido butírico e propiónico), verificando-se posteriormente a síntese e acumulação de ácidos de cadeia mais longa e compostos ramificados,
- o esgotamento da alcalinidade ao bicarbonato, com o consequente aumento da concentração de dióxido de carbono presente no biogás produzido e uma diminuição significativa do pH.

O efeito combinado do aumento de pH e da acumulação de AGV inibe a actividade das bactérias anaeróbias acetoclásticas, levando a um novo aumento da concentração de acetato. Este ciclo tem como resultado final a cessação da metanogénese e uma diminuição final do pH, momento em que se diz que o reactor está acidificado.

Em consequência do estímulo resultante da adição de elevada carga orgânica ao digestor a produção de biogás pode aumentar, embora tal não signifique necessariamente um aumento na produção de metano. SMITH E MCCARTY (1990) observaram uma maior



produção de metano após a sobrecarga orgânica de um reator de mistura completa alimentado com etanol e propionato, e verificaram que esta exibiu um comportamento cíclico, influenciado pelas taxas relativas de utilização de substratos e produtos intermediários, dinâmica da população e formação de intermediários reduzidos. A eficiência de conversão dos substratos a metano diminuiu significativamente após o choque, devido à incapacidade dos microrganismos responderem de forma suficientemente rápida ao aumento da carga aplicada. Desta forma, devido à inibição das bactérias metanogénicas, a composição do biogás poderá sofrer alterações, apresentando um menor conteúdo em metano e uma maior concentração de CO<sub>2</sub> (SOTO *et al.*, 1992, MARCHAIM E KRAUSE, 1993). O maior caudal de gás libertado pode provocar, eventualmente, “*washout*” da biomassa.

GROBICKI E STUCKEY (1991) aumentaram vinte vezes a carga orgânica aplicada a um reator anaeróbio de anteparos (através da diminuição do TRH e mantendo constante a concentração da alimentação), durante 3 horas, observando o aparecimento de elevadas concentrações de ácido valérico, o qual resulta da lise celular. Estes autores verificaram ainda que o formato é um intermediário importante em condições de sobrecarga, estando associado a uma boa estabilidade do processo. Após o retorno às condições iniciais o reator recuperou a sua eficiência em 24 horas, embora se tenha verificado um considerável “*washout*” das células bacterianas, pelo que se sugere que este sistema poderá ser mais estável face a choques orgânicos resultantes de um aumento da concentração da alimentação do que face a choques orgânicos acompanhados por sobrecarga hidráulica.

A aplicação de choques orgânicos e hidráulicos a um digestor anaeróbio de duas etapas de alta carga demonstrou que o ácido láctico é um intermediário importante da fase de fermentação do processo de tratamento de águas residuais contendo hidratos de carbono (ROMLI *et al.*, 1995).

UGURLU E FORSTER (1992) estudaram a resposta de filtros termófilos de fluxo ascendente, contendo diferentes materiais de suporte e sujeitos a diferentes procedimentos de arranque, a choques orgânicos, através da diminuição do TRH ou do aumento da concentração alimentada (mantendo constante o TRH), verificando que a tolerância a esta última sobrecarga era menor. De forma geral, concluíram que os filtros termófilos são capazes de tolerar choques de curta duração, podendo-se aumentar esta tolerância através do uso de materiais de suporte que contenham nichos ecológicos que ofereçam

alguma protecção contra o “*stress*”, e aplicando procedimentos de arranque que melhorem a estabilidade do biofilme.

Uma vez que os choques orgânicos provocam um aumento da relação entre a carga orgânica aplicada e a actividade microbiana, as acções a empreender devem procurar restabelecer essa referida relação. Para tal, pode-se carregar o digestor com lamas adicionais (processo conhecido como “*dopping*”) ou diminuir a carga orgânica, quer através da redução do caudal alimentado, quer procedendo a uma diluição da corrente de alimentação. Salienta-se, no entanto, que estas duas medidas não são equivalentes, uma vez que a segunda favorece a lavagem do equipamento, promovendo o arrastamento não só dos componentes acumulados, mas também da biomassa, se não estiverem disponíveis sistemas eficazes de retenção (SOTO *et al.*, 1992).

### 1.5.3 Choque hidráulico

Uma sobrecarga hidráulica resulta da alimentação ao sistema de um caudal superior ao de operação em estado estacionário, pelo que será acompanhada por uma sobrecarga orgânica no caso de se manter constante a concentração da alimentação.

Os efeitos observáveis são similares aos resultantes de um choque orgânico, embora se possam produzir danos irreversíveis devido ao desprendimento de uma parte significativa da biomassa do meio de suporte, ou à fragmentação dos grânulos, e consequente “*washout*”, conduzindo à sua eliminação do sistema (SOTO *et al.*, 1992, GROBICKI E STUCKEY, 1991, CHUA *et al.*, 1997).

Os choques hidráulicos com baixas cargas de CQO são comuns em estações de tratamento de águas residuais de indústrias alimentares, principalmente durante a lavagem de certas unidades de fermentação (CHUA *et al.*, 1997).

CHUA *et al.* (1997) estudaram a resposta de um reactor anaeróbio de filme fixo a choques hidráulicos de 2, 4, 5 e 10 vezes (correspondentes a TRH de 2.50, 1.25, 1.00 e 0.5 dias), mantendo constante a carga orgânica aplicada. O aumento de 2, 4 e 5 vezes da carga hidráulica afectou apenas ligeiramente o desempenho do reactor, em termos de eficiência de remoção de CQO, tendo-se verificado uma recuperação das condições normais de funcionamento num período de oito dias após o início do choque. A aplicação de 0.5 dias de TRH correspondeu à carga hidráulica crítica, responsável pela

acidificação e falha do digestor, verificando-se uma diminuição acentuada da eficiência de remoção, acumulação de AGV, diminuição do pH e redução da taxa de produção de biogás, bem como do seu conteúdo em metano. No entanto, após o restabelecimento das condições iniciais, o sistema recuperou o seu desempenho em apenas três dias. Estes autores concluíram assim que o biofilme desenvolvido se revelava tolerante a choques hidráulicos a carga constante, atribuindo a sua estabilidade e capacidade de recuperação ao facto da biomassa se encontrar imobilizada: o biofilme temporariamente inibido permaneceu retido no interior do digestor, não sofrendo “washout” e podendo recuperar a sua actividade após o restabelecimento de condições favoráveis.

Os efeitos relacionados com a acidificação do reactor serão menores quando o substrato em causa for do tipo polimérico (necessitando de ser hidrolisado), uma vez que neste caso a hidrólise passa a ser a etapa limitante do processo, verificando-se que durante a sobrecarga parte do substrato deixa o reactor sem ter sido acidificado (SOTO *et al.*, 1992).

#### 1.5.4 Choque tóxico

O aparecimento de substâncias tóxicas no processo de digestão anaeróbia pode provocar um choque tóxico, o qual poderá ser ou não acompanhado por um aumento da carga orgânica ou hidráulica. Os efeitos observáveis dependerão da concentração da substância em causa, do tempo de exposição, do TRS, da capacidade de aclimatização da biomassa e da temperatura de operação (SPEECE, 1996).

UGURLU E FORSTER (1992) estudaram a resposta de filtros termófilos de fluxo ascendente contendo diferentes materiais de suporte a um choque tóxico, efectuado através da modificação da alimentação de um efluente sintético facilmente biodegradável para um efluente contendo biocidas. O desempenho do reactor foi grandemente afectado, observando-se uma diminuição na produção de biogás e na percentagem de remoção de TOC e um aumento na concentração de AGV. A re-introdução do efluente original, 29 dias após o início do choque, conduziu ao restabelecimento das condições existentes antes da perturbação, indicando que os componentes biocidas presentes no resíduo apenas exerceram um efeito inibidor sobre a biomassa, nomeadamente sobre as bactérias acetogénicas e acetoclásticas. Estes autores sujeitaram os mesmos filtros a choques orgânicos, tendo observado que o choque tóxico foi o que exerceu efeitos mais pronunciados.

Um choque tóxico de AGCL pode provocar a inactividade de um reactor durante longos períodos de tempo, devido à influência que estes têm sobre o crescimento bacteriano e ao efeito bactericida que exercem sobre as bactérias metanogénicas, quando presentes acima de determinada concentração (RINZEMA *et al.*, 1989, ANGELIDAKI E AHRING, 1992).

Após adição de diferentes concentrações de oleato de sódio, em reactor fechado, a células imobilizadas numa matriz de PVC e a células não imobilizadas, HANAKI *et al.* (1994b) verificaram que a adsorção do ácido oleico pela matriz protegeu as células imobilizadas do contacto directo com este tóxico. Contrariamente ao observado no caso das células não imobilizadas, não ocorreu período de latência na produção de metano, embora esta tenha diminuído com a adição de grandes quantidades de oleato, e não houve formação de colóides brancos, apresentando-se o sobrenadante destes frascos extremamente límpido.

No Sub-Capítulo 1.4, a toxicidade dos lípidos e AGCL é abordada com mais pormenor.

A inibição de qualquer uma das fases do processo de digestão anaeróbia, devido à presença de determinada substância tóxica, terá consequências negativas sobre as outras fases, pelo que será particularmente importante determinar os limites de toxicidade para as várias populações envolvidas, bem como avaliar a capacidade e os efeitos de aclimatização desses grupos (COLLERAN *et al.*, 1992).

## **1.6 Monitorização e controlo do processo de digestão anaeróbia**

Os digestores anaeróbios podem revelar-se bastante sensíveis a variações de caudal, da carga orgânica aplicada e da temperatura, bem como à presença de substâncias tóxicas, devido à reduzida velocidade de crescimento das bactérias metanogénicas. Quando perturbados, estes sistemas recuperam lentamente, pelo que será importante evitar situações de instabilidade (HICKEY E SWITZENBAUM, 1988).

A monitorização e controlo dos processos de tratamento anaeróbios visam a manutenção de condições de operação óptimas e estáveis, procurando assegurar um melhor desempenho destes sistemas. Para tal, determinam-se periodicamente os valores de certos parâmetros, representativos da actividade biológica, consumo de substrato, acumulação de produtos intermediários e formação de produtos finais. O indicador ideal

será aquele que, sendo fácil de medir, assinala a existência iminente de perturbações, possibilitando a adopção rápida e inequívoca de medidas correctivas (SOTO *et al.*, 1992, HICKEY E SWITZENBAUM, 1988, MARCHAIM E KRAUSE, 1993).

Os parâmetros de controlo mais frequentemente usados são o pH, a concentração de AGV, a remoção de CQO, o caudal e composição do biogás produzido, e a relação entre a alcalinidade total e a originada pelos AGV (SOTO *et al.*, 1992). De forma geral, estes parâmetros são úteis na detecção de mudanças graduais, assinalando a existência de perturbações já depois destas se terem iniciado, pelo que não são adequados, na maior parte dos casos, para evitar o fracasso do sistema (HICKEY E SWITZENBAUM, 1988, MARCHAIM E KRAUSE, 1993).

Na Tabela 1.1 encontram-se compilados os valores do tempo de relaxação para diferentes parâmetros descritivos do processo de digestão anaeróbia, entendendo-se este como o tempo necessário para um determinado parâmetro assinalar a ocorrência de uma modificação numa variável independente do processo.

Tabela 1.1 Valores teóricos do tempo de relaxação para diferentes substâncias e populações microbianas presentes em digestores anaeróbios (SOTO *et al.*, 1992).

	<b>Tempo</b>
<b>Substância</b>	
H <sub>2</sub>	15 s
Glucose	3 min
CO <sub>2</sub>	1 h
Acetato	2 h
Propionato	4 h
Metano	2 dias
CO	?
<b>Populações microbianas</b>	
Acidogénicas	30 min
Propionofílicas	5 dias
Metanogénicas acetoclásticas	10 dias
Metanogénicas hidrogenofílicas	25 dias

\* Possivelmente relacionado com o valor referente ao H<sub>2</sub>.

Os níveis de H<sub>2</sub> usualmente presentes na fase gasosa dos digestores anaeróbios encontram-se compreendidos entre 10 a 500 ppm. O aumento da concentração desta

substância funciona como um indicador de um afastamento do sistema relativamente às suas condições de estado estacionário, em consequência de sobrecargas orgânicas ou hidráulicas, entrada de substâncias tóxicas ou choques térmicos. A monitorização da concentração de  $H_2$  revela-se, assim, aparentemente vantajosa, devido à sua resposta rápida a alterações sofridas pelo sistema, podendo ser realizada em linha e em tempo real (HICKEY E SWITZENBAUM, 1988, SOTO *et al.*, 1992). No entanto, KIDBY E NEDWELL (1991) investigaram o efeito de sobrecargas hidráulicas nos níveis de hidrogénio no biogás, para avaliar a utilidade deste parâmetro como alarme indicador de instabilidade, e concluíram que, no caso do passo limitante da conversão dos materiais orgânicos a metano ser a fase de hidrólise, estes níveis só aumentavam após a falha irreversível do sistema, limitando a sua utilidade como detector de problemas operacionais. Para substratos solúveis e facilmente hidrolisáveis, a monitorização do  $H_2$  pode fornecer informações importantes sobre o equilíbrio/desequilíbrio das populações (NACHAIYASIT E STUCKEY, 1995). MARCHAIM E KRAUSE (1993) referem que a monitorização das quantidades de  $H_2$  e  $CO_2$  apresenta custos elevados, mas permite estimar a actividade metanogénica das populações em causa.

As relações existentes entre os diversos AGV presentes na digestão anaeróbia têm sido bastante estudadas, uma vez que estes compostos são precursores importantes na formação de metano e são inibidores potenciais do processo quando presentes em concentrações excessivas. Recentemente, o seu papel como eventuais indicadores do desempenho de reactores anaeróbios, particularmente no que se refere a situações de “stress”, tem despertado a atenção dos investigadores (HILL E HOLMBERG, 1988). MARCHAIM E KRAUSE (1993) verificaram que a razão entre os ácidos propiónico e acético aumentava imediatamente após o aumento da concentração da alimentação (sobrecarga orgânica), e antes de ser notória qualquer variação na composição do biogás, sugerindo assim que esta razão pode funcionar como um indicador de um fracasso iminente do processo de digestão anaeróbia, em consequência de situações de sobrecarga. Este método de controlo revela-se mais fácil e mais barato do que a monitorização da fase gasosa do processo. HILL *et al.* (1987) sugeriram que uma razão ácido propiónico/acético superior a 1.4 assinala um fracasso iminente do digestor, recomendando que este indicador deve ser usado conjuntamente com a determinação da concentração de ácido acético (a qual informará da situação de falha do processo para valores superiores a 800 mg/L).

Uma vez que estão presentes em concentrações praticamente nulas ou muito baixas em digestores a funcionar correctamente, os AGV de cadeia mais longa (ex.: butírico, iso-butírico, valérico, iso-valérico) têm sido pouco estudados no sentido de desenvolver índices de “*stress*”/falha do processo de digestão anaeróbia. HILL E HOLMBERG (1988) sugerem que níveis individuais dos ácidos iso-butírico e/ou iso-valérico inferiores a 5 mg/L significam que o processo de digestão anaeróbia se está a processar de forma adequada; níveis entre 5 e 15 mg/L sugerem a existência de problemas e a iminência de fracasso, proporcionando cerca de uma semana de avanço relativamente a essa situação; níveis superiores a 15 mg/L indicam que o processo falhou.

Nos sistemas de digestão anaeróbia mais avançados actualmente disponíveis, a instalação final é altamente instrumentalizada, permitindo a monitorização contínua de todas as variáveis importantes para a operação, e possui um sistema de alarme que assinala os desvios relativamente a valores ou estratégias de controlo pré-estabelecidas. Estes sistemas exigem, assim, equipamento e um nível tecnológico apropriado, experiência técnica e ausência de restrições temporais ou económicas (BARFORD, 1988).

A conjugação de modelos dinâmicos com técnicas de monitorização da fase líquida e gasosa revela-se interessante no sentido de estimar e prever em linha o estado do processo e aplicar sistemas de controlo por “*feedback*” (POHLAND, 1992). ROMLI *et al.* (1995) desenvolveram um modelo dinâmico capaz de descrever a resposta de um sistema anaeróbio de tratamento de efluentes de alta carga, em duas etapas, a um choque orgânico e hidráulico. Com base neste modelo, está actualmente a ser implementada uma estratégia de optimização de um sistema de tratamento anaeróbio à escala real de efluentes de uma indústria cervejeira: procede-se à monitorização contínua do sistema e, recorrendo às previsões do modelo, ajustam-se vários parâmetros operacionais, procurando-se alcançar uma operação estável e económica.

## 1.7 Objectivos

Com este trabalho pretendeu-se estudar o efeito de sobrecargas tóxicas (de ácido oleico) - orgânicas e hidráulicas – no desenvolvimento da biomassa num filtro anaeróbio, bem como no seu desempenho. Para tal, o digestor foi alimentado com um efluente lácteo sintético contendo oleato, aumentando-se cinco vezes a carga orgânica aplicada, quer através do aumento da concentração (choque orgânico), quer através da diminuição do tempo de retenção hidráulico (choque hidráulico).

A biomassa desenvolvida no digestor durante estas situações de instabilidade foi estudada relativamente aos seguintes parâmetros: quantidade total e distribuição das várias fracções (oclusa e aderida) no suporte; actividade metanogénica específica em acetato,  $H_2/CO_2$ , propionato, butirato e etanol; actividade acidogénica em lactose; toxicidade do oleato de sódio sobre as bactérias acetoclásticas antes e após cada choque.



## 2. Materiais e Métodos

### 2.1 Instalação experimental

Na Figura 2.1 encontra-se esquematizada a instalação experimental utilizada neste trabalho. O reactor anaeróbio de leito fixo foi construído a partir de um tanque cilíndrico em PVC, com um diâmetro interno de 48 cm e um volume útil de 86 L. A entrada da alimentação encontrava-se localizada na zona central da base do digestor, existindo a 5 cm do fundo um agitador de tipo hélice (Zona I, na Figura 2.1). Embora nesta secção não existisse material de suporte, parte significativa da biomassa podia aqui ficar retida. A uma altura de 10 cm da base fixou-se uma placa perfurada, que serviu de apoio ao material de suporte e que era atravessada no centro pelo veio do agitador. A uma altura de 10 cm da base fixou-se uma placa perfurada, que serviu de apoio ao material de suporte e que era atravessada no centro pelo veio do agitador.

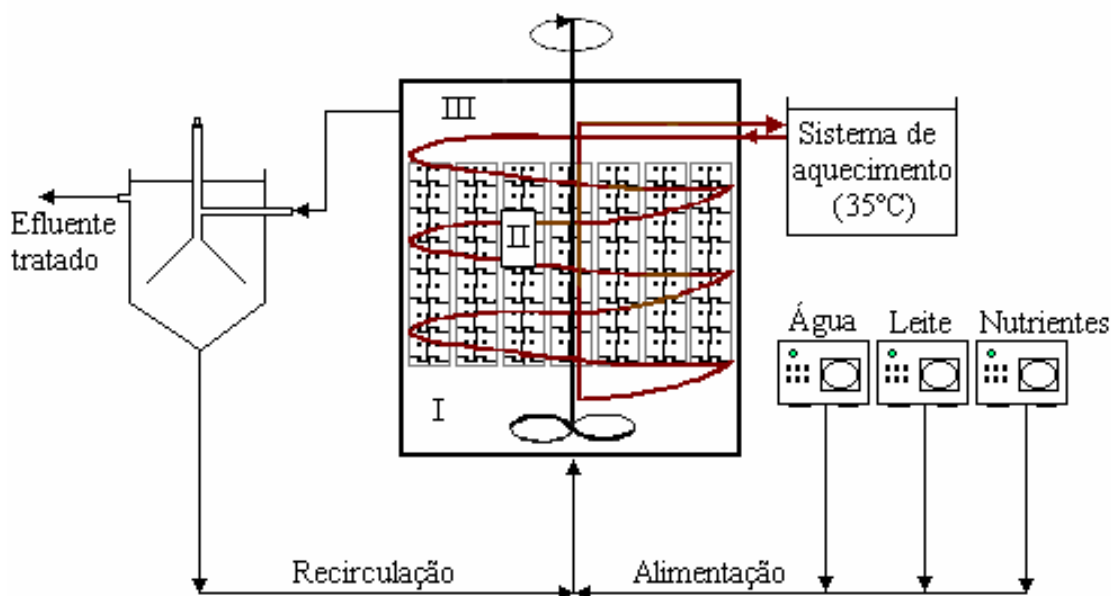


Figura 2.1 Representação esquemática da instalação experimental utilizada.

A secção de leito fixo (volume total = 40 L), situada na parte central do biorreactor (Zona II), consistiu num conjunto de 27 mini-biorreactores similares, colocados em paralelo, tendo-se utilizado anéis de *Raschig* como suporte. As dimensões e características destes materiais encontram-se resumidas na Tabela 2.1, e na Figura 2.2 está representada uma vista da secção do biorreactor.

Tabela 2.1 Dimensões e características do suporte e do leito.

	Unidade de suporte	Mini-biorreactor	Leito
Número	86/mini-biorreactor	27	-
Altura (cm)	2.10	25	25
Diâmetro interno (cm)	1.97	7.1	-
Diâmetro externo (cm)	2.10	7.5	-
Porosidade	-	-	0.92
Area interfacial, (m <sup>2</sup> /m <sup>3</sup> )	-	-	230

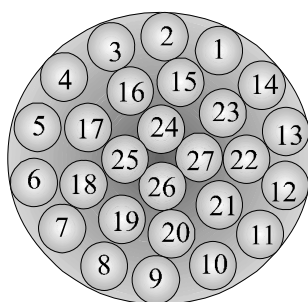


Figura 2.2 Vista da secção do biorreactor.

A entrada e saída da serpentina de aquecimento, bem como a saída do efluente tratado, situavam-se na parte superior do digestor (Zona III). O efluente era encaminhado para um sedimentador, procedendo-se à recirculação da biomassa aí acumulada. Não foi possível efectuar a recolha e análise do biogás produzido, pois este escapava-se pelo rolamento que permitia o movimento giratório do veio do agitador, colocado na tampa do digestor.

O reactor foi inoculado com 15 L de lamas provenientes de um digestor anaeróbio integrado na estação de tratamento de águas residuais de Frossos, Braga. Para remoção dos sólidos mais grosseiros fez-se passar estas lamas por crivos com 2 e 4 mm de

abertura de malha, antes da inoculação, obtendo-se um teor em sólidos suspensos totais de 25.3 g/L e em sólidos suspensos voláteis de 10.1 g/L.

O digestor foi alimentado com um efluente lácteo sintético, obtido por diluição de leite magro comercial com água da rede municipal, e suplementado com macro e micronutrientes. A solução de macronutrientes foi adicionada na proporção de 0.6 mL/gCQO alimentado e a solução de micronutrientes adicionou-se na quantidade fixa de 1 mL/L, de acordo com a seguinte composição:

**Macronutrientes** -  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ : 30.2 g/L;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ : 28.3 g/L; KCl: 45 g/L.

**Micronutrientes** -  $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ : 2 g/L;  $\text{H}_3\text{BO}_3$ : 0.05 g/L;  $\text{ZnCl}_2$ : 0.05 g/L;  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ : 0.038 g/L;  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ : 0.5 g/L;  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ : 0.05 g/L;  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ : 0.09 g/L;  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ : 2 g/L;  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ : 0.092 g/L;  $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ : 0.164 g/L; EDTA: 1g/L; Resazurina: 0.2 g/L; HCl 37%: 1 mL/L. A composição desta solução baseou-se no trabalho de ZEHNDER *et al.* (1980).

A manutenção de valores adequados de alcalinidade (2500-5000 mgCaCO<sub>3</sub>/L) foi efectuada através da adição de 5 g de NaHCO<sub>3</sub>/L.

## 2.2 Análises de rotina

O controlo analítico de rotina do desempenho do digestor ao longo do tempo de operação baseou-se na determinação periódica (2 a 3 vezes por semana) dos seguintes parâmetros:

- carência química de oxigénio (CQO) total à entrada e solúvel à saída,
- ácidos gordos voláteis (AGV) presentes na corrente de saída,
- sólidos voláteis (SV) à saída do digestor,
- caudais alimentados.

### 2.2.1 Carência química de oxigénio (CQO)

A carência química de oxigénio (CQO) é usada como uma medida do oxigénio equivalente à fracção orgânica da amostra susceptível de ser oxidada por um oxidante químico forte. Neste trabalho utilizou-se o método do refluxo fechado com titulação (STANDARD METHODS, 1989), no qual a matéria orgânica presente na amostra é oxidada

com uma quantidade definida e em excesso de dicromato de potássio, em meio ácido. Após digestão durante 2 horas a 150 °C e arrefecimento, o excesso de dicromato de potássio é titulado com sulfato de ferro e amónio, utilizando-se um indicador de ferroína para detectar o ponto de viragem (indicado pela passagem de uma cor amarela-esverdeada para laranja-acastanhada). A concentração de matéria orgânica, expressa em mg O<sub>2</sub>/L é calculada por:

$$\text{CQO (mg O}_2\text{/L)} = \frac{(V_{t\text{-branco}} - V_{t\text{-amostra}}) \times 8000 \times M}{V_a}$$

em que:  $V_{t\text{-branco}}$  é o volume de titulante gasto na titulação do branco

$V_{t\text{-amostra}}$  é o volume de titulante gasto na titulação da amostra

M é a molaridade da solução titulante de Sulfato de Ferro e Amónio

$V_a$  é o volume de amostra

Para a análise do CQO solúvel procedeu-se a uma centrifugação prévia da amostra durante 10 minutos a 15000 rpm.

### 2.2.2 Ácidos gordos voláteis (AGV)

O método utilizado para análise dos AGV foi a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (*Jasco*, Japão), recorrendo-se a uma coluna Chrompack (300x6.5 mm) e operando-se o detector espectrofotométrico a um comprimento de onda de 210 nm. A temperatura de operação foi 60°C e utilizou-se H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.01N como eluente, a um caudal de 0.7 mL/min. A fase móvel foi preparado por filtração com uma membrana de porosidade 0.45 µm e desgasificação num banho de ultra-sons (*Sonicor SC 52*) durante 5 minutos. As amostras foram analisadas após centrifugação durante 10 minutos a 15000 rpm.

Apresentam-se em seguida as expressões das curvas de calibração determinadas para os diferentes ácidos analisados, bem como os erros associados ao declive e ordenada na origem, que se propagaram aos valores calculados:

- Lático:                    Conc. (mg/L) = (-0.21 ± 5.25) + (9.53 ± 0.09) × 10<sup>-4</sup> × Área
- Fórmico:                    Conc. (mg/L) = (0.53 ± 7.51) + (5.523 ± 0.07) × 10<sup>-4</sup> × Área

- Acético:  $\text{Conc. (mg/L)} = (1.58 \pm 5.29) + (9.17 \pm 0.10) \times 10^{-4} \times \text{Área}$
- Propiónico:  $\text{Conc. (mg/L)} = (1.25 \pm 6.25) + (9.04 \pm 0.12) \times 10^{-4} \times \text{Área}$
- iso-Butírico:  $\text{Conc. (mg/L)} = (-9.49 \pm 10.41) + (7.06 \pm 0.15) \times 10^{-4} \times \text{Área}$
- n-Butírico:  $\text{Conc. (mg/L)} = (2.04 \pm 9.13) + (9.61 \pm 0.13) \times 10^{-4} \times \text{Área}$

### 2.2.3 Sólidos voláteis (SV)

O conteúdo em SV presente na corrente de saída do digestor foi determinado através da diferença de peso da amostra após evaporação a 103-105 °C (até atingir peso constante) e depois de calcinada a 550 °C (STANDARD METHODS, 1989), tendo-se sempre efectuado estas análises em triplicado ou quadruplicado.

Este procedimento foi também utilizado na determinação dos SV no final dos ensaios de actividade metanogénica e acidogénica e dos testes de toxicidade.

## 2.3 Modo de operação

Durante a fase de arranque aumentou-se gradualmente a carga orgânica aplicada até um valor de 6 Kg CQO/m<sup>3</sup>.dia (correspondente a 4000 mg CQO/L e TRH de 16 horas), alimentando-se o reactor com leite magro e posteriormente com uma mistura de leite magro e oleato de sódio (em partes iguais em termos das suas contribuições para o CQO da alimentação). Esta proporção manteve-se constante ao longo de todas as etapas seguintes. Após o período de arranque aumentou-se cinco vezes a concentração alimentada, mantendo-se constante o TRH, pretendendo simular uma situação de choque orgânico. Durante a terceira etapa diminuiu-se cinco vezes o TRH e manteve-se constante a concentração, provocando um aumento da carga orgânica através de uma sobrecarga hidráulica. Ao longo deste trabalho designar-se-á esta situação por choque hidráulico. Desta forma, a carga orgânica aplicada foi igual em ambos os casos, sendo de 30 Kg CQO/m<sup>3</sup>.dia. A duração dos dois choques foi de 4 dias, findo os quais se retornou às condições pré-choque.

Na Tabela 2.2 encontram-se resumidas as condições de operação aplicadas em cada etapa, e a respectiva duração de cada período de funcionamento do digestor.

Aplicou-se de uma corrente de recirculação, definindo-se que o factor de recirculação seria aproximadamente 1, excepto no caso do choque hidráulico, onde se atingiriam

valores excessivos de velocidade ascensional do líquido. Nesta situação, manteve-se o valor de caudal de recirculação aplicado na etapa anterior.

Tabela 2.2 Descrição das condições operacionais e duração de cada etapa de operação.

Período	Tempo (dias)	Concentração (mg CQO/L)	TRH (dias)	Carga org. aplicada (Kg CQO/m <sup>3</sup> .dia)	Comentários
I	0-16	2000	4	0.5	
	16-34	2000	2	1	
	34-54	4000	2	2	
	54-83	4000	1	4	
	83-102	4000	1	4	Introdução do oleato
	102-140	4000	0.667	6	Condições pré-choque
II	140-144	20000	0.667	30	Choque orgânico
	144-230	4000	0.667	6	Condições pré-choque
III	230-234	4000	0.133	30	Choque hidráulico
	234-286	4000	0.667	6	Condições pré-choque

## 2.4 Amostragem da biomassa

Durante as duas situações de instabilidade resultantes da perturbação do funcionamento do digester (choque orgânico e choque hidráulico) procedeu-se à abertura regular do biorreactor, para recolha de biomassa. Esta foi posteriormente separada nas suas fracções oclusa e aderida, e estudada relativamente ao desenvolvimento e colonização do suporte, actividade metanogénica e acidogénica e toxicidade ao oleato. A recolha da biomassa em cada período de amostragem foi efectuada através da remoção de alguns dos 27 mini-biorreactores, seleccionados aleatoriamente, procedendo-se à mistura da biomassa presente em cada um deles e à sua análise conjunta. Para minimizar as perturbações resultantes deste procedimento de amostragem procurou-se manter o tipo de escoamento no reactor, efectuando-se a substituição dos mini-biorreactores por outros contendo biomassa proveniente da limpeza do sedimentador. À medida que iam sendo seleccionados, os mini-biorreactores eram excluídos do sorteio seguinte.

Esta operação de abertura e recolha da biomassa foi feita na presença de azoto, e antes de se fechar o reactor injectou-se uma mistura de  $N_2/CO_2$  (80/20) na zona superior do digestor.

## **2.5 Caracterização da biomassa**

### **2.5.1 Separação e quantificação**

A biomassa recolhida em cada período de amostragem foi espalhada num banho de água destilada, o qual foi agitado manualmente com movimentos giratórios de sentido alternado durante 1 minuto. A fracção que se desprende do suporte em consequência deste procedimento constitui a porção de biomassa oclusa. Uma vez que esta seria posteriormente utilizada para a realização dos testes de actividade e toxicidade, esta operação foi efectuada na presença de  $N_2/CO_2$  (80:20), visando a manutenção das condições de anaerobiose. Procedeu-se, em seguida, à sua decantação, centrifugação a 6000 rpm durante 10 minutos e ressuspensão em tampão anaeróbio, determinando-se então o volume total e o conteúdo em sólidos voláteis. As amostras foram armazenadas a 4 °C, dando-se início aos testes de actividade metanogénica específica com a maior brevidade possível.

A separação da biomassa aderida foi efectuada através da agitação do suporte, imerso em NaOH 0.1N, a 100 rpm e a 37 °C durante pelo menos 12 horas, e posterior sonicação da fracção líquida resultante num banho (*Sonicor SC 52*), durante 10 minutos. Determinou-se o volume total e o conteúdo em sólidos voláteis.

### **2.5.2 Testes de actividade metanogénica específica**

Procedeu-se à determinação da actividade metanogénica específica da fracção de biomassa oclusa recolhida em cada período de amostragem, relativamente a substratos directos (acetato e  $H_2/CO_2$ ) e indirectos (propionato, butirato e etanol) da metanogénese. Estes últimos são representativos das bactérias acetogénicas produtoras obrigatórias de hidrogénio (sintróficas). Para tal realizaram-se testes em frascos selados, procedendo-se à monitorização ao longo do tempo da variação de pressão resultante da produção de biogás, em consequência da degradação dos diferentes substratos (COLLERAN *et al.*,

1992). As leituras dos valores de pressão foram efectuadas recorrendo a um transdutor de pressão portátil (*Centrepoints Electronics*, Galway, Irlanda), com um sensor de diafragma (*nº 303-343, R.S. Components Ltd.*, Corby, Northants, Inglaterra) capaz de medir variações de pressão de  $\pm 2$  atmosferas ( $0 \pm 202.6$  KPa), expressas na gama dos  $-200$  a  $+200$  mV (Figura 2.3). O sensor encontra-se ligado a um painel digital (*nº 258-041, R.S. Components Ltd.*, Corby, Northants, Inglaterra) e é alimentado por um transformador de 9V DC. Em cada leitura verifica-se a perda de cerca de  $30 \mu\text{L}$  de biogás, o que representa uma fracção mínima do biogás total produzido num teste, pelo que não é necessária a aplicação de um factor de correcção.

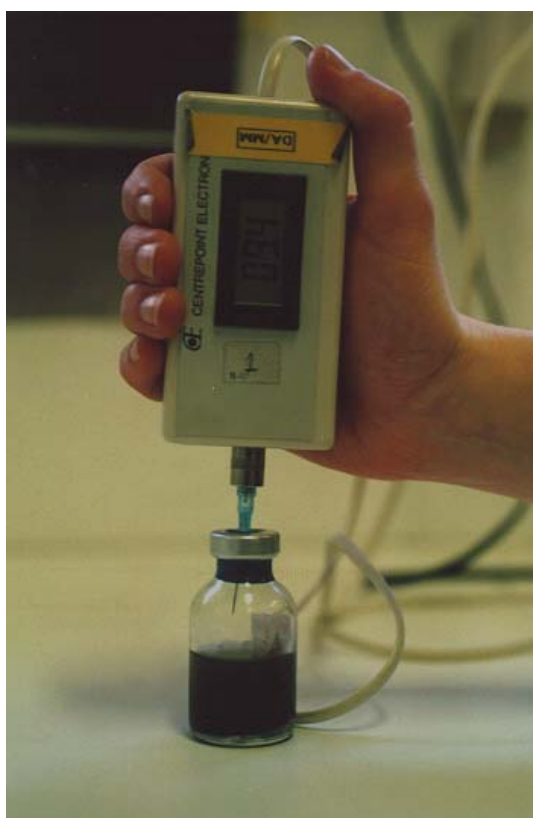


Figura 2.3 Medição da pressão no interior de um frasco selado com o transdutor de pressão portátil.

### **Procedimento experimental**

Efectuaram-se testes de actividade metanogénica específica relativamente a substratos líquidos (acetato, propionato, butirato e etanol) e a um substrato gasoso ( $\text{H}_2/\text{CO}_2$ ).



Em cada teste com substratos líquidos, os ensaios foram feitos em triplicado para cada substrato e para o branco, num total de 15 frascos. O volume de trabalho foi 12.5 mL, sendo 25 mL o volume total de cada frasco.

Nos testes com o substrato gasoso, os ensaios foram feitos também em triplicado, usando-se uma mistura de H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (80/20 % v/v) como substrato e uma mistura inerte de N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (80/20) nos ensaios em branco. Neste caso, o volume de trabalho foi 12.5 mL e o volume total dos frascos 70 mL.

A cada frasco previamente “lavado” com N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (80/20) adicionaram-se, em condições anaeróbias estritas, determinados volumes de biomassa e tampão anaeróbio, de modo a que num volume de trabalho de 12.5 mL a concentração de sólidos voláteis (SV) estivesse compreendida entre 2 e 5 g/L, e preferencialmente próxima de 3 g/L. Fecharam-se os frascos com rolhas de borracha butírica (n<sup>o</sup> 2048-11800, *Belco glass Inc., Vineland, N.M.*) e selaram-se com cápsulas em alumínio (n<sup>o</sup> 13214, *Pierce, UK*). Em seguida, de acordo com o procedimento sugerido por DOLFING E BLOEMEN (1985), procedeu-se à aclimatização dos frascos a 37 °C com agitação (150 rpm), num agitador orbital (*Braun Certomat R*), durante uma noite.

Nos teste com substratos líquidos adicionou-se a cada frasco, em seguida, 125 µL de substrato, excepto aos frascos relativos aos ensaios em branco. Após remoção do excesso de pressão devida à degradação de substrato residual, os frascos foram incubados a 37 °C e a 150 rpm.

No caso dos testes com o substrato gasoso cada frasco foi pressurizado a 1 bar com a respectiva mistura reagente, sendo seguidamente incubado a 37 °C e a 150 rpm.

Após uma hora de incubação nessas condições iniciou-se a medição da pressão nos frascos (em *mV*). As leituras foram repetidas com intervalos de 1 a 2 horas, dependendo da velocidade de produção de metano, dando-se especial atenção à fase inicial, que é a considerada para cálculo da actividade metanogénica específica. A degradação dos substratos líquidos conduz a um aumento da pressão, verificando-se um decréscimo no caso da conversão da mistura de H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> em metano. Esta diminuição de pressão corresponde à transformação de 5 moles de H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> em apenas uma mole de metano (4H<sub>2</sub>+CO<sub>2</sub>→CH<sub>4</sub>+2H<sub>2</sub>O). Considerou-se que o teste havia terminado quando a pressão deixou de variar, indicando que todo o substrato havia sido consumido.

No final do teste procedeu-se, sequencialmente, à análise do biogás formado, à medição do volume de vazio de cada frasco e à determinação do conteúdo em sólidos voláteis presentes em cada frasco (com a totalidade do conteúdo dos mesmos).

A percentagem de metano presente no biogás foi determinada por cromatografia gasosa (CG), utilizando um cromatógrafo *Pye Unicam GCD*, com uma coluna Chrompack Haysep Q (80-100mesh) operada a 40 °C, e um detector de ionização de chama (T=130°C). A temperatura do injector era 120 °C e utilizou-se azoto como gás de arraste, a um caudal de 30 mL/min. A calibração do aparelho foi efectuada sempre que se procedeu a uma análise, injectando-se uma mistura gasosa contendo metano numa percentagem semelhante à da amostra. As injeções das amostras e das misturas de calibração foram sempre feitas em triplicado. O volume injectado era de 0.5 mL.

A determinação do volume de espaço vazio de cada frasco foi feita por injeção de uma quantidade conhecida de ar, registando-se o correspondente aumento de pressão por mL de ar injectado (mV/mL). Este procedimento foi realizado em triplicado para cada frasco.

### **Meio basal (tampão anaeróbio)**

Adiciona-se 1mL/L de uma solução de resazurina (1g/L) e 0.5g/L de Cisteína-HCL a água destilada. Após ajuste do pH a um valor de 7-7.2, pela adição de NaOH ou HCL 8N, leva-se à ebulição até o indicador de resazurina mudar de cor rosa para incolor, indicando que está em condições anaeróbias. A ebulição deve ser lenta para impedir que a cisteína se converta em cistina, composto tóxico para as populações microbianas que se pretendem caracterizar.

O meio é arrefecido em gelo, na presença de azoto, e quando se atinge uma temperatura de cerca de 40-50°C este gás é substituído por N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (80/20) e adicionam-se 3.05g/L de bicarbonato de sódio.

### **Substratos líquidos**

Prepararam-se soluções “*stock*” dos diferentes substratos líquidos em concentrações 100 vezes superiores às de trabalho.

Cada mole de acetato, propionato e etanol produz, respectivamente, 1, 1.75 e 1.5 moles de CH<sub>4</sub>, enquanto que 2.5 moles de CH<sub>4</sub> são formadas por mole de butirato. Desta forma, a solução “stock” deste último substrato foi preparada com uma concentração inferior às restantes. Assim, as soluções de acetato, propionato e etanol foram preparadas com uma concentração de 3 M e a de butirato com 1.5 M. Todas as soluções “stock” foram neutralizadas a pH 7, e armazenadas a 4 °C.

### **Substrato gasoso**

A actividade metanogénica hidrogenofílica foi avaliada utilizando-se uma mistura de H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (80/20 %v/v) como substrato (COATES *et al.*, 1996). Nos ensaios em branco utilizou-se uma mistura inerte de N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (80/20).

### **Cálculo da actividade metanogénica**

#### **• Substratos Líquidos**

Com base na representação gráfica dos valores de *mV* medidos em função do tempo calculam-se os respectivos declives na zona linear inicial, em *mV* por hora. Dividindo estes declives pelos valores de *mV/mL* (correspondentes ao aumento de pressão em *mV* por *mL* de ar injectado) exprimem-se os valores dos declives em *mL* de biogás produzido por hora (*mL/h*). A percentagem de metano presente no biogás produzido durante os testes foi determinada pela seguinte equação:

$$MP = \frac{(V_h + V_c)}{V_c} \times \%CH_4$$

em que: *V<sub>h</sub>* é o volume de gas inicialmente presente no frasco (volume de vazio do frasco)

*V<sub>c</sub>* é o volume do biogás produzido durante o teste

*%CH<sub>4</sub>* é a percentagem de metano presente no biogás contido em cada frasco no final do ensaio

*V<sub>c</sub>* e *V<sub>h</sub>* podem ser calculados através das seguintes equações:

$$V_c = \frac{\text{leitura final, mV}}{\text{mV / mL}}$$

$$V_h = \frac{\text{leitura em mV correspondente a 1 atm}}{\text{mV / mL}}$$

Multiplicando os mL de gás produzido numa hora por 24, pela percentagem de metano e pelo factor de calibração do transdutor (FC), e dividindo o resultado pelos sólidos voláteis, obtém-se o valor final da actividade metanogénica específica:

$$\text{Actividade metanogénica específica} = \frac{\text{mL/h} \times 24 \times \text{MP} \times \text{FC}}{\text{SV}} \quad [\text{mLCH}_4 @ \text{PTN/gSV.dia}]$$

FC representa um factor de calibração de cada transdutor utilizado, e contempla a conversão dos valores para as condições normais de pressão e temperatura (PTN) (**Apêndice A**). Aos valores de actividade assim obtidos subtrai-se a actividade específica, calculada da mesma forma, para os brancos.

### • Substrato Gasoso

O decréscimo de pressão obtido é directamente convertido em mL de CH<sub>4</sub> produzidos em cada ponto de registo de pressão, pela expressão seguinte:

$$\text{Volume de CH}_4 (\text{mL}) = \frac{P_{(n-1)} - P_{(n)}}{mV / \text{mL} \times 4}$$

onde P<sub>(n-1)</sub> e P<sub>(n)</sub> correspondem, respectivamente, aos mV lidos nos tempos n-1 e n. A produção total de gás corresponde ao somatório do volume de CH<sub>4</sub> produzido em cada ponto.

A taxa inicial de produção de CH<sub>4</sub> (mL/h) obtém-se por determinação do declive inicial da representação gráfica do volume de CH<sub>4</sub> produzido ao longo do tempo. A actividade metanogénica hidrogenofílica específica determina-se pela seguinte equação:

$$\text{Actividade metanogénica específica} = \frac{\text{mLCH}_4 / \text{h} \times 24 \times \text{FC}}{\text{SV}} \quad [\text{mLCH}_4 @ \text{PTN/g SV.dia}]$$

Os valores finais são obtidos após subtracção dos valores de actividade calculados do mesmo modo para os ensaios em branco.

### 2.5.3 Testes de actividade acidogénica

Nos testes de actividade acidogénica determinou-se a velocidade de consumo de lactose, utilizando um volume de trabalho de 50 mL em frascos de 120 mL de volume total. A

cada frasco, previamente “lavado” com N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (80/20) adicionaram-se, em condições anaeróbias, determinados volumes de biomassa e tampão anaeróbio (descrito no Sub-Capítulo 2.5.2), de modo a que no volume de trabalho a concentração de sólidos voláteis (SV) estivesse compreendida entre 2 e 5 g/L, e preferencialmente próxima de 3 g/L. Após aclimatização da biomassa durante uma noite a 37 °C e em agitação a 150 rpm, adicionou-se 0.5 mL de uma solução “stock” de lactose 1M, equivalendo a uma concentração inicial de lactose de 10 mM. Retirou-se imediatamente a primeira amostra, correspondendo ao tempo inicial. As amostras retiradas ao longo do tempo eram imediatamente colocadas em gelo, centrifugadas a 15 000 rpm durante 10 minutos e congeladas. A lactose foi analisada utilizando um teste enzimático específico para lactose/glucose (*Boehringer-Mannheim/986119*). No final do ensaio, determinaram-se os sólidos voláteis em cada frasco.

Em todas as amostras analisadas verificou-se a existência de uma fase de latência a preceder o início do consumo de lactose, tendo-se determinado graficamente a duração desse período. O cálculo da actividade acidogénica (mmol lactose/gSV.dia) foi efectuado para o período de tempo subsequente à fase de latência, por determinação do declive na zona linear do gráfico concentração de lactose versus tempo e divisão pelo valor obtido para os SV.

#### **2.5.4 Testes de toxicidade metanogénica**

Nestes testes estudou-se o efeito do oleato de sódio na actividade das bactérias metanogénicas acetoclásticas, através do acompanhamento da produção do biogás em frascos selados com um transdutor de pressão (descrito no Sub-Capítulo 2.5.2). Nestes frascos, para além do substrato específico do grupo trófico em estudo (acetato), adicionou-se o inibidor a testar (oleato de sódio), tendo-se utilizado o procedimento descrito por COLLERAN E PISTILLI (1994).

#### **Substrato**

A solução “stock” de acetato foi preparada numa concentração 3M, 100 vezes superior à concentração de trabalho. Esta solução foi neutralizada a pH 7 com NaOH e armazenada a 4 °C.

### **Inibidor**

Prepararam-se cinco soluções “*stock*” de oleato de sódio em condições anaeróbias estritas, 10 vezes concentradas relativamente às concentrações de trabalho (1000, 3000, 5000, 7000 e 9000 mg oleato/L). Estas soluções foram a agitar durante uma noite a 150 rpm, para facilitar a dissolução do oleato de sódio.

### **Procedimento experimental**

O procedimento experimental e o cálculo da actividade foram idênticos aos referidos para os testes de actividade metanogénica específica, bem como a preparação do meio basal (Sub-Capítulo 2.5.2). Os ensaios foram realizados em triplicado, envolvendo um total de 21 frascos, tendo-se adicionado acetato e diferentes concentrações de oleato de sódio a 5 dos 7 grupos de três frascos. Os brancos (sem substrato e sem inibidor) e os controlos (com substrato mas sem inibidor) foram constituídos pelos outros dois trios de frascos. Após aclimatização a 37 °C durante a noite, o substrato foi adicionado na quantidade de 125 µL, num volume de trabalho de 12.5 mL. Adicionou-se 1.25 mL de cada uma das soluções “*stock*” de oleato, correspondendo a concentrações finais de 100, 300, 500, 700 e 900 mg oleato/L.

Em alguns casos verificou-se a existência de uma fase de latência a preceder o início da produção de metano, tendo-se determinado a duração desse período graficamente. Nesses casos, a produção inicial de metano era nula ou da mesma ordem de grandeza da observada nos ensaios em branco, resultando numa actividade metanogénica nula ou muito baixa.

### **Cálculo do índice de toxicidade**

A toxicidade do oleato de sódio foi expressa em termos do índice de toxicidade (IC<sub>50</sub>) que representa a concentração de oleato para a qual a actividade é reduzida a 50% da actividade máxima (obtida para concentração nula de oleato). Este cálculo foi feito graficamente.

---

## 3. Resultados e Discussão

### 3.1 Operação e desempenho do digestor

Os dados experimentais obtidos neste trabalho encontram-se compilados no **Apêndice B**. A evolução dos parâmetros operacionais ao longo de todo o período de funcionamento do digestor, bem como a variação dos teores em AGV e SV presentes na corrente de saída, encontram-se representadas na Figura 3.1 e compiladas na Tabela 3.3. Na Tabela 3.4 apresentam-se os valores dos parâmetros representativos do desempenho do digestor durante as situações de instabilidade (Etapa II e III), podendo observar-se na Figura 3.2 a evolução dos teores em AGV à saída durante os mesmos períodos.

O arranque do digestor foi efectuado através de aumentos graduais da carga orgânica aplicada, até um valor de 6 Kg CQO/m<sup>3</sup>.dia. Entre os dias 140 a 144 e 230 a 234 aumentou-se cinco vezes a carga orgânica aplicada, através do aumento da concentração alimentada (choque orgânico) e da diminuição do TRH (choque hidráulico), respectivamente (Figura 3.1(a) e (b)). Desta forma, em ambos os choques aumentou-se a carga aplicada em oleato. A eficiência de remoção de CQO solúvel encontra-se representada na Figura 3.1(b), verificando-se que se manteve em valores superiores aos 90 %, excepto nas situações de choque. A introdução de perturbações provocou uma diminuição acentuada deste parâmetro (de um valor médio de 94.3 % para 30.2 % no choque orgânico, e para 73.2 % no choque hidráulico), sendo esta menos dramática no caso do choque hidráulico.

A diminuição da eficiência tem sido relatada por diversos autores como uma consequência de situações de instabilidade e da presença de oleato, o qual é tóxico para as bactérias anaeróbias (RINZEMA *et al.*, 1989, DELORME E KAPUSCINSKI, 1990, SMITH E MCCARTY, 1990, ANGELIDAKI E AHRING, 1992, SOTO *et al.*, 1992, CHUA *et al.*, 1997).

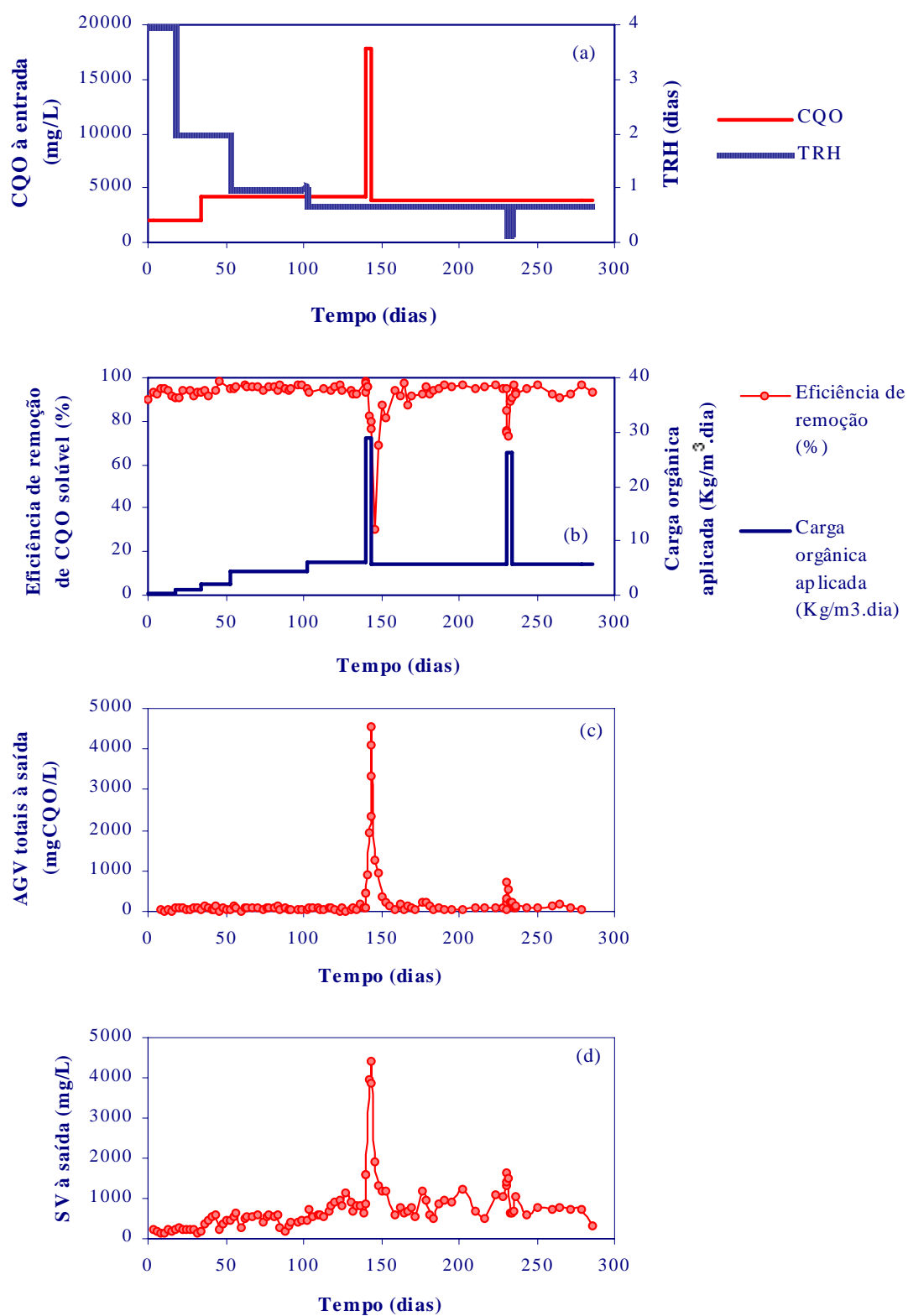


Figura 3.1 Evolução das condições operacionais e desempenho do digester ao longo do tempo de operação. CQO total alimentada e TRH (a), eficiência de remoção e carga orgânica aplicada (b), AGV totais presentes na corrente de saída (c) e SV à saída do digester (d).



Tabela 3.3 Valores médios dos parâmetros operatórios relativos a cada uma das etapas de funcionamento.

	Tempo (dias)	TRH (dias)	CQO à entrada (mg/L)	Carga org. aplicada (KgCQO/m <sup>3</sup> .d)	CQOsol à saída (mg/L)	Eficiência de remoção (%)	SV à saída (mg/L)	AGV totais à saída (mgCQO/L)
	[0-16]	3.97 (±0.29)	1985 (±171)	0.5 (±0.1)	132 (±15)	93.0 (±0.01)	189 (±29)	24.0 (±6.4)
	[16-34]	2.00 (±0.03)	1985 (±171)	1.0 (±0.1)	149 (±21)	92.6 (±0.01)	219 (±24)	71.2 (±11.6)
	[34-54]	2.00 (±0.03)	4130 (±117)	2.1 (±0.1)	223 (±78)	94.6 (±0.02)	434 (±78)	77.9 (±31.8)
<b>I</b>	[54-83]	0.99 (±0.02)	4130 (±117)	4.3 (±0.1)	200 (±21)	95.4 (±0.00)	531 (±51)	90.3 (±17.8)
	[83-102]	0.99 (±0.02)	4130 (±117)	4.3 (±0.1)	162 (±37)	95.9 (±0.01)	439 (±24)	38.2 (±7.9)
(a)	[102-140]	0.66 (±0.00)	4130 (±117)	6.0 (±0.3)	231 (±34)	94.3 (±0.01)	761 (±80)	72.6 (±18.4)
<b>II</b>	[140-144]	0.66 (±0.00)	17739 (±3663)	29.0 (±2.6)	(b)	(b)	(b)	(b)
(a)	[144-230]	0.66 (±0.00)	3791 (±232)	5.9 (±0.6)	(c) 205 (±29)	(c) 94.3 (±0.01)	(c) 805 (±105)	(c) 98.7 (±28.5)
<b>III</b>	[230-234]	0.15 (±0.00)	3791 (±232)	26.4 (±1.8)	(b)	(b)	(b)	(b)
(a)	[234-286]	0.68 (±0.03)	3791 (±232)	5.7 (±0.3)	231 (±49)	94.0 (±0.01)	714 (±117)	91.0 (±32.0)

(a) condições pré-choque; (b) variável; (c) variável durante cerca de 10 dias.

A adsorção de oleato na biomassa exerce um efeito inibitório, possivelmente devido à perturbação das funções de transporte e de protecção das células (GALBRAITH *et al.*, 1973, KOSTER E CRAMER, 1987, RINZEMA, 1988), afectando principalmente as bactérias sintróficas e metanogénicas (HANAKI *et al.*, 1981); por outro lado, torna a biomassa flutuante e sujeita a eliminação por lavagem (RINZEMA *et al.*, 1989). O “washout” das células bacterianas pode também resultar de uma maior produção de biogás, em consequência das elevadas cargas orgânicas aplicadas em situações de choque orgânico, ou dos elevados caudais alimentados ao sistema, nos casos de sobrecarga hidráulica. A capacidade de retenção da biomassa no interior do digestor foi menor no caso do choque orgânico (Figura 3.1(d)), provocando uma diminuição da quantidade de biomassa realmente disponível, o que pode justificar em parte a maior queda observada no valores de eficiência de remoção de CQO solúvel. Esta diferença entre as duas situações de

instabilidade pode resultar de uma eventual adaptação da biomassa à toxicidade do oleato, aumentando a sua resistência a perturbações, e/ou ao facto do biofilme ser mais resistente às condições impostas no caso do choque hidráulico. Com efeito, a caracterização da biomassa desenvolvida no reactor durante as duas situações de choque permitiu confirmar que realmente assim aconteceu (Sub-Capítulo 3.2.1 e 3.2.4).

A diminuição da eficiência e o aumento dos SV à saída, observados em consequência das perturbações introduzidas, foram acompanhados por um aumento dos AGV presentes na corrente de saída do reactor (Figura 3.1(c)), possivelmente devido à inibição das bactérias metanogénicas e acetogénicas. Este aumento foi novamente mais acentuado no caso do choque orgânico. Em ambos os casos verificou-se uma maior acumulação de ácido acético, propiónico e n-butírico, observando-se o aparecimento de ácido láctico, fórmico e iso-butírico em pequenas quantidades, assinalando a existência de perturbação do funcionamento do reactor (Figura 3.2(a) e (b)). Detectou-se também o aparecimento de ácido valérico nas duas situações de choque (valores não apresentados), o qual é indicador da ocorrência de lise celular (GROBICKI E STUCKEY, 1991). Na situação de choque orgânico os valores máximos de AGV à saída foram registados cerca de 95 horas após o início do choque, indiciando que poderiam continuar a aumentar se não se tivesse voltado às condições pré-choque, enquanto que no caso do choque hidráulico ocorreram cerca de 24 horas após a aplicação da perturbação. Desta forma, a razão entre os ácidos propiónico/acético, sugerida por MARCHAIM E KRAUSE (1993) como um bom indicador da existência de situações de “*stress*”/falha dos digestores, apenas assinalou eficazmente a instabilidade do reactor no caso do choque hidráulico, atingindo o valor máximo de 1.2 cerca de 24 horas após o início do choque (Tabela 3.4).

Na Figura 3.3 encontra-se representada a variação com o tempo dos teores em substrato não acidificado à saída do digestor, verificando-se que as situações de choque provocaram um aumento desta concentração. Este facto parece resultar da acumulação de AGV anteriormente referida, a qual impede termodinamicamente a continuidade da  $\beta$ -oxidação. Sugere também a existência de inibição da população acidogénica (o que foi experimentalmente confirmado – Sub-Capítulo 3.2.3) e poderá resultar, ainda, de uma inibição das bactérias acetogénicas envolvidas na  $\beta$ -oxidação por parte da matéria lipídica. Por outro lado, a aplicação de caudais elevados também pode ter contribuído

para esse aumento, em consequência do reduzido TRH. No entanto, mais uma vez, o choque orgânico provocou efeitos mais acentuados.

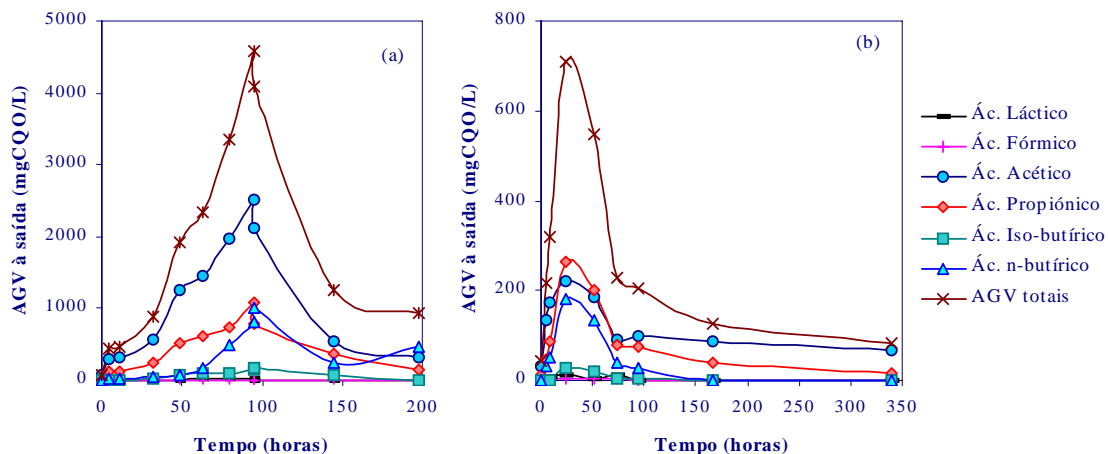


Figura 3.2 Evolução dos teores em AGV presentes à saída do digestor durante a Etapa II (a) e III (b) de funcionamento e nas cerca de 100 horas imediatamente subsequentes.

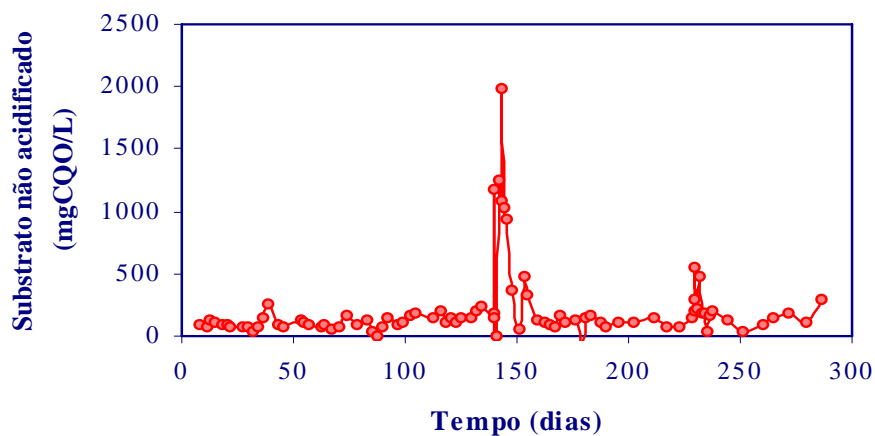


Figura 3.3 Variação da concentração de substrato não acidificado à saída do digestor ao longo do tempo de operação.

Tabela 3.4 Evolução dos parâmetros representativos do desempenho do reactor durante a Etapa II e III de funcionamento e nas cerca de 100 horas imediatamente subsequentes.

Tempo (horas)	CQOsol à saída (mg/L)	E. de remoção (%)	SV à saída (mg/L)	AGV (mg CQO/L)							Razão Prop./Acet.
				Lact.	Form.	Acet.	Prop.	Iso-but.	n-but.	Totais	
0	272	98.4	867	0.0	0.0	67.1	18.1	0.0	0.0	85.2	0.27
4	1605	93.2	1610	0.0	0.0	285.7	112.1	4.0	29.2	431.0	0.39
11	608	97.2	1587	0.0	0.0	311.3	121.6	6.9	22.2	461.9	0.39
25	661	96.2	(*)	(*)	(*)	(*)	(*)	(*)	(*)	(*)	(*)
<b>II</b> 32.5	828	95.5	(*)	0.0	0.0	569.8	245.0	31.6	46.6	893.0	0.43
49	3170	82.6	3973	0.0	0.0	1248.2	518.6	70.3	82.3	1919.5	0.42
62.5	3429	79.9	3843	15.0	0.0	1447.6	609.7	92.2	171.1	2335.6	0.42
80	5333	76.5	4410	32.8	3.5	1968.9	747.4	107.3	488.1	3347.9	0.38
95	5598	(*)	(*)	20.9	0.0	2523.2	1073.3	142.7	810.6	4570.8	0.43
145	2182	30.2	1900	0.0	0.0	553.3	372.1	68.5	257.1	1251.1	0.67
198	1305	69.2	1297	0.0	0.0	332.4	146.2	4.0	457.4	940.1	0.44
0	239	94.7	1340	0.0	0.0	30.0	11.5	0.0	0.0	41.6	0.38
4.5	514	85.2	1630	6.9	0.0	132.6	48.8	0.0	29.8	218.0	0.37
9	877	75.8	1390	7.3	0.0	173.3	86.5	0.0	51.3	318.4	0.50
<b>III</b> 24	932	75.2	1500	10.2	3.8	219.5	265.8	28.3	182.1	709.8	1.21
51	1032	73.2	620	5.2	3.3	186.6	199.6	20.4	132.6	547.7	1.07
73.5	413	89.4	640	13.5	2.5	90.0	76.9	3.5	41.2	227.5	0.85
95	396	90.9	(*)	0.0	0.0	97.7	74.0	2.8	28.5	203.1	0.76
167	114	97.0	660	0.0	0.0	48.6	21.9	0.0	0.0	70.5	0.45

(\*) Não determinado. ----- Fim do choque.

De forma geral, a recuperação do digester processou-se muito mais rapidamente após o choque hidráulico do que no seguimento da sobrecarga orgânica, ocorrendo antes da reposição das condições normais de funcionamento no primeiro caso apontado (Etapa III) e necessitando de cerca de 10 dias após o final do choque na Etapa II. Como foi anteriormente referido, este facto parece resultar de uma eventual adaptação da biomassa, ao longo do tempo, à toxicidade do oleato e ao facto do biofilme ser mais resistente à perturbação aplicada.

Os resultados obtidos na operação do digestor devem ser discutidos considerando os teores em cálcio presentes na alimentação, uma vez que a presença de íões cálcio reduz o efeito inibitório dos AGCL, diminuindo a sua concentração na forma solúvel através da formação de precipitados de sais de cálcio e AGCL. Admitindo que o íão magnésio pode exibir um efeito semelhante ao íão cálcio, e sabendo que cada íão divalente fixa teoricamente duas moléculas de oleato, para razões molares oleato/(Ca<sup>2+</sup>+Mg<sup>2+</sup>) inferiores a 2 a precipitação de todo o oleato alimentado tornar-se-ia possível. Os valores desta razão molar foram calculados considerando as contribuições do cálcio presente na água da torneira (valor por excesso - 30 mg/L) e no leite magro, e do magnésio fornecido nos macronutrientes. Ao longo da operação do digestor o oleato foi adicionado apenas em concentrações de 2 g CQO/L, equivalente a 0.002M (situações pré-choque e durante o choque hidráulico), e 10 g CQO/L, equivalente a 0.012M, (choque orgânico). Verificou-se que apenas neste último caso a razão molar 2 foi excedida, pelo que nas outras situações a concentração de oleato alimentada pode teoricamente ter sido precipitada com os íões divalentes presentes. Admitindo que todo o cálcio e magnésio adicionados precipitaram quantidades estequiométricas de oleato, poderá ter permanecido “livre” no seio do líquido, durante a Etapa II, uma concentração de oleato de 0.5 g/L. Este facto poderá justificar a alteração mais drástica observada nos parâmetros de desempenho do digestor durante o choque orgânico, relativamente ao choque hidráulico, bem como a sua recuperação mais lenta.

Durante a Etapa II, o oleato que não foi precipitado pelos íões divalentes pode ter sido removido do meio líquido por adsorção na biomassa e biodegradação. Há evidências na literatura de que o oleato pode ser adsorvido na biomassa e que a sua biodegradação não é fácil. Por exemplo, SAYED *et al.* (1987), ao estudarem o tratamento anaeróbio de um efluente contendo lípidos, concluíram que o rendimento em metano era baixo, havendo uma discrepância entre a remoção de CQO solúvel e a produção de metano. HWU (1997) efectuou estudos de adsorção do ácido oleico na biomassa granular, concluindo que após a adsorção existia uma dessorção induzida pela produção e libertação do biogás. Recentemente, ALVES *et al.* (1999b) observaram que a biomassa alimentada com oleato como única fonte de carbono apresentava uma elevada taxa de produção de metano devido a substrato residual, quando incubada em reactor fechado a 37 °C. PEREIRA (1998) verificou que para uma carga orgânica de 12.5 Kg CQO/m<sup>3</sup>.dia, aplicada a um digestor alimentado com oleato como única fonte de carbono, os teores desta substância

à saída do digestor evidenciavam a sua eficiente remoção do meio líquido. A análise cromatográfica permitiu verificar também a existência de compostos intermediários da sua degradação, sendo a quantificação destes ácidos extremamente interessante do ponto de vista da avaliação da extensão da degradação do oleato. Esta autora constatou também o encapsulamento da biomassa por observação em microscópio óptico de fluorescência: os agregados de biomassa que haviam sido alimentados com oleato encontravam-se envolvidos por zonas esbranquiçadas, as quais diminuía a intensidade da autofluorescência exibida pelas populações metanogénicas.

No entanto, não há evidência de que o oleato alimentado durante a Etapa II de funcionamento do digestor tenha sido efectivamente biodegradado e só a análise do metano produzido teria sido elucidativa. Dadas as características da configuração do digestor, não foi possível a recolha e análise do biogás, pois este escapava-se pelo rolamento que sustentava o veio do agitador (Figura 2.1).

### **3.2 Caracterização da biomassa**

A biomassa desenvolvida no reactor foi caracterizada ao longo do tempo durante os períodos de choque (Etapas II e III), em termos de:

- distribuição entre as fracções aderida e oclusa na matriz de suporte,
- actividade metanogénica acetoclástica, hidrogenofílica, em propionato, butirato e etanol,
- actividade acidogénica em lactose,
- toxicidade do oleato de sódio sobre as bactérias metanogénicas acetoclásticas.

Os testes de toxicidade foram realizados no início e algum tempo após cada choque, procurando determinar a existência ou não de adaptação por parte da biomassa ao tóxico.

A biomassa considerada nestes estudos refere-se apenas à fracção retida no suporte, não sendo considerada a biomassa acumulada na parte inferior do digestor (Zona I do digestor, Figura 2.1). Embora essa biomassa seja importante para a eficiência do sistema, o objectivo do presente estudo foi avaliar os efeitos de sobrecargas de ácido oleico (orgânicas e hidráulicas) na colonização do suporte.

### 3.2.1 Distribuição e crescimento da biomassa no suporte

Os valores da biomassa aderida, oclusa e total, bem como a percentagem de biomassa aderida relativamente à biomassa total retida, determinados durante as Etapas II e III de operação do reactor, encontram-se registados na Tabela 3.5 e Tabela 3.6, respectivamente. De forma geral, os valores obtidos são extremamente oscilantes, o que dificulta a definição de qualquer tendência. Este comportamento poderá resultar do efeito de mistura entre a biomassa presente nas diferentes zonas do digester e eventualmente da existência de caminhos preferenciais e limitações difusionais. De forma geral, as perturbações são nitidamente mais acentuadas no caso do choque orgânico.

Tabela 3.5 Biomassa aderida, oclusa e total e fracção de biomassa aderida relativamente à biomassa total retida (%) durante e após o choque orgânico.

Tempo (horas)	Biomassa aderida (gSV/m <sup>2</sup> )	Biomassa oclusa (gSV/L vazio da matriz)	Biomassa total (gSV/L reactor)	Biomassa aderida/ Biomassa total retida (%)
0	2.2 (±0.1)	1.7 (±0.1)	2.1 (±0.1)	24.7 (±1.3)
4	5.0 (±0.2)	6.0 (±0.1)	6.7 (±0.1)	17.4 (±0.8)
11	2.9 (±0.1)	3.1 (±0.2)	3.6 (±0.2)	19.3 (±1.1)
14	4.4 (±0.2)	2.7 (±0.2)	3.5 (±0.2)	28.8 (±2.1)
25	4.3 (±0.3)	1.7 (±0.1)	2.6 (±0.1)	39.2 (±3.6)
32.5	2.3 (±0.0)	1.6 (±0.0)	2.0 (±0.0)	27.2 (±0.7)
49	1.8 (±0.1)	2.9 (±0.2)	3.1 (±0.2)	13.5 (±1.2)
62.5	4.3 (±0.4)	3.4 (±0.2)	4.1 (±0.2)	24.1 (±2.3)
80	5.4 (±0.4)	2.4 (±0.2)	3.5 (±0.2)	36.2 (±3.3)
95	2.9 (±0.3)	(*)	-	-
145	10.1 (±1.0)	(*)	-	-
198	1.3 (±0.2)	0.6 (±0.0)	0.8 (±0.1)	37.4 (±5.3)
840	8.8 (±0.9)	1.5 (±0.0)	3.4 (±0.2)	59.8 (±7.1)

(\*) Não determinado. ----- Fim do choque.

Em ambas os casos a quantidade de biomassa aderida aumentou após o choque, podendo-se interpretar este aumento da adesão como uma resposta da biomassa no

sentido de tentar contrariar os efeitos do “washout”. Relativamente à biomassa oclusa, ALVES (1998) concluiu que valores elevados de velocidade intersticial provocam um aumento da concentração deste tipo de biomassa, tendo-se verificado este efeito no caso do choque hidráulico. Por outro lado, os elevados caudais aplicados neste último caso podem ter provocado um maior fluxo da biomassa depositada na secção inferior para a secção da matriz de suporte, e o oleato adicionado pode ter diminuído a densidade e velocidade de sedimentação desta biomassa, contribuindo para o aumento observado da biomassa oclusa.

Tabela 3.6 Biomassa aderida, oclusa e total e fracção de biomassa aderida relativamente à biomassa total retida (%) durante e após o choque hidráulico.

Tempo (horas)	Biomassa aderida (gSV/m <sup>2</sup> )	Biomassa oclusa (gSV/L vazio da matriz)	Biomassa total (gSV/L reactor)	Biomassa aderida/ Biomassa total retida (%)
0	2.6 (±0.3)	1.6 (±0.0)	2.1 (±0.1)	28.5 (±3.0)
4.5	2.3 (±0.1)	1.6 (±0.2)	2.0 (±0.2)	27.0 (±2.5)
9	4.5 (±0.2)	2.5 (±0.2)	3.4 (±0.2)	31.0 (±2.3)
24	2.8 (±0.2)	3.4 (±0.2)	3.8 (±0.2)	17.3 (±1.5)
51	3.7 (±0.7)	2.4 (±0.2)	3.1 (±0.3)	28.1 (±5.7)
73.5	2.9 (±0.1)	2.6 (±0.3)	3.1 (±0.3)	22.1 (±2.2)
95	1.7 (±0.1)	1.6 (±0.1)	1.9 (±0.1)	21.1 (±1.7)
167	(*)	4.9 (±1.1)	-	-
340.5	3.4 (±0.1)	1.6 (±0.1)	2.2 (±0.1)	35.1 (±2.1)
892.5	4.1 (±0.2)	2.2 (±0.1)	3.0 (±0.1)	32.2 (±2.1)

(\*) Não determinado. ----- Fim do choque.

De forma geral, os valores obtidos nas duas situações de instabilidade resultam de um eventual equilíbrio entre a capacidade de adesão da biomassa e a tensão de corte. Os valores dos sólidos voláteis devem ser, no entanto, analisados com certas reservas, dado que representam toda a matéria orgânica, incluindo as possíveis quantidades de oleato adsorvido na biomassa.

Os valores obtidos para a biomassa aderida, oclusa e total 4 horas após o início do choque orgânico sugerem que a biomassa praticamente triplicou durante este pequeno período de tempo, o que é aparentemente estranho. Estes valores podem ter resultado da precipitação, pelos iões divalentes, das elevadas quantidades de oleato adicionadas (sendo um processo fisico-químico, a precipitação processa-se rapidamente).



ALVES *et al.* (1999a) concluíram que a presença de lípidos diminui a concentração de biomassa aderida. Estes autores obtiveram um máximo de  $1.4 \pm 0.1$  gSV/m<sup>2</sup> e  $5.3 \pm 0.1$  gSV/m<sup>2</sup> num reactor alimentado com lípidos e com oleato como única fonte de carbono, respectivamente.

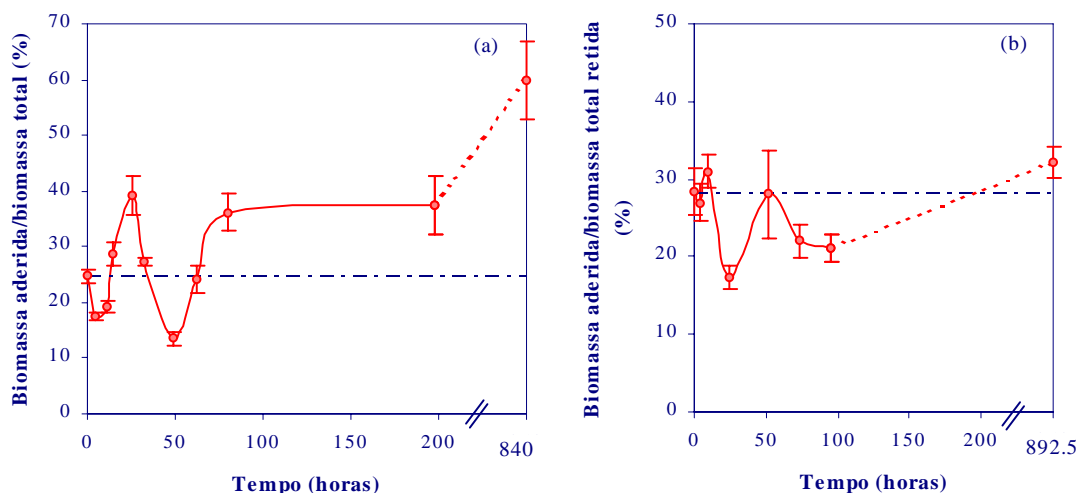


Figura 3.4 Evolução ao longo do tempo da fracção de biomassa aderida relativamente à biomassa total retida, durante o choque orgânico (a) e choque hidráulico (b) e durante as cerca de 100 horas subsequentes. (A linha tracejada representa o valor inicial estacionário).

Na Figura 3.4 encontra-se representada a fracção de biomassa aderida, em termos percentuais, relativamente à biomassa total retida, evidenciando a distribuição da biomassa na matriz de suporte em ambas as situações de choque. O comportamento observado é semelhante nos dois casos, embora seja mais acentuado no choque orgânico. Após o retorno às condições pré-choque e recuperação, a fracção de biomassa aderida aumentou, sendo este aumento muito maior no caso do choque orgânico, onde se atingiram valores bastante superiores aos iniciais. Este facto é representativo do desenvolvimento de um biofilme mais espesso, contrariamente ao observado no caso do choque hidráulico (cerca de 35 dias após o final do choque obtiveram-se valores de  $59.8 \pm 7.1$  e  $32.2 \pm 2.1$  % para a sobrecarga orgânica e hidráulica, respectivamente). A menor intensidade e gama de flutuações observadas no caso do choque hidráulico aponta para o facto do biofilme ser mais resistente às condições aplicadas nesta

situação. Este facto pode resultar das características inerentes ao tipo de choque aplicado, ou da própria história do reator, que naturalmente evolui ao longo do tempo.

### **3.2.2 Actividade metanogénica específica dos diferentes grupos tróficos**

A biomassa oclusa desenvolvida no digestor nas situações de choque foi caracterizada em termos da sua actividade metanogénica específica relativamente a substratos directos da metanogénese (acetato e  $H_2/CO_2$ ) e indirectos (propionato, butirato e etanol). Estes dados encontram-se representados na Figura 3.5., estando compilados na Tabela 3.7 alguns dos valores considerados mais significativos. A determinação das actividades metanogénicas específicas em substratos indirectos para a metanogénese teve como objectivo avaliar a evolução do grupo de bactérias sintróficas que degradam estes substratos a hidrogénio e acetato. A medição destas actividades em termos de metano só representa a actividade das bactérias que consomem cada um desses substratos no caso das actividades a jusante do processo (acetoclástica e hidrogenofílica) não serem limitantes (DOLFING E BLOEMEN, 1985). No presente estudo esta condição verificou-se para todas as amostras de biomassa.

De forma geral, com pequenas variações, a evolução das diferentes actividades no tempo foi semelhante em ambas as situações de choque, notando-se uma tendência decrescente até à finalização das perturbações aplicadas (cerca de 95 horas após o início do choque, correspondentes a 6 e 30 vezes o TRH, no caso do choque orgânico e hidráulico, respectivamente) e posterior recuperação. Note-se, no entanto, que as perturbações verificadas são de maior amplitude no caso do choque hidráulico, à semelhança do que foi observado anteriormente.

A diminuição da actividade metanogénica específica após contacto com oleato já tinha sido verificada por ALVES (1998) e PEREIRA (1998), resultando da combinação de dois fenómenos independentes: por um lado o efeito inibitório, que afecta o metabolismo celular, e por outro a adsorção do oleato na parede celular, a qual dificulta o transporte de substratos e produtos e aumenta os valores de sólidos voláteis.

A comparação das actividades metanogénicas específicas determinadas no início e após cada uma das situações de choque (Figura 3.5 e Tabela 3.7) permite verificar que, para

todos os grupos tróficos com exceção das bactérias metanogênicas acetoclásticas, a recuperação das actividades conduziu a valores inferiores aos iniciais no caso do choque orgânico, e superiores aos iniciais no caso do choque hidráulico.

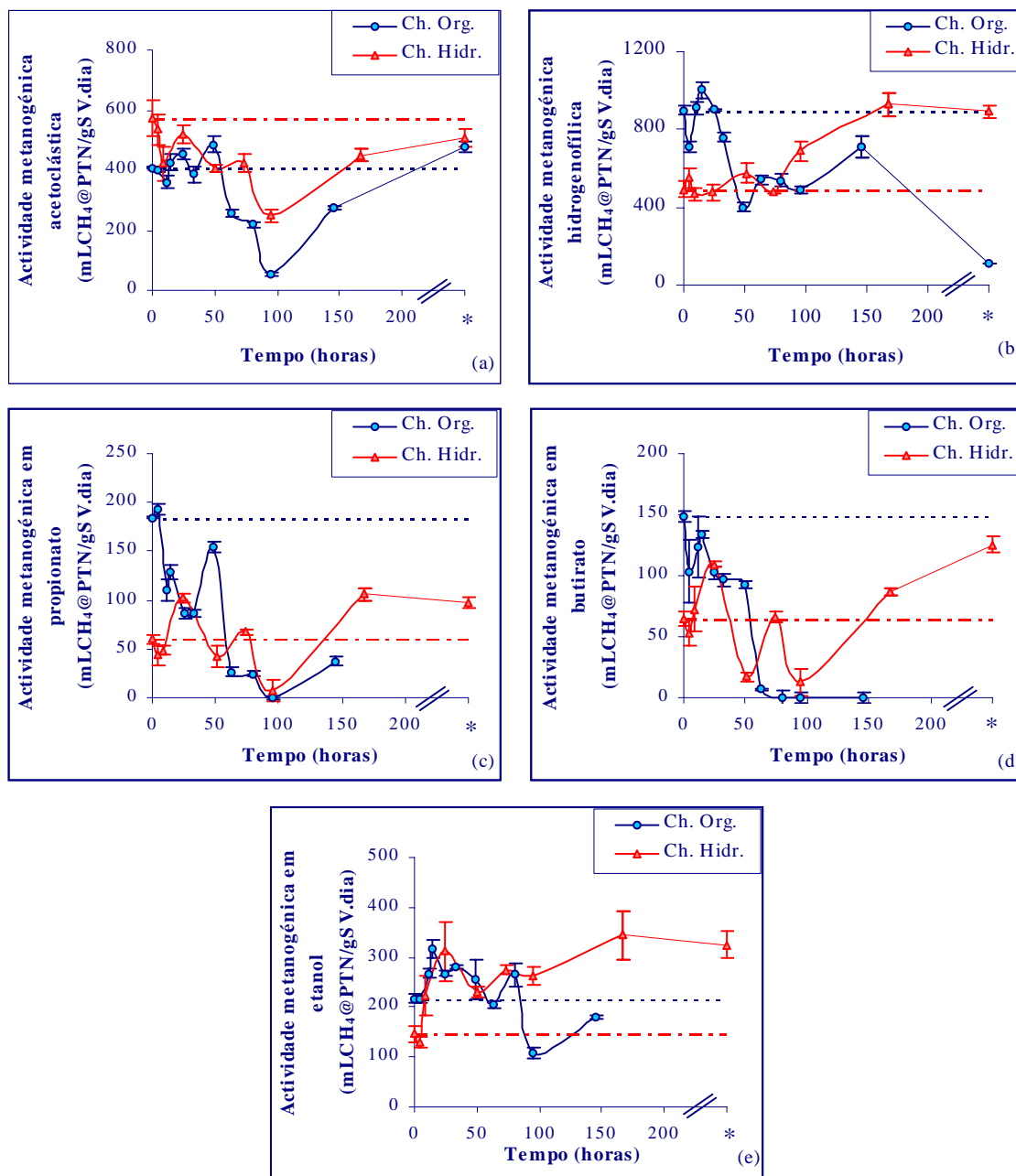


Figura 3.5 Evolução da actividade metanogénica específica em acetato (a), H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (b), propionato (c), butirato (d) e etanol (e), ao longo das Etapas II e III de operação do digestor e durante as cerca de 100 horas subsequentes. (As linhas rectas tracejadas representam os respectivos valores iniciais estacionários). (\* t=840 horas no choque orgânico e t=892.5 horas no choque hidráulico).

Tal facto aponta para uma inibição da população metanogénica no choque orgânico, possivelmente devido ao contacto com o oleato, e sugere uma adaptação aos lípidos no caso do choque hidráulico, resultante do desenvolvimento de uma população acetogénica capaz de degradar mais rapidamente os AGCL, evitando a sua acumulação até concentrações inibitórias.

A diminuição da actividade metanogénica acetoclástica, observada durante as duas situações de choque, era previsível, uma vez que este grupo bacteriano é extremamente sensível a condições operacionais adversas e à presença de substâncias tóxicas. No entanto, na situação de sobrecarga orgânica, após uma diminuição acentuada da actividade observou-se uma recuperação que conduziu a valores muito superiores aos iniciais ( $573.4 \pm 58.9$  mLCH<sub>4</sub>@PTN/gSV.dia no dia 230 de operação), o que sugere que este grupo foi, aparentemente, o que melhor recuperou após as condições aplicadas durante o choque orgânico.

Tabela 3.7 Compilação dos valores de actividade metanogénica específica (mLCH<sub>4</sub>@PTN/gSV.dia) determinados no início (t=0) e final (t=95h) do choque e cerca de 35 dias após o retorno às condições pré-choque, bem como do valor mínimo observado e respectivo tempo de ocorrência (horas).

	Etapa II			Mínimo	Etapa III			Mínimo
	140	144	175		230	234	267	
<b>Tempo de operação (dias)</b>	140	144	175		230	234	267	
<b>Tempo após o choque (horas)</b>	0	95	840 <sup>(*)</sup>		0	95	892.5 <sup>(*)</sup>	
<b>Substrato</b>								
Acetato	408.8 (±0.6)	52.4 (±6.5)	475.7 (±18.1)	52.4 (t=95h)	573.4 (±58.9)	247.8 (±22.1)	508.1 (±30.7)	247.8 (t=95h)
H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	898.7 (±25.6)	488.1 (±16.9)	109.5 (±0.3)	109.5 (t=840h)	493.2 (±44.8)	689.6 (±48.5)	891.7 (±30.2)	466.2 (±27.9) (t=9h)
Propionato	184.3 (±1.2)	0.0 (±2.2)	(**)	0.0 (t=95h)	59.8 (±5.20)	7.1 (±10.6)	98.2 (±5.5)	7.1 (t=95h)
Butirato	148.4 (±4.5)	0.0 (±4.3)	(**)	0.0 (t=95h)	64.6 (±5.76)	12.7 (±11.0)	125.5 (±6.7)	12.7 (t=95h)
Etanol	217.4 (±8.6)	108.2 (±10.3)	(**)	108.2 (t=95h)	146.4 (±16.9)	264.0 (±16.9)	325.2 (t=95h)	129.9 (±53.0) (t=4.5h)

(\*) Valor considerado como representativo da biomassa já em estado (pseudo)estacionário após o choque; (\*\*) não determinado.

Os AGCL afectam as bactérias acetogénicas envolvidas na  $\beta$ -oxidação e as metanogénicas, que convertem os produtos da  $\beta$ -oxidação em metano (HANAKI *et al.*, 1981). No entanto, as bactérias metanogénicas hidrogenofílicas são menos afectadas por estes compostos, exibindo uma maior resistência à toxicidade. Este grupo trófico é extremamente importante, uma vez que mantém em níveis baixos o hidrogénio presente nos digestores, possibilitando a actuação das bactérias acetogénicas produtoras obrigatórias de hidrogénio. Durante a Etapa III de operação, a actividade em  $H_2/CO_2$  não exibiu alterações significativas, mantendo-se aproximadamente constante. No entanto, após o retorno às condições pré-choque estes valores aumentaram de forma acentuada aproximadamente para o dobro. No caso do choque orgânico, a actividade metanogénica hidrogenofílica era inicialmente muito elevada ( $898.7 \pm 25.6$  mL $CH_4$ @PTN/gSV.dia), diminuindo acentuadamente ao longo desta etapa, contrariando a tendência esperada.

As actividades em propionato e butirato sofreram uma diminuição acentuada durante as Etapas II e III de operação, atingindo-se mesmo o valor zero 95 horas após a aplicação do choque orgânico. A actividade em etanol também diminuiu durante o choque orgânico, embora tenha aumentado acentuadamente durante a situação de sobrecarga hidráulica, o que parece ser um indício de que certas bactérias acetogénicas podem ser profundamente inibidas, enquanto outras podem ser estimuladas nestas condições.

Segundo ANGELIDAKI E AHRING (1992), a resposta de um consórcio microbiano anaeróbio à adição de lípidos pode depender do grau de adaptação aos lípidos, embora a adição directa de AGCL resulte em inibição do processo. A adaptação aos lípidos é consequência do desenvolvimento de uma população acetogénica capaz de degradar os AGCL à medida que estes vão sendo formados, evitando a sua acumulação até concentrações inibitórias. Este facto pode ser responsável pela diminuição mais acentuada das actividades metanogénicas específicas, observada no caso da aplicação do choque orgânico, relativamente ao choque hidráulico. Nesta última situação a possível precipitação do oleato pelos iões divalentes presentes na alimentação pode ter contribuído para este comportamento.

### 3.2.3 Actividade acidogénica em lactose

Estudou-se o comportamento da biomassa oclusa desenvolvida no digestor durante as duas situações de choque relativamente à sua actividade acidogénica em lactose, procurando averiguar o efeito das sobrecargas de ácido oleico no grupo trófico das bactérias acidogénicas. Em ambos os casos e para todas as amostras analisadas observou-se a existência de fases de latência de duração superior a 8 horas, a que corresponde uma actividade acidogénica (medida nas condições iniciais) praticamente nula. Este facto sugere que as bactérias acidogénicas se encontravam inibidas pela presença do oleato, só sendo possível o cálculo da actividade para o período de tempo subsequente à fase de latência. Os valores de actividade determinados durante e após o choque hidráulico encontram-se compilados na Tabela 3.8, estando representados na Figura 3.6.

Tabela 3.8 Compilação dos valores de actividade acidogénica em lactose determinados durante e após o choque hidráulico.

Tempo (horas)	Duração da fase de latência (horas)	Actividade acidogénica (mmol lactose/gSV.dia)
0	13	7.8
4.5	13	10.0
9	13	5.7
24	8.2	8.15
51	8.2	7.1
73.5	13	6.9
95	15	11.0
167	14	6.1
340.5	8.2	2.8
892.5	8.2	6.0

----- Fim do choque.

É notória uma flutuação nos valores determinados, assemelhando-se esta, de certa forma, ao comportamento oscilante já observado anteriormente durante o estudo da actividade metanogénica específica dos diferentes grupos tróficos. De forma geral, nota-se uma tendência crescente da actividade acidogénica até à finalização da perturbação aplicada (t=95 horas), atingindo-se nesse ponto o valor máximo de 11.0 mmol lactose/gSV.dia. Após o retorno às condições pré-choque a actividade acidogénica

diminui acentuadamente, aumentando em seguida, embora 892.5 horas após o início do choque ainda se encontre em valores inferiores aos iniciais.

A configuração do reactor induz a concentração das bactérias acidogénicas na zona inferior do digestor. A aplicação de caudais elevados (choque hidráulico) poderá ter provocado o arrastamento desta população para a zona intermédia, originando um aumento da actividade. Por outro lado, estas bactérias têm tempos de duplicação curtos pelo que, após a respectiva fase de latência, poder-se-ão ter multiplicado rapidamente. O retorno às condições pré-choque traduz-se na aplicação de menores valores de caudal, o que poderá ter permitido a sedimentação das bactérias acidogénicas e consequente diminuição da sua quantidade na zona de amostragem, provocando uma diminuição da actividade.

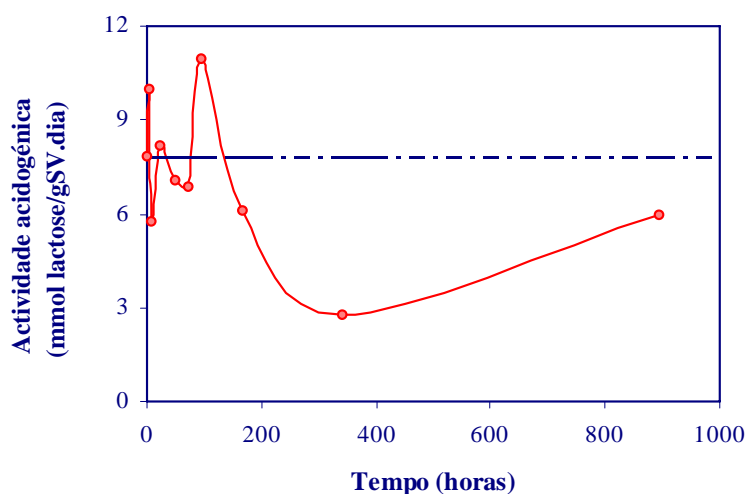


Figura 3.6 Variação da actividade acidogénica em lactose durante e após o choque hidráulico. (A linha recta tracejada representa o valor inicial estacionário).

### 3.2.4 Toxicidade do oleato sobre as bactérias metanogénicas acetoclásticas

Os estudos de toxicidade incidiram sobre o grupo trófico das bactérias metanogénicas acetoclásticas, devido à sua sensibilidade a condições operatórias adversas e presença de substâncias tóxicas, bem como ao seu importante papel metabólico no processo de

digestão anaeróbia (GUJER E ZEHNDER, 1983). Com estes estudos pretendia-se averiguar a influência da presença de ácido oleico, em situações de perturbação do estado (pseudo)estacionário do digester, sobre a tolerância das bactérias acetoclásticas a este tóxico. Comparou-se a resistência à toxicidade do oleato (expressa em termos do índice de toxicidade  $IC_{50}$ ) antes de cada uma das situações de choque ( $t=0$  horas) e algum tempo após o retorno às condições pré-choque ( $t\approx 35$  dias), bem como entre as duas situações de instabilidade aplicadas.

HANAKI *et al.* (1981) verificaram que a inibição das bactérias metanogénicas acetoclásticas pelos AGCL se manifestava pelo aparecimento de uma longa fase de latência (200-400 horas) na produção de metano. Com efeito, a observação da Figura 3.7 e Figura 3.8, onde se encontra representada a produção de metano (por unidade de sólidos voláteis medidos no final do ensaio) ao longo do tempo, resultante dos vários testes de toxicidade realizados, permite verificar a existência de uma fase de latência a preceder a produção de metano após ambos os choques, possivelmente devido a limitações difusionais de substratos e produtos, eventualmente por adsorção de oleato na biomassa. A duração dessa fase revelou-se variável com a concentração de oleato alimentada, sendo desprezável para concentrações inferiores a 500 mg oleato/L. Após a fase de latência, o oleato e o acetato eram aparentemente degradados em simultâneo.

As amostras recolhidas antes da aplicação dos dois choques exibem um comportamento diferente entre si e relativamente às amostras recolhidas após os choques. No caso do choque orgânico, a amostra referente a  $t=0$  apresentava um comportamento diáuxico, o qual é caracterizado pela existência de dois patamares e sugere a degradação inicial do acetato seguida pela degradação do oleato, tal como foi observado por ALVES *et al.* (1999b). As velocidades iniciais de produção de metano foram consideravelmente superiores às determinadas para a amostra recolhida após o choque, apenas se observando a existência de fase de latência para a concentração de 900 mg oleato/L.

A produção de metano correspondente aos dois patamares revelou-se, contudo, bastante variável e sem relação com as concentrações de substrato adicionadas, à semelhança do observado por PEREIRA (1998), contrariando o pressuposto mecanismo de degradação inicial do substrato mais facilmente degradável, seguida de degradação do outro após exaustão do primeiro. Desta forma, poder-se-á estar em presença de um mecanismo de degradação mais complexo, com fases de degradação preferencial de um substrato e fases de degradação simultânea.



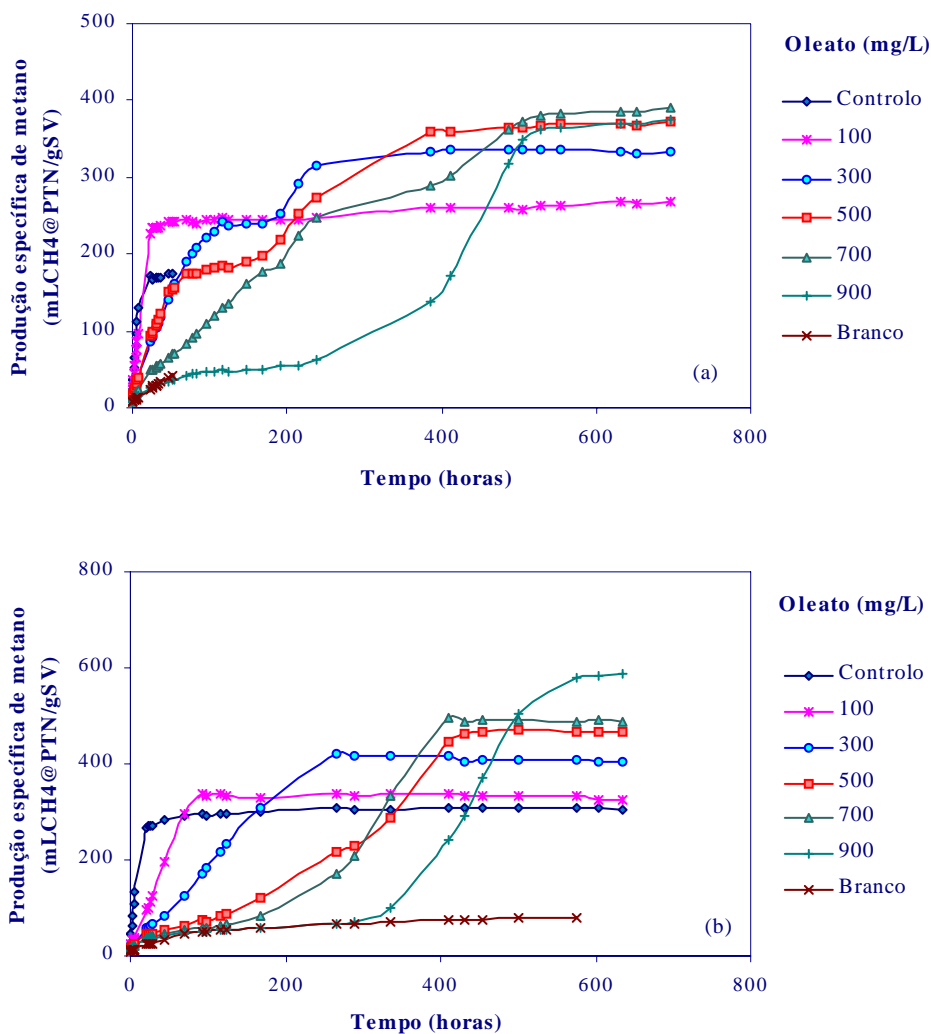


Figura 3.7 Produção específica de metano durante os testes de toxicidade efectuados às amostras recolhidas no início ( $t=0$  horas) do choque orgânico (a) e algum tempo após o retorno às condições pré-choque ( $t \approx 35$  dias) (b).

Relativamente ao choque hidráulico, apenas a biomassa sujeita à concentração de 900 mg oleato/L apresentou fase de latência, e não existe comportamento díáuxico. Também aqui as velocidades iniciais de produção de metano foram consideravelmente superiores às determinadas para a amostra recolhida após o choque.

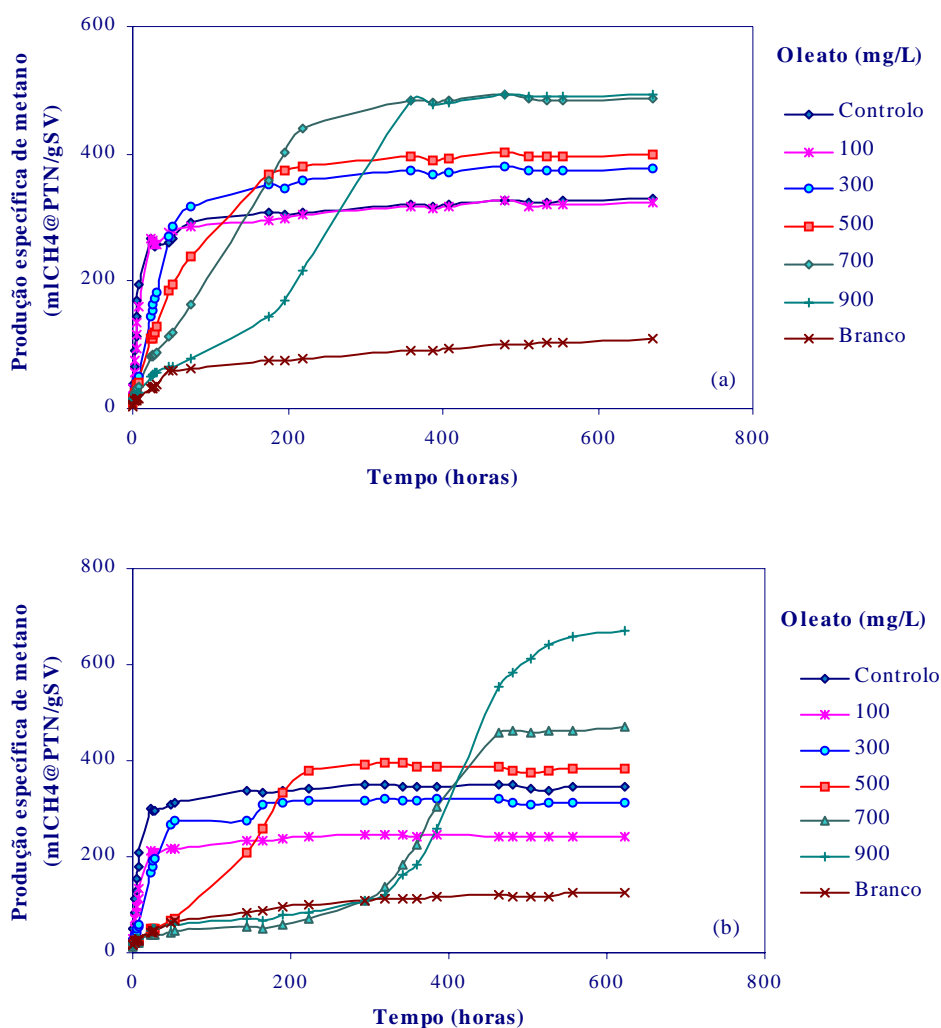


Figura 3.8 Produção específica de metano durante os testes de toxicidade efectuados à amostra recolhida no início (t=0 horas) do choque hidráulico (a) e algum tempo após o retorno às condições pré-choque (t≈35 dias) (b).

Na Figura 3.9 encontra-se representada a variação percentual da actividade acetoclástica com a concentração de oleato, para as várias amostras analisadas nos testes de toxicidade, encontrando-se compilados na Tabela 3.9 os respectivos valores do índice de toxicidade  $IC_{50}$ . Verifica-se que no caso do choque orgânico o  $IC_{50}$  diminuiu acentuadamente, traduzindo uma diminuição da resistência da biomassa face à toxicidade do oleato. Uma possível justificação para tal é o facto da adição directa de AGCL resultar em inibição do processo, tal como foi sugerido por ANGELIDAKI E AHRING (1992). Tendo em conta que durante este período de operação a razão molar oleato/( $Ca^{2+}+Mg^{2+}$ ) excedeu o valor estequiométrico 2, verifica-se que a par do efeito inibitório exercido pelo oleato sobre as bactérias acetoclásticas, a transferência de

substratos e produtos também seria afectada. Por outro lado, a aplicação do choque hidráulico levou a um aumento do índice de toxicidade. Uma vez que durante este período todo o oleato adicionado poderia teoricamente ter sido precipitado pelos iões divalentes presentes, a biomassa não deverá ter estado exposta a concentrações exageradas de oleato, tornando possível o desenvolvimento de uma população acetogénica capaz de degradar os AGCL mais rapidamente, evitando a sua acumulação até concentrações inibitórias. Este aumento do índice de toxicidade reflecte um aumento da tolerância ao oleato, podendo ser interpretado como um efeito de adaptação.

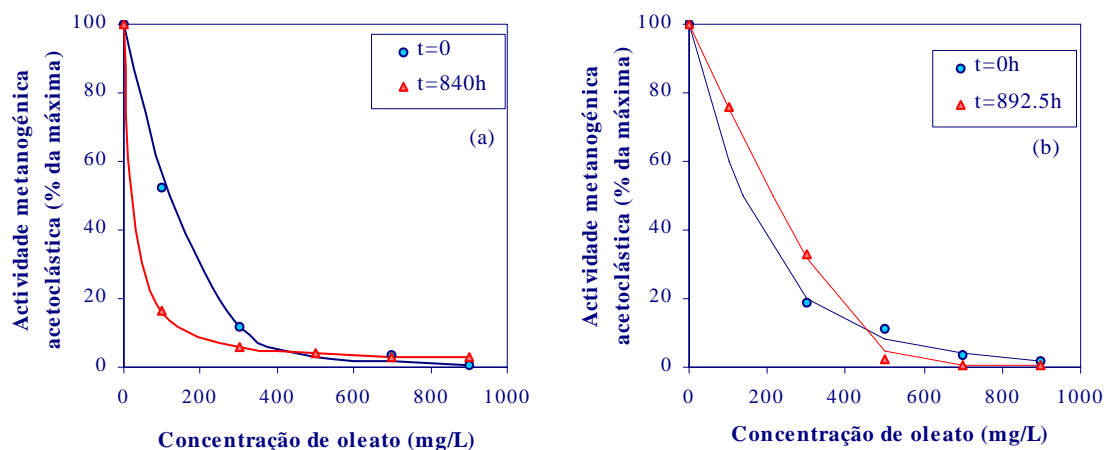


Figura 3.9 Variação percentual da actividade acetoclástica com a concentração de oleato determinada nos testes de toxicidade efectuados às amostras recolhidas no início ( $t=0$ ) e algum tempo após o retorno às condições pré-choque ( $t \approx 35$  dias), no caso da Etapa II (a) e da Etapa III (b)

A adaptação das bactérias metanogénicas aos AGCL tem sido questionada por vários autores, sendo conclusão geral que não ocorre adaptação. No entanto, a maior parte dos estudos têm sido realizados em reactor fechado (HANAKI *et al.*, 1981, ALGELIDAKI E AHRING, 1992, KOSTER E CRAMER, 1987), pelo que se revela interessante avaliar o comportamento da biomassa na presença destes compostos numa escala de tempo mais alargada, compatível com os tempos de operação dos reactores reais. ALVES *et al.* (1999b) verificaram a existência de um efeito de adaptação, medido pelo aumento do índice de toxicidade ( $IC_{50}$ ), no tratamento de um efluente contendo oleato de sódio por uma biomassa previamente exposta a lípidos.

Tabela 3.9 Índice de toxicidade do oleato de sódio sobre as bactérias acetoclásticas.

	IC <sub>50</sub> (mg oleato/L)
<b>Etapa II</b>	
t=0	120 ± 30
t=840 horas	20 ± 5
<b>Etapa III</b>	
t=0	140 ± 30
t=892.5 horas	215 ± 25

Há vários factores que afectam a toxicidade dos AGCL, nomeadamente a temperatura, o tipo de biomassa, a presença de sais de cálcio e magnésio e a área específica da biomassa. Os valores de IC<sub>50</sub> determinados no presente trabalho foram obtidos para biomassa suspensa, sem adição de Ca<sup>2+</sup> ou Mg<sup>2+</sup> nos ensaios de toxicidade e a 37 °C, devendo-se ter em consideração estes factores quando se pretender compará-los com outros valores da literatura. A observação da Tabela 3.10 permite verificar que os valores obtidos neste trabalho estão de acordo com os referidos na literatura.

Vários autores referem o encapsulamento da biomassa anaeróbia com AGCL (HANAKI *et al.*, 1981, RINZEMA, 1988, HWU, 1997). ALVES *et al.* (1999b) verificaram que a biomassa alimentada com oleato como única fonte de carbono exibiu uma elevada taxa de produção de metano devido a substrato residual, quando incubada em reactor fechado a 37 °C (detectada nos ensaios em “branco” (sem adição de qualquer substrato) dos testes de actividade e/ou toxicidade). Uma vez que, tal como no presente estudo, depois se ter retirado a biomassa do digestor se procedeu à sua centrifugação e ressuspensão em tampão anaeróbio, para remoção do substrato residual, a produção de metano observada deverá ser resultante da degradação de substrato residual adsorvido. Inicialmente admitiu-se que o substrato residual adsorvido era oleato, mas estes mesmos autores observaram que a adição de oleato retardava a taxa de degradação deste substrato residual. Desta forma, surge a possibilidade do substrato residual adsorvido não ser oleato, mas sim um composto intermediário da sua degradação, nomeadamente o estearato.

Tabela 3.10 Compilação de valores da literatura relativamente à toxicidade do oleato de sódio sobre as bactérias metanogénicas acetoclásticas (adaptado de ALVES, 1998).

Origem da biomassa	Tipo de biomassa	Temperatura (°C)	Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> (mg/L)	IC <sub>50</sub> (mg/L)	Referência
UASB/Processamento de batata (AVIKO)	Granular	30	35	1322	KOSTER E CRAMER, 1987
UASB/Processamento de batata (AVIKO)	Granular	40	2.7	690	HWU <i>et al.</i> , 1996
EGSB/leite gordo	Suspensa	40	2.7	79	HWU <i>et al.</i> , 1996
EGSB/leite gordo	Granular	40	2.7	1015	HWU <i>et al.</i> , 1996
ETAR municipal	Suspensa	37	0	10	HANAKI <i>et al.</i> , 1983
Filtro anaeróbio/leite gordo	Suspensa/floculenta	35	0	48-70	ALVES, 1998
Filtro anaeróbio/leite magro	Suspensa/floculenta	35	0	38-295	ALVES, 1998
Filtro anaeróbio/oleato e co-substrato	Suspensa/floculenta	35	0	85-137	ALVES, 1998
Filtro anaeróbio/oleato	Suspensa/floculenta	35	0	30-40	ALVES, 1998

Na Figura 3.10 encontra-se representada a evolução da produção específica máxima de metano devido a substrato residual ao longo das Etapas II e III e durante as cerca de 100 horas subsequentes. Verifica-se em ambos os casos uma tendência crescente ao longo do tempo, atingindo-se um máximo de  $463.8 \pm 25.6$  mg CQO-CH<sub>4</sub>/gSV 145 horas após a aplicação do choque orgânico, e de  $262.7 \pm 15.3$  mg CQO-CH<sub>4</sub>/gSV 95 horas após a aplicação do choque hidráulico. Considerando que todo o metano produzido foi proveniente de oleato adsorvido, obtém-se valores de  $320.5 \pm 17.7$  e  $181.6 \pm 10.6$  mg oleato adsorvido/gSV, para a Etapa II e III respectivamente. ALVES *et al.* (1999b) obtiveram cerca de 700 mg oleato adsorvido/gSV operando em contínuo com uma concentração de 4150 mg oleato/L e usando biomassa dispersa. No entanto, a presença de um co-substrato aparentemente diminui a adsorção do oleato na biomassa ou induz a sua degradação (ALVES *et al.*, 1999b), pelo que a utilização no presente trabalho de leite magro como co-substrato, bem como a aplicação de uma menor carga em oleato ( $3460.2$  e  $692.0$  mg oleato/L, no caso do choque orgânico e do choque hidráulico, respectivamente), torna lógica a obtenção de valores inferiores ao citado. A quantidade de oleato adsorvido é bastante maior no caso do choque orgânico, provavelmente devido à precipitação de parte do oleato pelos iões Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup> no caso do choque hidráulico.

Cerca de 35 dias após o retorno às condições pré-choque a produção específica máxima de metano era  $112.6 \pm 12.6$  e  $106.6 \pm 1.9$  mg CQO-CH<sub>4</sub>/gSV, no caso do choque orgânico e do choque hidráulico, respectivamente.

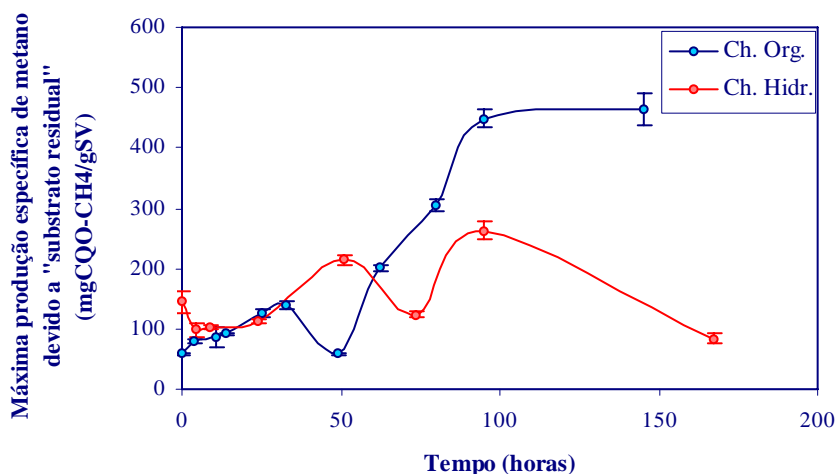


Figura 3.10 Evolução da produção específica máxima de metano devido a substrato residual ao longo das Etapas II e III e durante as cerca de 100 horas subsequentes.

Na Figura 3.11 encontra-se representada a taxa inicial de conversão de substrato residual em função da concentração deste, verificando-se que no choque hidráulico a máxima taxa de degradação de substrato residual foi obtida para a maior concentração de substrato, tal como foi referido por ALVES *et al.* (1999b). No presente trabalho obtiveram-se valores de  $114.5 \pm 1.4$  mg CQO-CH<sub>4</sub>/gSV.dia e  $168.3 \pm 4.6$  mg CQO-CH<sub>4</sub>/gSV.dia para a Etapa II e III, respectivamente. O facto do valor da taxa máxima de degradação de substrato residual ter sido maior no caso do choque hidráulico aponta para o desenvolvimento de uma população de bactérias sintróficas envolvidas na  $\beta$ -oxidação com capacidade para degradarem mais rapidamente os AGCL, particularmente o oleato ou outros produtos resultantes da sua degradação, tal como foi anteriormente sugerido com base nos resultados obtidos nos testes de toxicidade. Os valores obtidos são concordantes com os obtidos por ALVES *et al.* (1999b) e por PEREIRA (1998) ( $105.4 \pm 0.9$  mg CQO-CH<sub>4</sub>/gSV.dia e  $117.3 \pm 10.7$  mg CQO-CH<sub>4</sub>/gSV.dia, respectivamente), tendo sido verificado por estes autores que o substrato residual

adsorvido era degradado mais rapidamente do que o oleato adicionado a uma biomassa não encapsulada mas “adaptada” a lípidos.

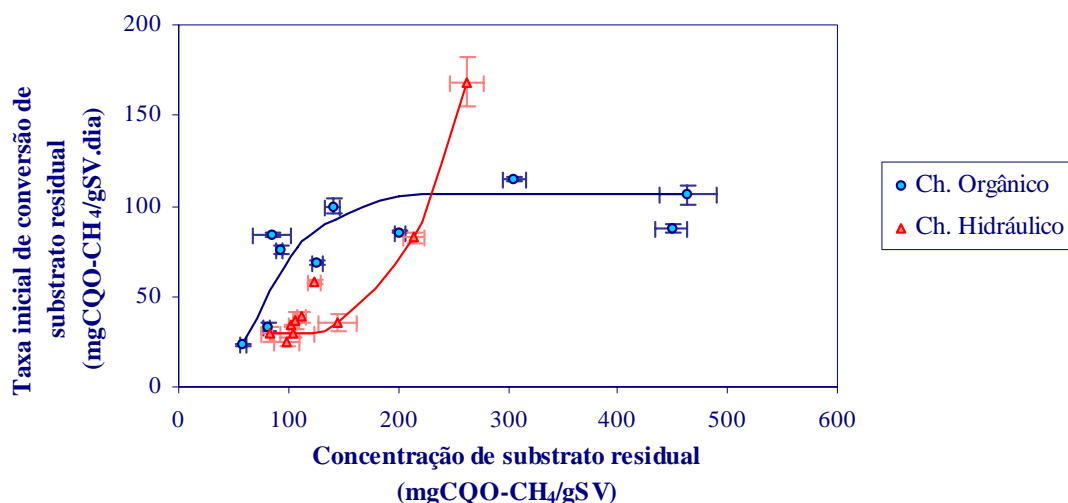


Figura 3.11 Valores da taxa inicial de conversão de substrato residual em função da concentração deste, obtidos para as situações de choque orgânico e choque hidráulico.

ALVES *et al.* (1999b) referem que a taxa de degradação do oleato em condições termófilas é cerca de quatro vezes superior à obtida em condições mesófilas, e Hwu (1997) verificou que as limitações difusionais da biomassa granular conduzem a uma menor taxa de degradação do oleato. Assim, embora a biomassa granular seja aparentemente mais resistente à toxicidade do oleato, parece ter, por outro lado, uma menor taxa de adsorção e degradação deste composto. Desta forma, possivelmente será mais vantajoso utilizar biomassa dispersa do que granular no tratamento de efluentes contendo AGCL, devido à sua maior capacidade de adsorção e maior taxa de degradação do oleato adsorvido, e trará vantagens a realização de ciclos sequenciais de adsorção-degradação relativamente a um sistema contínuo (ALVES *et al.*, 1999b). PEREIRA *et al.* (1999) concluíram que a operação a baixas velocidades ascensionais durante a fase de adsorção, e o recurso a agitação durante a fase de degradação, se revelam vantajosos relativamente à realização destes ciclos, face a condições operatórias de fluxo contínuo.

## 4. Conclusões

Neste trabalho estudou-se o efeito de sobrecargas de ácido oleico (orgânicas e hidráulicas) no desenvolvimento da biomassa num filtro anaeróbio, avaliando-se paralelamente o seu desempenho. A carga orgânica aplicada foi aumentada cinco vezes, quer através do aumento da concentração (choque orgânico), quer através da diminuição do tempo de retenção hidráulico (choque hidráulico).

Ambas as perturbações do estado (pseudo)estacionário de funcionamento do digester provocaram uma nítida deterioração do seu desempenho, verificando-se uma diminuição da eficiência de remoção de CQO solúvel (de um valor médio de 94.3 % para 30.2 %, no choque orgânico, e 73.2 %, no choque hidráulico). Observou-se também um aumento dos teores em AGV e SV presentes na corrente de saída, bem como do substrato não acidificado à saída do digester. Estes efeitos foram mais acentuados no caso do choque orgânico, verificando-se ainda uma recuperação mais lenta após esta situação. Devido à eventual precipitação de parte do oleato adicionado pelos iões divalentes  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , durante o choque hidráulico as populações anaeróbias podem ter estado expostas a cargas de oleato inferiores às presentes no choque orgânico. Este facto pode ter contribuído para o desenvolvimento de uma população acetogénica capaz de degradar os AGCL de forma suficientemente rápida, evitando a sua acumulação até concentrações inibitórias. Desta forma, os efeitos menos pronunciados sentidos durante o choque hidráulico, e a mais rápida recuperação observada, resultaram da adaptação da biomassa à toxicidade do oleato e ao facto do biofilme ser mais resistente a esta situação.

O estudo da quantidade total e distribuição no suporte das várias fracções de biomassa desenvolvidas no digester durante as situações de instabilidade permitiu concluir que o efeito do choque hidráulico sobre a espessura do biofilme (em termos de  $\text{gSV/m}^2$ ) foi no sentido de diminuir a quantidade de biomassa aderida, observando-se um efeito contrário no caso do choque orgânico.



A actividade metanogénica específica dos diferentes grupos tróficos exibiu uma tendência decrescente até à finalização da perturbação introduzida, recuperando posteriormente. Também aqui os efeitos foram mais acentuados e a recuperação processou-se mais lentamente na situação de sobrecarga orgânica. Embora as bactérias metanogénicas acetoclásticas sejam extremamente sensíveis a condições operacionais adversas e à presença de substâncias tóxicas, verificou-se que constituíram o grupo trófico que melhor recuperou após as condições aplicadas durante o choque orgânico, observando-se uma elevada actividade metanogénica acetoclástica algum tempo após o choque ( $573.4 \pm 58.9$  mLCH<sub>4</sub>@PTN/gSV.dia). As actividades em propionato e butirato sofreram uma diminuição acentuada durante as duas situações de choque, atingindo-se mesmo o valor zero 95 horas após a aplicação do choque orgânico. A actividade em etanol também diminuiu durante o choque orgânico, embora tenha aumentado acentuadamente durante a situação de sobrecarga hidráulica, o que parece ser um indício de que certas bactérias acetogénicas podem ser profundamente inibidas, enquanto outras podem ser estimuladas nestas condições.

O forte efeito inibitório do oleato de sódio sobre as bactérias acidogénicas traduziu-se na ausência de actividade por parte deste grupo trófico durante 8 horas ou mais. Após este período de latência, calculou-se a actividade das diferentes amostras de biomassa recolhidas ao longo do tempo durante a situação de choque hidráulico, observando-se uma tendência crescente até à finalização da perturbação introduzida. Este aumento é consequência do arrastamento da biomassa acidogénica da zona inferior do digestor para a parte intermédia, e dos reduzidos tempos de duplicação deste grupo de bactérias. O retorno às condições pré-choque provocou uma diminuição acentuada da actividade, devido aos menores caudais aplicados, verificando-se posteriormente a recuperação até valores ligeiramente inferiores aos iniciais.

A resistência das bactérias metanogénicas acetoclásticas à toxicidade do oleato de sódio foi superior no caso do choque hidráulico, tendo-se observado um aumento do valor do índice de toxicidade IC<sub>50</sub> (de  $140 \pm 30$  para  $215 \pm 25$  mg oleato/L), representativo de um efeito de adaptação.

Observou-se uma tendência crescente da produção específica máxima de metano devido a substrato residual, ao longo das situações de choque, atingindo-se valores mais elevados no caso do choque orgânico. Neste caso, o valor máximo foi alcançado dois dias depois do retorno às condições pré-choque.

## 5. Referências Bibliográficas

- ALONSO, M.S. (1996) Stability of anaerobic filters packed with different support materials. *Biotechnol. Lett.*, 18, 3, 315-320.
- ALPHENAAR (1994) Anaerobic granular sludge: characterization and factors affecting its performance. *Ph.D. Thesis*. Wageningen Agricultural University, Wageningen, The Netherlands.
- ALVAREZ, R.S., FIELD, J., LETTINGA, G. (1988) Toxicidad metanogénica de compuestos fenólicos y lipídicos. *In: Actas del 4º Seminario D.A.A.R.*, F.Fdz. Polanco, P.A. Garcia e S. Hernando (Eds.), Univ. Valladolid, 170-189.
- ALVES, M.M. (1998) Estudo e caracterização de digestores anaeróbios de leito fixo. *Tese de Doutorado*, Universidade do Minho, Braga.
- ALVES, M.M., BELLOUTI, M., PEREIRA, M.A., ÁLVARES PEREIRA, M.R., MOTA VIEIRA, J.A., NOVAIS, J.M., MOTA, M. (1998) A new method to study interactions between biomass and packing material in anaerobic fixed bed reactors. *Biotechnol. Tech.*, 12, 4, 277-283.
- ALVES, M.M., MOTA, M.M., NOVAIS, J.M. (1995) Técnicas de caracterização e estudo de digestores anaeróbios. *Boletim de Biotecnologia*, 52, 25-39.
- ALVES, M.M., MOTA VIEIRA, J.A., ÁLVARES PEREIRA, R.M., PEREIRA, M.A., NOVAIS, J.M., MOTA, M. (1999a) Effect of lipids and oleic acid on biomass development in anaerobic fixed-bed reactors. Part I: Biofilm growth and activity. (*submetido*).
- ALVES, M.M., MOTA VIEIRA, J.A., ÁLVARES PEREIRA, R.M., PEREIRA, M.A., NOVAIS, J.M., MOTA, M. (1999b) Effect of lipids and oleic acid on biomass development in anaerobic fixed-bed reactors. Part II: Oleic acid toxicity and biodegradability. (*submetido*).
- ANDREWS, J.F., GRAEF, S.P. (1971) Dynamic modeling and simulation of the anaerobic digestion process. *Adv. Chem. Ser.*, 105, 126-162.
- ANGELIDAKI, I., AHRING, B.K. (1992) Effects of free long-chain fatty acids on thermophilic anaerobic digestion. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 37, 808-812.
- ANGELIDAKI, I., AHRING, B.K. (1995) Establishment and characterization of an anaerobic thermophilic enrichment culture degrading long-chain fatty acids. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 6, 2442-2445.
- APHA, AWWA, WPCF (1989) *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 17<sup>th</sup> Ed., Washington.
- ARAYA, P. (1999) Estudio de la biodegradabilidad y toxicidad del estireno sobre los diferentes grupos tróficos anaeróbios. *Tese de Mestrado*, Universidad Católica de Valparaíso, Facultad de Ingeniería, Escuela de Ingeniería Bioquímica.
- BALCH, W.E., WOLFE, R.S. (1979) Specificity and biological distribution of coenzyme M (2-mercaptoethane sulfonic acid). *J. Bacteriol.*, 137, 256-263.
- BARFORD, J.P. (1988) Start-up, dynamics and control of anaerobic digesters. *In: Handbook of Anaerobic Fermentations*, L.E. Erickson e D.Y.-C. Fung (Eds.), Marcel Dekker, New York, 803-833.
- BELAY, N., SPARLING, R., DANIELS, L. (1984) Dinitrogen fixation by a thermophilic methanogenic bacterium. *Nature*, 312, 286-288.

- BOMAR, M., KNOLL, K., WIDDEL, F. (1985) Fixation of molecular nitrogen by *Methanosarcina barkeri*. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 31, 47-55.
- CHUA, H., HU, W.F., YU, P.H.F., CHEUNG, M.W.L. (1997) Responses of an anaerobic fixed-film reactor to hydraulic shock loadings. *Bioresource Technology*, 61, 79-83.
- COATES, J. (1991) Development, characterisation and stabilisation of granular methanogenic sludges. *Ph.D. Thesis*, National University of Ireland.
- COATES, J.D., COUGHLAN, M.F., COLLERAN, E. (1996) Simple method for the measurement of the hydrogenotrophic methanogenic activity of anaerobic sludges. *J. Microbiol. Meth.*, 26, 237-246.
- COLLERAN, E., CONCANNON, F., GOLDEM, T., GEOGHEGAN, F., CRUMLISH, B., KILLILEA, E., HENRY, M., COATES, J. (1992) Use of methanogenic activity tests to characterize anaerobic sludges, screen for anaerobic biodegradability and determine toxicity thresholds against individual anaerobic trophic groups and species. *Wat. Sci. Technol.*, 25, 31-40.
- COLLERAN, E., PISTILLI, A. (1994) Activity test system for determining the toxicity of xenobiotics chemicals to the methanogenic process. *Ann. Microbiol. Enzymol.*, 44, 1.
- DAHAB, M., YOUNG, J.C. (1982). Retention and distribution of biological solids in fixed-bed anaerobic filters. *In: Proc. 1<sup>st</sup> Int. Conf. on Fixed-Film Biological Processes*, Kings Island, Ohio, 1337-1351.
- DELORME, A.J., KAPUSCINSKI, R.B. (1990) On performing experimental studies on transient states of continuous-flow methanogenic reactors. *Biotechnol. Bioeng.*, 35, 746-750.
- DOLFING, J. (1988) Acetogenesis. *In: Biology of Anaerobic Microorganisms*, A.J.B. Zehnder (Ed.), John Wiley & Sons, New York, 417-468.
- DOLFING, J., BLOEMEN, W.G.B.M. (1985) Activity measurements as a tool to characterize the microbial composition of methanogenic environments. *J. Microbiol. Methods*, 4, 1-12.
- ECKENFELDER, W.W., PATOCZKA, J.B., PULLIAM, G.W. (1988) Anaerobic versus aerobic waste treatment in the U.S.A. *In: Poster-Papers 5th Int. Symp. Anaerobic Digestion*, A. Tilche e A. Rozzi (Eds.), Pergamon Press, New York, 105-114.
- FERRY, J.G. (1992) Biochemistry of methanogenesis. *Critical Rev. Biochem. Molecul. Biol.*, 27, 6, 473-503.
- FINNEGAN, S.M.T. (1994) Anaerobic digestion of sulphate-containing wastewater from citric acid production. *Ph.D. Thesis*, National University of Ireland.
- FLORÊNCIO, L., FIELD, J.A., LETTINGA, G. (1997) Methanol degradation in anaerobic bioreactors. *In Proc. 8<sup>th</sup> International Conf. on Anaerobic Digestion*, Sendai, Japão, Vol. 3, 35-38.
- FORAGE, R.G., HARRISON, D.E.F., PITT, D.E. (1985) Effect of environment on microbial activity. *In: Comprehensive Biotechnology: The Principles, Applications and Regulations of Biotechnology in Industry, Agriculture and Medicine*, M. Moo-Young. (Ed), Pergamon Press, Oxford, U.K., Vol. 1, 251-280.
- FORSTER, C.F. (1992) Oils, fats and greases in wastewater treatment. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 55, 402-404.
- FUKUZAKI, S., NISHIO, N., SHOBAYASHI, M., NAGAI, S. (1990) Inhibition of the fermentation of propionate to methane by hydrogen, acetate and propionate. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 719-723.
- GALBRAITH, H., MILLER, T.B. (1973) Physicochemical effects of long chain fatty acids on bacterial cells and their protoplasts. *J. Appl. Bact.*, 36, 647-658.
- GONÇALVES, I.M.C. (1988) Tratamento anaeróbio de efluentes líquidos. Trabalho de síntese com vista a apresentação de provas de capacidade científica. Universidade da Beira Interior, Departamento de Química, Covilhã.
- GRADY, C.P.L.JR., LIM, H.C. (1980) *Biological Waste Treatment*. Marcel Dekker, Inc., New York.
- GROBICKI, A., STUCKEY, D.C. (1991) Performance of the anaerobic baffled reactor under steady-state and shock loading conditions. *Biotechnol. Bioeng.*, 37, 344-355.
- GUJER, W., ZEHNDER, A.J.B. (1983) Conversion processes in anaerobic digestion, *Wat. Sci. Technol.*, 15, 127-167.

- HALL, E.R. (1992) Anaerobic treatment of wastewaters in suspended growth and fixed film processes. *In: Design of Anaerobic Processes for the Treatment of Industrial and Municipal Wastes*, J.F. Malina Jr. e F.G. Pohland (Eds.), Water Quality Management Library, Basel, Vol. 7, Cap. 2.
- HANAKI, K., CHATSANGUTHAI, S., MATSUO, T. (1994a) Characterization of accumulated biomass in anaerobic filter treating various types of substrates. *Biores. Technol.*, 47, 275-282.
- HANAKI, K., ISHIKAWA, T., MATSUO, T. (1993) Inhibitory and stimulative effects of oleate on methanogenesis from acetate in anaerobic digestion. *Technol. Rep. Tohoku Univ.*, 48, 123-135.
- HANAKI, K., HIRUNMASUWAN, S., MATSUO, T. (1994b) Protection of methanogenic bacteria from low pH and toxic materials by immobilization using polyvinyl alcohol. *Wat. Res.*, 28, 4, 877-885.
- HANAKI, K., MATSUO, T., NAGASE, M. (1981) Mechanisms of inhibition caused by long chain fatty acids in anaerobic digestion process. *Biotechnol. Bioeng.*, 23, 1591-1560.
- HAWKES, F.R., DONNELLY, T., ANDERSON, G.K. (1995) Comparative performance of anaerobic digesters operating on ice-cream wastewater. *Wat. Res.*, 29, 2, 525-533.
- HENZE, M., HARREMÕES, P. (1983) Anaerobic treatment of wastewater in fixed film reactors - a literature review. *Wat. Sci. Technol.*, 15, 1-101.
- HICKEY, R.F., SWITZENBAUM, S.M. (1988) The role of intermediate and product gases as a regulators and indicators of anaerobic digestion. *In: Poster-Papers 5th Int. Symp. Anaerobic Digestion*, A. Tilche e A. Rozzi (Eds.), Bolonha, Italy, 43-47.
- HICKEY, R.F., VANDERWIELEN, J., SWITZENBAUM, M.S. (1989) The effect of heavy metals on methane production and hydrogen and carbon monoxide levels during batch anaerobic sludge digestion. *Wat. Res.*, 23, 207-218.
- HILL, D.T., COBB, S.A., BOLTE, J.P. (1987) Using volatile fatty acid relationships to predict anaerobic digester failure. *Transactions of ASAE*, 30, 2, 496-501.
- HILL, D.T., HOLMBERG, R.D. (1988) Long chain volatile fatty acid relationship in anaerobic digestion of swine waste. *Biological Wastes*, 23, 195-214.
- HUYSMAN, P., VAN MEENEN, P., VAN ASSCHE, P., VERSTRAETE, W. (1983) Factors affecting colonization of non porous and porous packing materials in model upflow methane reactors. *Biotechnol. Lett.*, 5, 643-648.
- HWU, C.-S. (1997) Enhancing anaerobic treatment of wastewaters containing oleic acid. *Ph.D. Thesis*, Wageningen Agricultural University, Wageningen, The Netherlands.
- HWU, C.-S., DONLON, B., LETTINGA, G. (1996) Comparative toxicity of long-chain fatty acid to anaerobic sludges from various origins. *Wat. Sci. Technol.*, 34, 5-6, 351-358.
- HWU, C.-S., MOLENAAR, G., GARTHOFF, J., VAN LIER, J.B., LETTINGA, G. (1997a) Thermophilic high-rate anaerobic treatment of wastewater containing long-chain fatty acids: impact of reactor hydrodynamics. *Biotechnol. Lett.*, 19, 5, 447-451.
- HWU, C.-S., TSENG, S.-K., YUAN, C.-Y., KULIK, Z., LETTINGA, G. (1998) Biosorption of long-chain fatty acids in UASB treatment process. *Wat. Res.*, 32, 5, 1571-1579.
- HWU, C.-S., VAN BEEK, B., VAN LIER, J.B., LETTING, G. (1997b) Thermophilic high-rate anaerobic treatment of wastewater containing long-chain fatty acids: effect of washed out biomass recirculation. *Biotechnol. Lett.*, 19, 5, 453-456.
- INANC, B., MATSUI, S., IDE, S. (1996) Propionic acid accumulation and controlling factors in anaerobic treatment of carbohydrate: effects of H<sub>2</sub> and pH. *Wat. Sci. Technol.*, 34, 317-325.
- IZA, J., COLLERAN, E., PARÍS, J.M., WU, W.-M. (1991) International workshop on anaerobic treatment technology for municipal and industrial wastewaters: summary paper. *Water Sci. Technol.*, 24, 8, 1-16.
- JARREL, K.F., SPROTT, G.D. (1982) Nickel transport in *Methanobacterium bryantii*. *J. Bacteriol.*, 151, 1195.
- JERIS, J., MCCARTY, P.L. (1965) The biochemistry of methane fermentation using C14 tracers. *J. Wat Pollut. Control Fed.*, 37:2, 143-148.
- JIMENO, A., BERMÚDEZ, J.J., CANOVAS-DIAZ, M., MANJON, A., IBORRA, J.L. (1990) Methanogenic biofilm growth studies in an anaerobic fixed-film reactor. *Enzyme Microb. Technol.*, 12, 387-394.

- KATO, M. (1994) The anaerobic treatment of low strength soluble wastewaters. *Ph.D. Thesis*, Wageningen Agricultural University, Wageningen, The Netherlands.
- KENNEDY, K.J., DROSTE, R.L. (1986) Anaerobic fixed-film reactors treating carbohydrate wastewater. *Wat. Res.*, 30, 685-695.
- KEURENTJES, J., RINZEMA, A. (1986) Adsorption of capric acid onto granular methanogenic sludge. *Proc. EWPCA Conf. "Anaerobic Treatment a Grown-Up Technology"*, Amsterdão, 645-648.
- KIDBY, D.W., NEDWELL, D. B. (1991) An investigation into the suitability of biogas hydrogen concentration as a performance monitor for anaerobic sewage sludge digesters. *Wat. Res.*, 25, 1007-1012.
- KOSTER, I.W., CRAMER, A. (1987) Inhibition of methanogenesis from acetate in granular sludge by long-chain fatty acids. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 2, 403-409.
- LAU, I.W.C., FANG, H.H.P. (1997) Effect of temperature shocks to thermophilic granules. *Wat. Res.*, 31, 10, 2626-2632.
- LEMA, J.M., MENDEZ, R.J. (1988) Diseño y operacion de digestores anaerobios basados en conceptos cineticos. *In Actas del 4º Seminario D.A.A.R., F.Fdz. Polanco, P.A. Garcia e S. Hernando (Eds.)*, Univ. Valladolid, 21-39.
- LEMA, J.M., MENDEZ, R., SOTO, M. (1992) Bases cineticas y microbiologicas en el diseño de digestores anaerobios. *Ingenieria Quimica*, Enero, 191-201.
- LETTINGA, G. (1995) Anaerobic digestion and wastewater treatment. *Antonie van Leeuwenhoek*, 67, 3-28.
- LETTINGA, G., HULSHOFF POL, L.W., ZEEMAN, G., FIELD, J., VAN LIER, J.B., VAN BUUREN, J.C.L., JANSSEN, A.J.H., LENS, P. (1997) Anaerobic treatment in sustainable environmental production concepts. *In: Proc. 8<sup>th</sup> Int. Conf. on Anaerobic Digestion*, Sendai, Japão, Vol. 1, 32-39.
- LETTINGA, G., VAN VELSEN, A.F.M., HOBMA, S.W., DE ZEEUW, W., KLAPWIJK, A. (1980) Use of upflow sludge blanket (USB) reactor concept for biological wastewater treatment, especially for anaerobic treatment. *Biotechnol. Bioeng.*, 22, 699-734.
- LIU, B.Y.M., PFEFFER, J.T., SUIDAN, M.T. (1991) Loading capacity of a packed-bed anaerobic reactor. *J. Wat. Pollut. Control Fed.*, 63:2, 145-152.
- LOBO, A.L., ZINDER, S.H. (1988) Diazotrophy and nitrogenase activity in the archaeobacterium *Methanosarcina barkeri*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 1656-1661.
- MARCHAIM, U., KRAUSE, C. (1993) Propionic to acetic acid ratios in overloaded anaerobic digestion. *Biores. Technol.*, 43, 195-203.
- MCCARTY, P.L. (1964) Anaerobic waste treatment fundamentals. *Part 3. Public Works*, 91-94.
- MESSING, R.A., OPPERMANN, R.A. (1979) Pore dimensions for accumulating biomass. I. Microbes that reproduce by fission or by budding. *Biotechnology and Bioengineering*, 21, 49-58.
- MORRISON, R.T., BOYD, R.N. (1993) *Química Orgânica*. Tradução de M.A. Silva, 10ª Ed., Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa.
- MOSEY, F.E. (1983) Mathematical modelling of the anaerobic digestion process: regulatory mechanisms for the formation of short-chain volatile acids from glucose. *Wat. Sci. Technol.*, 15, 209-232.
- MOSEY, F.E., FERNANDEZ, X.A. (1984) Mathematical modelling of methanogenesis in sewage sludge digestion. *In: Microbiological Methods for Environmental Biotechnology*, J.M. Graincher e J.M. Lynch (Eds.), Academic Press, New York 159-168.
- MOUNTFORD, D.O., ASHER, R.A. (1979) Effect of inorganic sulfide on the growth and metabolism of *Methanosarcina barkeri* strain DM. *Appl. Environ. Microbiol.*, 37, 670-675.
- MOZES, N., LEONARD, A.J., ROUXHET, P.G. (1988) On the relation between the elemental surface composition of yeasts and bacteria and their charge and hydrophobicity. *Biochem. Biophys. Acta*, 945, 324-334.
- NACHAIYASIT, S., STUCKEY, D.C. (1995) Microbial response to environmental changes in an anaerobic baffled reactor (ABR). *Antonie van Leeuwenhoek*, 67, 111-123.

- NÄHLE, C. (1991) The contact process for the anaerobic treatment of wastewater: technology design and experiences. *Wat. Sci. Technol.*, 24, 8, 179-191.
- OREMLAND, R.S. (1988). Biogeochemistry of methanogenic bacteria. *In: Biology of Anaerobic Microorganisms*, A.J.B. Zehnder (Ed.) John Wiley & Sons, New York, 641-705.
- PARIS, J.M., LEMA, J.M., CASAS, C. (1983) Criterios de selección de tecnología en la digestión anaerobia de aguas residuales. *Ingeniería Química*, Octubre, 143-149.
- PARKIN, G.F., OWEN, W.F. (1986) Fundamentals of anaerobic digestion of wastewater sludges. *J. Environ. Eng. Div. ASCE*, 112, 5, 867-919.
- PEREIRA, M.A. (1998) Degradação de ácido oleico em filtro anaeróbio: efeito da adaptação do inóculo e da recirculação da biomassa. *Tese de Mestrado*, Universidade do Minho, Braga.
- PEREIRA, M.A., MOTA, M., ALVES, M.M. (1999) Degradation of oleic acid in anaerobic filters: effect of inoculum acclimatization and biomass recirculation. (*Submetido*).
- POHLAND, F.G. (1992) Anaerobic treatment: fundamental concepts, applications, and new horizons. *In: Design of Anaerobic Processes for the Treatment of Industrial and Municipal Wastes*, J.F. Malina Jr. e F.G. Pohland (Eds.), Water Quality Management Library, Basel, Vol. 7, Cap. 1.
- REYNOLDS, P.J. (1986) Support matrix and feed flow effects in anaerobic fixed bed reactors. *PhD Thesis*, University College, Galway, Ireland.
- RINZEMA, A. (1988) Anaerobic treatment of wastewater with high concentration of lipids or sulfate. *Ph.D. Thesis*, Wageningen Agricultural University, Wageningen, The Netherlands.
- RINZEMA, A., ALPHENAAR, A., LETTINGA, G. (1989) The effects of lauric acid shock loads on the biological and physical performance of granular sludge in UASB reactors digesting acetate. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 46, 257-266.
- RINZEMA, A., BOONE, M., VAN KNIPPENBERG, K., LETTINGA, G. (1994) Bactericidal effect of long chain fatty acids in anaerobic digestion. *Wat. Environ. Res.*, 66, 1, 40-49.
- ROMLI, M., KELLER, J., LEE, P.L., GREENFIELD, P.F. (1995) Model prediction and verification of a two-stage high-rate anaerobic wastewater treatment system subjected to shock loads. *Trans IChemE*, 73, Part B, 151-154.
- ROY, F., ALBAGNAC, G., SAMAIN, E. (1985) Influence of calcium addition on growth of highly purified syntrophic cultures degrading long chain fatty acids. *Appl. Environ. Microbiol.*, 49, 3.
- SAKHAROVA, Z.V., RABOTNOVA, I.L. (1976) Effects of pH on physiological and biochemical properties of chemostatic culture of *Bacillus megaterium*. *Mikrobiologiya (Engl Transl)*, 46, 15-21.
- SAMSON, R., VAN DEN BERG, L., KENNEDY, K.J. (1985) Mixing characteristics and start-up of anaerobic downflow stationary fixed film (DSSF) reactors. *Biotechnol. Bioeng.*, 27, 10-19, 1985.
- SAM-SOON, P., LOEWENTHAL, R.E., WENTZEL, M.C., MARAIS, G.V.R. (1991) A long-chain fatty acid, oleate, as sole substrate in upflow anaerobic sludge bed (UASB) reactor systems. *Water SA*, 17, 1, 31-36.
- SÄRNER, E. (1986) Influence and control of H<sub>2</sub>S on full-scale plants and pilot plant experiments. *In Conference Papers of "Anaerobic Treatment a Grown-Up Technology", AQUATEC'86*, Industrial Presentations B.V., Schiedam, 189-204.
- SAYED, S., VAN CAMPEN, L., LETTINGA, G. (1987) Anaerobic treatment of slaughterhouse waste using a granular sludge UASB reactor. *Biological Wastes*, 21, 11-28.
- SCHINK, B. (1988) Principles and limits of anaerobic degradation: environmental and technological aspects. *In Biology of Anaerobic Microorganisms*, A.J. B. Zehnder (Ed.), John Wiley & Sons, New York, 771-846.
- SCHINK, B., THAUER, R.K. (1988) Energetics of syntrophic methane formation and the influence of aggregation. *In Proc. Granular Anaerobic Sludge: Microbiology and Technology (GASMAT) Workshop*, G. Lettinga, A.J. B. Zehnder, J.T.C. Grotenhuis, L.W. Hulshoff Pol (Eds.), Puduc Wageningen, Wageningen, 5-17.
- SMITH, D.P., MCCARTY, P.L. (1990) Factors governing methane fluctuations following shock loadings of digesters. *Res. J. Water Pollut. Control Fed.*, 62, 1, 58-64.

- SONG, K.-H., YOUNG, J.C. (1986) Media design factors for fixed-bed filters. *J. Water Pollut. Control Fed.*, 58:2, 115-121.
- SOTO, M., MÉNDEZ, R., LEMA, J.M. (1992) Diseño y operacion de digestores anaerobios. II. Operacion y control. *Ingeniería Química (no prelo)*.
- SPEECE, R.E. (1983) Anaerobic biotechnology for industrial wastewater treatment. *Environ. Sci. Technol.*, 17, 9, 416-427.
- SPEECE, R.E. (1996) Toxicity response. *In: Anaerobic Biotechnology For Industrial Wastewaters*, R.E. Speece (Ed.), Vanderbilt University, Archæ Press, USA, 245-286.
- SPEECE, R.E., MCCARTY, P.L. (1964) Nutrient requirements and biological solids accumulation in anaerobic digestion. *Adv. Wat. Pollut. Res.*, 2, 305-322.
- SPEECE, R.E., PARKIN, G.F. (1983) The response of methane bacteria to toxicity. *In: Proc. Third International Symposium on Anaerobic Digestion*, Boston, Massachussets, 23-35.
- SWITZENBAUM, M.S., JEWELL, W.J. (1980) Anaerobic attached-film expanded bed reactor treatment. *J. Water Pollut. Control Fed.*, 52:7, 1953-1965.
- TAKASHIMA, M., SPEECE, R.E. (1989) Mineral requirements for high-rate methane fermentation of acetate at low SRT. *J. Wat. Pollut. Control Fed.*, 61, 1645-1650.
- TAKASHIMA, M., SPEECE, R.E. (1990) Mineral requirements for methane fermentation. *Crit. Rev. Env. Control*, 19, 5, 465-479.
- UGURLU, A., FORSTER, C.F. (1992) The impact of shock loadings on the performance of thermophilic anaerobic filters with porous and non-porous packings. *Bioresource Technology*, 39, 23-30.
- VAN DEN BERG, L., LENTZ, C.P. (1979) Comparison between up and downflow anaerobic fixed-film reactor of
- VAN LIER, J.B., BOERSMA, F., DEBETS, M.M.W.H., LETTINGA, G. (1994). High rate thermophilic anaerobic wastewater treatment in compartmentalized upflow reactors. *Wat. Sci. Technol.*, 30, 251-261.
- VAN LIER, J.B., HULSBEEK, J., STAMS, A.J.M., LETTINGA, G. (1993) Temperature susceptibility of thermophilic methanogenic sludge: implications for reactor start-up and operation. *Bioresource Technology*, 43, 227-235.
- VAN LIER, J.B., MARTIN, J.L.S., LETTINGA, G. (1996) Effect of temperature on the anaerobic thermophilic conversion of volatile fatty acids by dispersed and granular sludge. *Wat. Res.*, 30, 1, 199-207.
- VAN LIER, J.B., REBAC, S., LETTINGA, G. (1997) High-rate anaerobic wastewater treatment under psychrophilic and thermophilic conditions. *Wat. Sci. Technol.*, 35, 10, 199-206.
- VERSTRAETE, W., VANDEVIVERE, P. (1997) Broader and newer applications of anaerobic digestion. *In: Proc. 8<sup>th</sup> Int. Conf. on Anaerobic Digestion*, Sendai, Japão, Vol. 1, 67-74.
- WENG, C.-N., JERIS, J.S. (1976) Biochemical mechanisms in the methane fermentation of glutamic and oleic acids. *Wat. Res.*, 10, 9-18.
- WOLIN, M.J. (1974) Metabolic interactions among intestinal microorganisms. *American J. of Clinical Nutrition*, 27, 1320-1334.
- YOUNG, J.C. (1983) The anaerobic filter - past, present and future. *In: Proc. Third Int. Symp. on Anaerobic Digestion*, Boston, Massachussets, 91-105.
- YOUNG, J.C. (1991) Factors affecting the design and performance of upflow anaerobic filters. *Water Sci. Technol.*, 24:8, 133-155.
- YOUNG, J.C., MCCARTY, P.L. (1967) The anaerobic filter for waste treatment. *In: Proc 22<sup>nd</sup>. Ind. Waste Conf.*, Purdue University, 559-575.
- ZEHNDER, A.J.B., HUSER, B.A., BROCK, T.D., WUHRMANN, K. (1980) Charaterization of an acetate-decarboxylating, non-hydrogen-oxidizing methane bacterium. *Arch. Microbiol.*, 124, 1-11.
- ZEHNDER, A.J.B., STUMM, W. (1988) Geochemistry and biogeochemistry of anaerobic bacteria. *In: Biology of Anaerobic Microorganisms*, A.J.B. Zehnder (Ed.), John Wiley & Sons, New York, 1-38.

- ZINDER, S.H. (1988). Conversion of acetic acid to methane by thermophiles. *In Proc. 5<sup>th</sup> Int. Symp. Anaerobic Digestion*, E.R. Hall e P.N. Hobson (Eds.), Pergamon Press, New York, 1-12.



# **Apêndice A**

## **Calibração do transdutor de pressão**

O factor de calibração do transdutor foi determinado sempre que se iniciou um teste de actividade ou toxicidade, recorrendo a uma calibração realizada de acordo com o seguinte procedimento:

- Encheu-se completamente um frasco de 70 mL com água destilada e selou-se com uma rolha de borracha e uma cápsula de alumínio. Retiraram-se todas as bolhas de ar, substituindo-as por água.
- Retiraram-se exactamente 10 mL de água.
- Ventilou-se o frasco e procedeu-se à leitura à pressão atmosférica.
- Injectou-se 1mL de ar no frasco e registou-se o valor de pressão em *mV*.
- Os dois procedimentos anteriores repetiram-se para valores entre 1 e 20 mL, com injeções do mesmo volume de ar em triplicado. Ao valor de pressão lido para cada volume de ar injectado subtraiu-se o valor obtido após ventilação do frasco.
- Representou-se graficamente a variação de pressão em *mV* em função do volume de ar injectado em 10 mL de “*headspace*” e calculou-se o factor de correcção FC

Na Figura A.1 está representada um exemplo de uma curva de calibração, onde se pode verificar que na gama de pressões até 2 bar a resposta é linear.

Idealmente, para a injeção de 10 mL de ar em 10 mL de “*headspace*” deve ler-se um valor de 100 *mV*. Contudo, pode haver um desvio deste valor, podendo, por exemplo, ler-se 106.5 em vez de 100. Este desvio é contabilizado no factor de calibração FC, que contempla ainda a conversão dos valores medidos a 37 °C para as condições normais de temperatura. Para o exemplo atrás referido vem:

$$FC = \frac{100}{106.5} \times \frac{273}{(273 + 37)} = 0.827$$

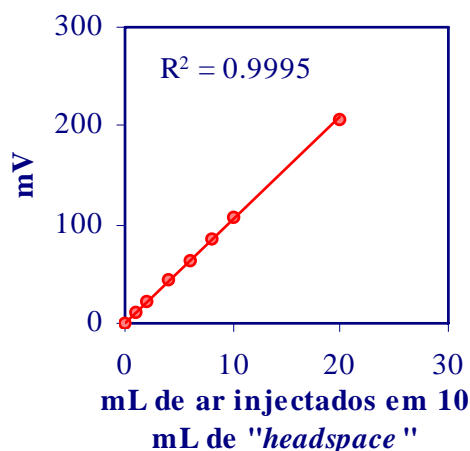


Figura A.1 Exemplo de uma curva de calibração do transdutor de pressão.

# **Apêndice B**

## **Dados experimentais**

**Tabela B.1** Dados de operação.

Data	Tempo (dias)	Caudal (L/dia)	TRH (dias)	Factor de Recirc.	Cin (mgO <sub>2</sub> /L)	Cout sol. (mgO <sub>2</sub> /L)	BV apl (kgCQO/m <sup>3</sup> .dia)	E sol. (%)	SV à saída (mg/L)	AGV à saída (mgCQO/L)
21-Jan-99	0	10,55	3,79	9,08	1564	158	0,413	89,9%		
25-Jan-99	4	8,94	4,47	9,04	1985	132	0,444	93,4%	237	
27-Jan-99	6	8,76	4,57	8,98	1721	136	0,377	92,1%	177	
29-Jan-99	8	9,73	4,11	8,87	2294	124	0,558	94,6%	158	26,9
1-Fev-99	11	11,21	3,57	9,32	1894	94	0,531	95,0%	135	15,4
3-Fev-99	13	11,19	3,57	9,32	2472	155	0,692	93,7%	230	32,9
5-Fev-99	15	10,84	3,69	9,43	1595	128	0,432	92,0%	195	20,7
<b>Média</b>		<b>10,17</b>	<b>3,97</b>	<b>9,15</b>		<b>132,43</b>	<b>0,49</b>	<b>93,0%</b>	<b>188,97</b>	<b>23,96</b>
<b>Desvio Padrão</b>		<b>0,96</b>	<b>0,39</b>	<b>0,19</b>		<b>19,80</b>	<b>0,10</b>	<b>0,02</b>	<b>36,60</b>	<b>6,57</b>
<b>Desvio Padrão (%)</b>		<b>9,40</b>	<b>9,79</b>	<b>2,11</b>		<b>14,95</b>	<b>20,48</b>	<b>1,76</b>	<b>19,37</b>	<b>27,42</b>
<b>Interv. de confiança</b>		<b>0,71</b>	<b>0,29</b>	<b>0,14</b>		<b>14,67</b>	<b>0,07</b>	<b>0,01</b>	<b>29,28</b>	<b>6,44</b>
<b>Duplicação do Caudal</b>										
8-Fev-99	18	21,16	1,89	0,87	2013	190	1,065	90,6%	242	95,6
10-Fev-99	20	20,32	1,97	0,91	2009	188	1,021	90,6%	268	91,4
12-Fev-99	22	20,30	1,97	0,91	2665	158	1,352	94,1%	243	78,0
15-Fev-99	25	20,41	1,96	0,91					213	44,7
17-Fev-99	27	20,42	1,96	0,90	2206	126	1,126	94,3%	230	55,8
19-Fev-99	29	19,69	2,03	0,93	1632	136	0,803	91,7%	230	70,4
22-Fev-99	32	20,34	1,97	0,91	1653	108	0,841	93,5%	158	77,4
24-Fev-99	34	19,71	2,03	0,93	2088	137	1,028	93,4%	170	56,2
<b>Média</b>					<b>1985,07</b>	<b>149,00</b>	<b>1,03</b>	<b>92,6%</b>	<b>219,10</b>	<b>71,19</b>
<b>Desvio Padrão</b>					<b>327,11</b>	<b>28,80</b>	<b>0,17</b>	<b>0,01</b>	<b>34,99</b>	<b>16,78</b>
<b>Desvio Padrão (%)</b>					<b>16,48</b>	<b>19,33</b>	<b>16,42</b>	<b>1,59</b>	<b>15,97</b>	<b>23,58</b>
<b>Interv. de confiança</b>					<b>171,35</b>	<b>21,33</b>	<b>0,13</b>	<b>0,01</b>	<b>24,25</b>	<b>11,63</b>
<b>Duplicação do CQO in</b>										
26-Fev-99	36	20,62	1,94	0,90	4571	262	2,356	94,3%	360	124,1
1-Mar-99	39	20,42	1,96	0,90	3978	343	2,031	91,4%	461	90,1
3-Mar-99	41	19,01	2,10	0,97					535	37,5
5-Mar-99	43	19,66	2,03	0,95	3946	243	1,939	93,8%	606	153,3
8-Mar-99	46	19,45	2,06	0,95	4011	73	1,950	98,2%	215	0,0
10-Mar-99	48	19,34	2,07	0,97					363	100,0
12-Mar-99	50	20,00	2,00	0,91					461	60,3
15-Mar-99	53	19,67	2,03	0,90	4080	192	2,006	95,3%	470	57,5
<b>Média</b>		<b>20,03</b>	<b>2,00</b>	<b>0,92</b>		<b>222,60</b>	<b>2,06</b>	<b>94,6%</b>	<b>434,07</b>	<b>77,86</b>
<b>Desvio Padrão</b>		<b>0,54</b>	<b>0,05</b>	<b>0,03</b>		<b>89,20</b>	<b>0,15</b>	<b>0,02</b>	<b>112,22</b>	<b>45,94</b>
<b>Desvio Padrão (%)</b>		<b>2,70</b>	<b>2,70</b>	<b>2,80</b>		<b>40,07</b>	<b>7,47</b>	<b>2,33</b>	<b>25,85</b>	<b>59,00</b>
<b>Interv. de confiança</b>		<b>0,26</b>	<b>0,03</b>	<b>0,01</b>		<b>78,18</b>	<b>0,13</b>	<b>0,02</b>	<b>77,76</b>	<b>31,83</b>
<b>Duplicação do Caudal</b>										
17-Mar-99	55	38,64	1,04	0,84	4447	222	4,296	95,0%	556	116,9
19-Mar-99	57	45,67	0,88	0,76	4160	192	4,750	95,4%	628	104,1
22-Mar-99	60	38,84	1,03	0,98					277	0,0
24-Mar-99	62	37,60	1,06	1,01	4594	165	4,318	96,4%	511	82,5
26-Mar-99	64	40,60	0,99	0,93	4323	189	4,388	95,6%	563	95,9
29-Mar-99	67	40,38	0,99		4114	163	4,153	96,0%	566	100,9
1-Abr-99	70	40,70	0,98	0,94	4624	183	4,705	96,0%	595	107,5
5-Abr-99	74	40,72	0,98		4251	233	4,328	94,5%	427	64,2
7-Abr-99	76	40,83	0,98						546	95,8
9-Abr-99	78	40,72	0,98	0,93	4213	184	4,289	95,6%	580	90,7
12-Abr-99	81	40,81	0,98						545	93,4
14-Abr-99	83	40,95	0,98		4439	268	4,544	94,0%	573	131,1
<b>Média</b>						<b>199,89</b>		<b>95,4%</b>	<b>530,58</b>	<b>90,26</b>
<b>Desvio Padrão</b>						<b>32,53</b>		<b>0,01</b>	<b>89,89</b>	<b>31,54</b>
<b>Desvio Padrão (%)</b>						<b>16,27</b>		<b>0,75</b>	<b>16,94</b>	<b>34,95</b>
<b>Interv. de confiança</b>						<b>21,25</b>		<b>0,00</b>	<b>50,86</b>	<b>17,85</b>

**Tabela B.1** (Continuação)

Data	Tempo (dias)	Caudal (L/dia)	TRH (dias)	Factor de Recirc.	Cin (mgO <sub>2</sub> /L)	Cout sol. (mgO <sub>2</sub> /L)	BV apl (kgCQO/m <sup>3</sup> .dia)	E sol. (%)	SV à saída (mg/L)	AGV à saída (mgCQO/L)
<b>Alteração da Composição da Alimentação (CQOin = 1/2CQOLeite + 1/2CQOOleato)</b>										
16-Abr-99	85		39,97	0,96	2524	77	2,522	96,9%	294	44,5
19-Abr-99	88	38,60	1,04		1297	69	1,252	94,7%	193	87,1
21-Abr-99	90	40,84	0,98		2357	133	2,406	94,4%	320	62,4
23-Abr-99	92	41,05	0,97	0,91	3143	171	3,226	94,6%	427	30,1
28-Abr-99	97	41,09	0,97	0,86	3840	133	3,945	96,5%	411	38,3
30-Abr-99	99	41,31	0,97	0,87	3902	144	4,030	96,3%	446	29,7
3-Mai-99	102	41,20	0,97		4155	208	4,280	95,0%	462	46,8
<b>Média</b>		<b>40,55</b>	<b>0,99</b>	<b>0,91</b>		<b>161,67</b>	<b>4,34</b>	<b>95,9%</b>	<b>439,44</b>	<b>38,25</b>
<b>Desvio Padrão</b>		<b>1,58</b>	<b>0,04</b>	<b>0,07</b>		<b>33,07</b>	<b>0,23</b>	<b>0,01</b>	<b>21,46</b>	<b>6,99</b>
<b>Desvio Padrão (%)</b>		<b>3,91</b>	<b>3,77</b>	<b>7,59</b>		<b>20,46</b>	<b>5,33</b>	<b>0,71</b>	<b>4,88</b>	<b>18,29</b>
<b>Interv. de confiança</b>		<b>0,71</b>	<b>0,02</b>	<b>0,04</b>		<b>37,42</b>	<b>0,13</b>	<b>0,01</b>	<b>24,28</b>	<b>7,91</b>
<b>Novo caudal = 3/2 Q</b>										
5-Mai-99	104	59,33	0,67	0,90	4335	291	6,430	93,3%	720	110,0
7-Mai-99	106	59,29	0,67						541	110,6
10-Mai-99	109	59,02	0,68						593	70,7
12-Mai-99	111	59,52	0,67						611	65,8
14-Mai-99	113	60,40	0,66	0,84	3676	193	5,551	94,7%	527	50,8
17-Mai-99	116	60,89	0,66			294			675	88,2
19-Mai-99	118	60,68	0,66		3824	216	5,801	94,4%	840	98,3
21-Mai-99	120	60,56	0,66	0,92	4418	179	6,689	95,9%	907	24,7
24-Mai-99	123	60,83	0,66		4400	139	6,691	96,8%	940	20,3
26-Mai-99	125	60,24	0,66		3740	219	5,632	94,1%	810	73,6
28-Mai-99	127	60,33	0,66	0,91					1150	20,0
31-Mai-99	130	60,74	0,66		3500	198	5,315	94,3%	890	48,2
2-Jun-99	132	60,73	0,66		3640	269	5,526	92,6%	690	68,1
4-Jun-99	134	59,46	0,67	0,93	4208	307	6,255	92,7%	813	60,5
7-Jun-99	137	58,52	0,68						840	171,1
9-Jun-99	139	58,64	0,68						630	80,0
<b>Média</b>					<b>4130,35</b>	<b>230,50</b>	<b>5,99</b>	<b>94,3%</b>	<b>761,10</b>	<b>72,56</b>
<b>Desvio Padrão</b>					<b>304,63</b>	<b>53,72</b>	<b>0,50</b>	<b>0,01</b>	<b>162,77</b>	<b>37,58</b>
<b>Desvio Padrão (%)</b>					<b>7,38</b>	<b>23,31</b>	<b>8,39</b>	<b>1,41</b>	<b>21,39</b>	<b>51,79</b>
<b>Interv. de confiança</b>					<b>117,10</b>	<b>33,29</b>	<b>0,33</b>	<b>0,01</b>	<b>79,76</b>	<b>18,41</b>
<b>Quintuplicação do CQOin (Choque Orgânico)</b>										
10/6 11:00	140	59,23	0,68		17274	272	25,576	98,4%	867	85,2
10/6 15:00	140	59,23	0,68		23541	1605	34,855	93,2%	1610	431,0
10/6 22:00	140	59,23	0,68		21570	608	31,937	97,2%	1587	461,9
11/6 12:00	141	58,61	0,68	0,88	17468	661	25,595	96,2%		
11/6 19:30	141	58,61	0,68	0,88	18508	828	27,119	95,5%		893,0
12/6 12:00	142	59,10	0,68		18264	3170	26,985	82,6%	3973	1919,5
13/6 01:30	143	60,01	0,67		17067	3429	25,605	79,9%	3843	2335,6
13/6 19:00	143	60,01	0,67		22667	5333	34,006	76,5%	4410	3347,9
14/6 10:00	144	57,14	0,70		3292	5598				4570,8
<b>Média</b>							<b>28,96</b>			
<b>Desvio Padrão</b>							<b>3,71</b>			
<b>Desvio Padrão (%)</b>							<b>12,83</b>			
<b>Interv. de confiança</b>							<b>2,57</b>			
<b>Regresso às condições pré-choque</b>										
16/6 12:00	146	56,57	0,71		3127	2182	4,422	30,2%	1900	1251,1
18/6 17:00	148	60,35	0,66	0,87	4242	1305	6,400	69,2%	1297	940,1
21-Jun-99	151				3327	432		87,0%	1173	368,5
23-Jun-99	153	60,31	0,66		3888	717	5,862	81,6%	1160	232,9
25-Jun-99	155	63,31	0,63	0,84	2254	486	3,568	78,4%		154,6
29-Jun-99	159	60,02	0,67		3092	175	4,640	94,3%	597	37,7
2-Jul-99	162	60,91	0,66	0,86	3303	270	5,030	91,8%	793	162,1
5-Jul-99	165	64,02	0,62		4584	128	7,337	97,2%	630	42,6
7-Jul-99	167	60,64	0,66		1807	228	2,739	87,4%	667	153,7
9-Jul-99	169	60,73	0,66	0,85	3246	274	4,928	91,6%	793	102,6
12-Jul-99	172				1638	151			567	44,9
16-Jul-99	176	63,96	0,63		4835	367	7,731	92,4%	1193	239,1

**Tabela B.1** (Continuação)

Data	Tempo (dias)	Caudal (L/dia)	TRH (dias)	Factor de Recirc.	Cin (mgO <sub>2</sub> /L)	Cout sol. (mgO <sub>2</sub> /L)	BV apl (kgCQO/m <sup>3</sup> .dia)	E sol. (%)	SV à saída (mg/L)	AGV à saída (mgCQO/L)
19-Jul-99	179	61,48	0,65		3942	160	6,059	95,9%	973	230,4
21-Jul-99	181	61,59	0,65		3953	283	6,087	92,8%	570	131,5
23-Jul-99	183	61,48	0,65	0,87	3276	187	5,035	94,3%	510	26,9
27-Jul-99	187	61,22	0,65		3832	197	5,865	94,9%	880	94,7
30-Jul-99	190	61,54	0,65		3759	114	5,783	97,0%	940	34,8
4-Ago-99	195	61,32	0,65	0,84	3911	169	5,996	95,7%	890	59,7
11-Ago-99	202	60,11	0,67	0,85	5574	180	8,376	96,8%	1220	63,7
20-Ago-99	211	61,21	0,65	0,82	4138	220	6,332	94,7%	660	70,5
26-Ago-99	217	61,24	0,65		4025	181	6,162	95,5%	490	103,5
1-Set-99	223	61,60	0,65	0,86	4793	146	7,381	97,0%	1070	71,3
6-Set-99	228	61,96	0,65	0,83	4771	252	7,390	94,7%	1050	106,3
<b>Média</b>		<b>60,35</b>	<b>0,66</b>	<b>0,87</b>		<b>204,56</b>	<b>5,86</b>	<b>94,3%</b>	<b>805,19</b>	<b>98,67</b>
<b>Desvio Padrão</b>		<b>1,46</b>	<b>0,02</b>	<b>0,03</b>		<b>62,67</b>	<b>1,35</b>	<b>0,02</b>	<b>226,74</b>	<b>61,73</b>
<b>Desvio Padrão (%)</b>		<b>2,42</b>	<b>2,41</b>	<b>3,67</b>		<b>30,64</b>	<b>23,00</b>	<b>2,60</b>	<b>28,16</b>	<b>62,56</b>
<b>Interv. de confiança</b>		<b>0,42</b>	<b>0,00</b>	<b>0,02</b>		<b>28,95</b>	<b>0,58</b>	<b>0,01</b>	<b>104,75</b>	<b>28,52</b>
<b>Quintuplicação do Q (Choque Hidráulico)</b>										
08-09 11:00	230	275,19	0,15		4482	239	30,835	94,7%	1340	41,6
08-09 15:30	230	275,19	0,15		3464	514	23,831	85,2%	1630	218,0
08-09 20:00	230	275,19	0,15		3617	877	24,884	75,8%	1390	318,4
09-09 11:00	231	274,89	0,15	0,19	3757	932	25,819	75,2%	1500	709,8
10-09 14:00	232	277,15	0,14		3851	1032	26,683	73,2%	620	547,7
11-09 12:30	233	267,93	0,15	0,20	3885	413	26,023	89,4%	640	227,5
12-09 10:00	234				4354	396		90,9%		203,1
<b>Média</b>		<b>274,26</b>	<b>0,15</b>	<b>0,19</b>			<b>26,35</b>			
<b>Desvio Padrão</b>		<b>2,93</b>	<b>0,00</b>	<b>0,01</b>			<b>2,20</b>			
<b>Desvio Padrão (%)</b>		<b>1,07</b>	<b>1,08</b>	<b>2,62</b>			<b>8,36</b>			
<b>Interv. de confiança</b>		<b>2,34</b>	<b>0,00</b>	<b>0,01</b>			<b>1,76</b>			
<b>Regresso às condições pré-choque</b>										
13-Set-99	235	60,87	0,66		3810	114	5,798	97,0%	660	70,5
14-Set-99	236				3716	249		93,3%		86,0
15/9 10:00	237	62,92	0,64	0,81	4223	335	6,643	92,1%	1060	126,5
22/9 15:30	244	57,79	0,69		4531	217	6,546	95,2%	600	84,3
29-Set-99	251	57,94	0,69		3631	124	5,260	96,6%	790	84,8
08-Out-99	260	61,48	0,65	1,01	3429	248	5,270	92,8%	730	151,9
13-Out-90	265	62,70	0,64		3529	339	5,532	90,4%	790	186,7
20-Out-99	272	58,39	0,69	1,07	3660	262	5,343	92,8%	740	86,2
27-Out-99	279	53,86	0,74		4128	132	5,558	96,8%	720	30,8
03-Nov-99	286	52,88	0,76		4261	286	5,633	93,3%	340	0,0
<b>Média</b>		<b>58,76</b>	<b>0,68</b>	<b>0,96</b>	<b>3791,13</b>	<b>230,60</b>	<b>5,73</b>	<b>94,0%</b>	<b>714,44</b>	<b>90,77</b>
<b>Desvio Padrão</b>		<b>3,42</b>	<b>0,04</b>	<b>0,11</b>	<b>749,30</b>	<b>78,87</b>	<b>0,49</b>	<b>0,02</b>	<b>178,89</b>	<b>51,57</b>
<b>Desvio Padrão (%)</b>		<b>5,81</b>	<b>5,99</b>	<b>11,69</b>	<b>19,76</b>	<b>34,20</b>	<b>8,56</b>	<b>2,27</b>	<b>25,04</b>	<b>56,81</b>
<b>Interv. de confiança</b>		<b>2,23</b>	<b>0,03</b>	<b>0,13</b>	<b>232,21</b>	<b>48,89</b>	<b>0,32</b>	<b>0,01</b>	<b>116,87</b>	<b>31,96</b>

**Tabela B.2** Concentração de AGV à saída do digestor.

Tempo de operação (dias)	Lático (mg/L)	Fórmico (mg/L)	Acético (mg/L)	Propiónico (mg/L)	iso-Butírico (mg/L)	n-Butírico (mg/L)
8	0,0	0,0	26,9	0,0	0,0	0,0
11	0,0	0,0	15,4	0,0	0,0	0,0
13	0,0	0,0	32,9	0,0	0,0	0,0
15	0,0	0,0	20,7	0,0	0,0	0,0
18	0,0	0,0	68,1	27,5	0,0	0,0
20	0,0	0,0	63,4	28,1	0,0	0,0
22	0,0	0,0	54,4	23,6	0,0	0,0
25	11,8	0,0	33,0	0,0	0,0	0,0
27	27,5	0,0	28,3	0,0	0,0	0,0
29	0,0	0,0	43,5	26,8	0,0	0,0
32	11,8	0,0	36,5	29,1	0,0	0,0
34	11,7	0,0	26,4	18,1	0,0	0,0
36	0,0	0,0	74,2	49,9	0,0	0,0
39	0,0	0,0	56,1	33,9	0,0	0,0
41	0,0	0,0	37,5	0,0	0,0	0,0
42	0,0	0,0	27,9	0,0	0,0	0,0
43	13,8	0,0	91,6	48,0	0,0	0,0
46	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
48	0,0	0,0	60,3	39,6	0,0	0,0
50	0,0	0,0	43,0	17,3	0,0	0,0
53	0,0	0,0	39,5	18,0	0,0	0,0
55	0,0	0,0	72,9	44,0	0,0	0,0
57	0,0	0,0	68,9	35,2	0,0	0,0
60	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
62	0,0	0,0	56,8	25,7	0,0	0,0
64	0,0	0,0	68,4	27,5	0,0	0,0
67	10,7	0,0	53,3	36,8	0,0	0,0
70	10,4	0,0	60,8	36,4	0,0	0,0
74	0,0	0,0	64,2	0,0	0,0	0,0
76	0,0	0,0	58,8	37,0	0,0	0,0
78	11,5	0,0	47,3	31,8	0,0	0,0
81	0,0	0,0	60,5	32,9	0,0	0,0
83	0,0	0,0	85,8	45,3	0,0	0,0
85	0,0	0,0	27,4	17,1	0,0	0,0
88	16,3	0,0	38,1	32,7	0,0	0,0
90	0,0	0,0	40,9	21,5	0,0	0,0
92	0,0	0,0	30,1	0,0	0,0	0,0
97	0,0	0,0	38,3	0,0	0,0	0,0
99	0,0	0,0	29,7	0,0	0,0	0,0
102	0,0	0,0	46,8	0,0	0,0	0,0
104	0,0	0,0	84,0	26,1	0,0	0,0
106	10,4	0,0	67,9	30,5	1,8	0,0
109	0,0	0,0	55,0	15,6	0,0	0,0
111	0,0	0,0	38,8	0,0	27,0	0,0
113	0,0	0,0	50,8	0,0	0,0	0,0
116	0,0	0,0	65,6	22,6	0,0	0,0
118	0,0	0,0	69,2	29,1	0,0	0,0
120	0,0	0,0	24,7	0,0	0,0	0,0
123	0,0	0,0	20,3	0,0	0,0	0,0
125	0,0	0,0	57,0	16,7	0,0	0,0
127	0,0	0,0	20,0	0,0	0,0	0,0
130	0,0	0,0	48,2	0,0	0,0	0,0
132	0,0	0,0	68,1	0,0	0,0	0,0
134	0,0	0,0	60,5	0,0	0,0	0,0
137	0,0	0,0	118,2	52,7	0,1	0,0
139	0,0	0,0	62,6	17,4	0,0	0,0
140	0,0	0,0	67,1	18,1	0,0	0,0
140	0,0	0,0	285,7	112,1	4,0	29,2
140	0,0	0,0	311,3	121,6	6,9	22,2
141	0,0	0,0	569,8	245,0	31,6	46,6
142	0,0	0,0	1248,2	518,6	70,3	82,3

**Tabela B.2** (Continuação)

<b>Tempo de operação (dias)</b>	<b>Lático (mg/L)</b>	<b>Fórmico (mg/L)</b>	<b>Acético (mg/L)</b>	<b>Propiónico (mg/L)</b>	<b>iso-Butírico (mg/L)</b>	<b>n-Butírico (mg/L)</b>
143	15,0	0,0	1447,6	609,7	92,2	171,1
143	32,8	3,5	1968,9	747,4	107,3	488,1
144	20,9	0,0	2523,2	1073,3	142,7	810,6
144	0,0	0,0	2107,4	799,5	167,0	1016,8
146	0,0	0,0	553,3	372,1	68,5	257,1
148	0,0	0,0	332,4	146,2	4,0	457,4
151	0,0	0,0	265,5	100,2	2,8	0,0
153	0,0	0,0	184,4	48,5	0,0	0,0
155	0,0	0,0	126,7	27,8	0,0	0,0
159	0,0	0,0	37,7	0,0	0,0	0,0
162	0,0	0,0	129,2	32,9	0,0	0,0
165	0,0	0,0	42,6	0,0	0,0	0,0
167	0,0	0,0	105,0	48,7	0,0	0,0
169	0,0	0,0	86,1	16,5	0,0	0,0
172	0,0	0,0	44,9	0,0	0,0	0,0
176	44,2	0,0	85,4	38,2	39,1	32,2
179	0,0	0,0	148,4	82,0	0,0	0,0
181	0,0	0,0	107,2	24,3	0,0	0,0
183	0,0	0,0	26,9	0,0	0,0	0,0
187	0,0	0,0	69,8	25,0	0,0	0,0
190	0,0	0,0	34,8	0,0	0,0	0,0
195	0,0	0,0	59,7	0,0	0,0	0,0
202	0,0	0,0	63,7	0,0	0,0	0,0
211	0,0	0,0	47,4	23,1	0,0	0,0
217	8,8	5,2	54,7	12,6	0,0	22,2
223	0,0	0,0	46,5	24,8	0,0	0,0
228	0,0	0,0	70,2	36,0	0,0	0,0
230	0,0	0,0	30,0	11,5	0,0	0,0
230	6,9	0,0	132,6	48,8	0,0	29,8
230	7,3	0,0	173,3	86,5	0,0	51,3
231	10,2	3,8	219,5	265,8	28,3	182,1
232	5,2	3,3	186,6	199,6	20,4	132,6
233	13,5	2,5	90,0	76,9	3,5	41,2
234	0,0	0,0	97,7	74,0	2,8	28,5
235	0,0	0,0	48,6	21,9	0,0	0,0
236	0,0	0,0	55,7	30,3	0,0	0,0
237	0,0	0,0	87,5	39,0	0,0	0,0
244	0,0	0,0	67,8	16,5	0,0	0,0
251	0,0	0,0	64,8	20,0	0,0	0,0
260	0,0	2,5	95,2	54,2	0,0	0,0
265	0,0	0,0	129,4	57,4	0,0	0,0
272	0,0	0,0	59,0	27,1	0,0	0,0
279	0,0	0,0	30,8	0,0	0,0	0,0
286	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0



**Tabela B.3** Actividade metanogénica específica da biomassa oclusa, determinada durante e após o choque orgânico.

Data	Tempo (horas)	Actividade metanogénica específica (mL CH <sub>4</sub> @PTN/gSV.dia)				
		Acetato	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	Propionato	Butirato	Etanol
8-Jun-99	0	408,8 ± 0.5	898,7 ± 25.6	184,3 ± 1.2	148,4 ± 4.5	217,4 ± 8.6
10-Jun-99	4	398,9 ± 5.7	710,0 ± 29.3	192,6 ± 5.1	103,2 ± 25.5	216,2 ± 7.9
10-Jun-99	11	359,8 ± 19.3	910,6 ± 33.1	109,8 ± 11.0	123,6 ± 24.7	266,7 ± 8.7
11-Jun-99	14	425,3 ± 25.9	1001,9 ± 40.2	128,9 ± 6.9	134,0 ± 3.3	316,3 ± 17.5
11-Jul-99	25	456,4 ± 17.8	901,2 ± 3.6	86,2 ± 5.1	102,4 ± 5.1	267,2 ± 4.6
11-Jul-99	32,5	385,9 ± 25.5	761,2 ± 26.4	85,7 ± 3.6	96,7 ± 5.3	279,1 ± 3.5
12-Jul-99	49	486,5 ± 29.4	401,0 ± 19.3	154,1 ± 5.6	92,6 ± 3.1	255,7 ± 38.6
13-Jun-99	62,5	255,5 ± 11.4	541,2 ± 25.7	26,0 ± 4.8	6,9 ± 1.2	204,1 ± 7.4
13-Jun-99	80	219,6 ± 10.0	537,4 ± 32.7	24,1 ± 2.9	0,0 ± 5.8	264,5 ± 24.1
14-Jun-99	95	52,4 ± 6.5	488,1 ± 16.9	0,0 ± 2.2	0,0 ± 4.3	108,2 ± 10.3
16-Jun-99	145	273,7 ± 4.8	709,3 ± 58.2	37,7 ± 4.0	0,0 ± 4.2	178,8 ± 3.9
15-Jul-99	840	475,7 ± 18.1	109,5 ± 0.3	-	-	-

**Tabela B.4** Actividade metanogénica específica da biomassa oclusa, determinada durante e após o choque hidráulico.

Data	Tempo (horas)	Actividade metanogénica específica (mL CH <sub>4</sub> @PTN/gSV.dia)				
		Acetato	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	Propionato	Butirato	Etanol
8-Set-99	0	573,4 ± 58.9	493,2 ± 44.8	59,8 ± 5.2	64,6 ± 5.8	146,4 ± 16.9
8-Set-99	4,5	535,9 ± 50.4	551,4 ± 53.0	43,6 ± 10.4	53,3 ± 11.0	129,9 ± 11.5
8-Set-99	9	421,0 ± 57.6	466,2 ± 27.9	48,5 ± 4.2	72,5 ± 18.4	223,1 ± 38.6
9-Set-99	24	517,4 ± 30.7	478,7 ± 40.7	102,3 ± 4.5	109,3 ± 2.5	311,5 ± 59.6
10-Set-99	51	405,3 ± 10.4	575,6 ± 48.2	42,0 ± 10.9	17,3 ± 4.0	230,1 ± 11.8
11-Set-99	73,5	421,9 ± 29.1	478,8 ± 3.9	67,1 ± 2.2	65,8 ± 4.2	274,8 ± 9.5
12-Set-99	95	247,8 ± 22.1	689,6 ± 48.5	7,1 ± 10.6	12,7 ± 11.0	264,0 ± 17.7
15-Set-99	167	449,6 ± 19.7	928,6 ± 56.6	105,8 ± 6.1	86,7 ± 3.4	344,6 ± 48.6
22-Set-99	340,5	429,4 ± 21.3	722,8 ± 8.1	67,7 ± 3.0	50,3 ± 2.3	207,7 ± 19.4
15-Out-99	892,5	508,1 ± 30.7	891,7 ± 30.2	98,2 ± 5.5	125,5 ± 6.7	325,2 ± 28.1

**Tabela B.5** Produção específica máxima de metano e taxa inicial de conversão do substrato residual, determinadas durante e após o choque orgânico.

Data	Tempo (horas)	Produção específica máxima de metano (mgCQO-CH <sub>4</sub> /gSV)	Intervalo de confiança	Taxa inicial de conversão do substrato residual (mgCQO-CH <sub>4</sub> /gSV.dia)	Intervalo de confiança
8-Jun-99	0	58,4	2,8	23,1	0,8
10-Jun-99	4	80,2	2,8	32,9	2,5
10-Jun-99	11	85,5	17,4	84,0	1,7
11-Jun-99	14	91,7	2,1	76,2	2,4
11-Jun-99	25	126,2	5,6	68,6	1,4
11-Jun-99	32,5	140,1	7,3	99,9	4,1
12-Jun-99	49	58,4	2,0	33,6	2,5
13-Jun-99	62,5	200,9	4,8	85,7	0,9
13-Jun-99	80	305,4	10,1	114,5	1,4
14-Jun-99	95	448,7	14,6	87,73	2,54
16-Jun-99	145	463,8	25,6	106,14	5,07
15-Jul-99	840	112,6	12,6	17,5	3,4

**Tabela B.6** Produção específica máxima de metano e taxa inicial de conversão do substrato residual, determinadas durante e após o choque hidráulico.

Data	Tempo (horas)	Produção específica máxima de metano (mgCQO-CH <sub>4</sub> /gSV)	Intervalo de confiança	Taxa inicial de conversão do substrato residual (mgCQO-CH <sub>4</sub> /gSV.dia)	Intervalo de confiança
8-Set-99	0	144,6	17,4	35,5	4,3
8-Set-99	4,5	98,7	11,2	25,03	2,7
8-Set-99	9	103,0	3,0	33,9	1,0
9-Set-99	24	112,7	3,7	38,6	2,6
10-Set-99	51	214,2	9,2	82,4	2,9
11-Set-99	73,5	123,4	5,7	58,0	1,0
12-Set-99	95	262,7	15,3	168,3	13,7
15-Set-99	167	83,8	8,2	29,2	4,4
22-Set-99	340,5	104,2	19,3	29,5	2,4
15-Out-99	892,5	106,6	1,9	36,68	4,25