

# CONTRIBUIÇÃO PARA A CARACTERIZAÇÃO DA ESTRUTURA DA BIOMASSA EM REACTORES ANAERÓBIOS DE FLUXO ASCENDENTE (U.A.S.B.): INTERACÇÕES ELÉCTRICAS, POLISSACARÍDEOS E PROTEINAS

A.G. BRITO, A.C. RODRIGUES, L.F. MELO<sup>1</sup>

## RESUMO

Esta comunicação apresenta algumas propriedades da biomassa determinadas durante o período de arranque de um reactor anaeróbio de fluxo ascendente, tipo UASB, alimentado com um efluente sintético possuindo uma concentração de substrato relativamente baixa, inferior a 1500 mgCQO/l. Entre o início e o fim de operação do reactor, a mobilidade electroforética e o potencial zeta da biomassa reduziram os seus valores de -38 mV e -2.77  $\mu$ s.V.cm para -34 mV e -2.09  $\mu$ s.V.cm. No que concerne ao teor em polissacarídeos, após um aumento inicial, o seu valor diminuiu, aparentemente em consonância com o aumento de ácidos voláteis e a redução de carboidratos na alimentação. O valor final foi cerca de 50% inferior ao do inóculo, 85.1 mg/gSVT. O teor de proteínas no final do período experimental também foi inferior ao valor do inóculo de biomassa. Os mesmos parâmetros foram determinados em grânulos de um UASB industrial, por forma a servirem de valores de referência. Este conjunto de dados permitiu observar nas propriedades determinadas um padrão de evolução no sentido da formação de grânulos a partir de biomassa difusa.

**PALAVRAS-CHAVE:** Digestão anaeróbia; tratamento de efluentes líquidos; agregação; reactores UASB; interacções eléctricas; biopolímeros.

## 1. INTRODUÇÃO E OBJECTIVOS

No conjunto das tecnologias disponíveis para o tratamento de efluentes líquidos, os processos anaeróbios possuem, em determinados casos, vantagens competitivas. Em particular, os reactores de fluxo ascendente do tipo UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) tem demonstrado ser um sistema com uma elevada potencialidade de aplicação à escala real (Lettinga e Hulshoff Pol, 1992). A sua instalação é bastante representativa em

---

<sup>1</sup> Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho  
Largo do Paço, P-4709 Braga Codex  
Email: agbrito@ci.uminho.pt; lmelo@ci.uminho.pt

indústrias com efluentes concentrados (valores de CQO superiores a 2000 mg/l), porquanto em efluentes com teores inferiores de CQO a sua implantação é ainda relativamente incipiente. Em geral, as condições de operação do UASB tendem a induzir a formação de agregados microbianos, correntemente designadas por “grânulos”, sem necessidade de meio de suporte auxiliar (Hulshoff Pol *et al.*, 1988).

O arranque de reactores UASB pode ser efectuado a partir de um inóculo não estruturado em grânulos ou, preferencialmente, com base num granular. Esta última possibilidade é recomendada em substratos pouco concentrados, inferiores a 1500-2000 mgCQO/l. Esta recomendação deve-se, presumivelmente, ao facto da actividade da biomassa ser menor a essas concentrações, de acordo com uma cinética típica de Monod. Contudo, a aquisição de um inóculo de grânulos pode ser bastante onerosa, sobretudo se não existir nenhum sistema próximo apto a fornecer grânulos. Os estudos efectuados por Hulshoff Pol *et al.*, 1983, e Hulshoff Pol *et al.*, 1988, demonstraram que um protocolo adequado para a granulação consiste na aplicação de uma pressão selectiva, a ser exercida pelo conjunto da velocidade ascensional do liquido e do gás. Esta pressão, coadjuvada pela manutenção de concentrações de acetato inferiores a 250 mg/l, tende a lixiviar a biomassa dispersa e a favorecer o crescimento de agregados de bactérias, em particular *Methanotrix sp.*

O objectivo do presente trabalho foi o de contribuir para o estudo da formação de grânulos, admitindo que as alterações de estrutura de biomassa associam modificações nas interacções líquido-sólido, a exemplo de processos de agregação comuns em sistemas de coagulação-floculação, Weber, 1972. Neste sentido, a presente comunicação apresenta os dados monitorizados referentes a mobilidade electroforética e potencial zeta, polissacarídeos e proteínas. Estes dados foram obtidos durante a operação de um reactor UASB, inoculado com biomassa proveniente de um digestor anaeróbio e alimentado com substrato sintético pouco concentrado, inferior a 1500 mgCQO/l. Por forma a obter valores de referência, estas propriedades foram igualmente avaliadas em grânulos metanogénicos, provenientes de um reactor UASB operando à escala real.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **INSTALAÇÃO EXPERIMENTAL**

O reactor foi construído em vidro acrílico com um volume de 2.06 l. O reactor operou a 35°C, sendo a temperatura mantida por uma bomba de recirculação Lauda T. A alimentação foi efectuada por uma bomba peristáltica Watson-Marlow 101 e a recirculação por uma bomba Watson Marlow S302.

## **INÓCULO DE BIOMASSA**

O inóculo de biomassa proveio de um digestor anaeróbio convencional, de mistura completa, utilizado no tratamento das lamas purgadas de um processo de lamas activadas (Câmara Municipal da Maia). A teor de sólidos voláteis nas lamas era de 8.6 kgSV/m<sup>3</sup>. O volume inicial de lamas foi relativamente baixo, aproximadamente 1/5 do volume do reactor. Os grânulos que foram também objecto de caracterização provieram de um UASB operando em Eerbeek, Países Baixos, em que efluente é maioritariamente constituído por ácidos gordos voláteis, tendo sido gentilmente cedido pelos Profs. G. Lettinga e Hulshoff Pol, Universidade de Wageningen. Esta biomassa foi mantida refrigerada a 6°C, durante cerca de um ano.

## **SUBSTRATO**

Na primeira fase (cerca de três meses) o reactor foi alimentado com uma mistura constituída por glucose, acetato e propionato, numa proporção de 95% de glucose-COD e 5% de ácidos voláteis-COD (75% de acetato e 25% de propionato), adicionando-se 2 ml de macronutrientes e 0,03 ml de micronutrientes por litro. Na segunda fase posterior, procurou-se seleccionar as bactérias metanogénicas, em detrimento das bactérias acidogénicas, sendo a alimentação constituída por de 50% de glucose-COD e 50% de ácidos voláteis-COD (75% de acetato e 25% de propionato). Ainda nesta fase, a adição da solução de micronutrientes foi reforçada para 0,1 ml/l. A solução de macronutrientes possuiu a seguinte composição: 174 g·l<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>Cl, 28.3 g·l<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 28.3 g·l<sup>-1</sup> de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 25 g·l<sup>-1</sup> de MgCl<sub>2</sub>, 45 g·l<sup>-1</sup> de KCl, 3 g·l<sup>-1</sup> de extracto de levedura. A solução de micronutrientes foi a seguinte: 2 g·l<sup>-1</sup> de FeCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.05 g·l<sup>-1</sup> de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.05 g·l<sup>-1</sup> de ZnCl<sub>2</sub>, 0.038 g·l<sup>-1</sup> de CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.5 g·l<sup>-1</sup> de MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0.05 g·l<sup>-1</sup> de (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0.09 g·l<sup>-1</sup> de AlCl<sub>3</sub>, 2 g·l<sup>-1</sup> de CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.092 g·l<sup>-1</sup> de NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.164 g·l<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O, 1 g·l<sup>-1</sup> de EDTA, 0.2 g·l<sup>-1</sup> de resazurina e 1 ml·l<sup>-1</sup> de HCL 37%. A alimentação foi previamente neutralizada a pH=7.

## **MÉTODOS ANALÍTICOS**

### **i) Carência Química de Oxigénio (CQO) e Sólidos.**

A análise de CQO e sólidos foi realizada segundo o Standard Methods, 1989.

### **ii) Polissacarídeos.**

A determinação de polissacarídeos foi efectuada pelo método do fenol-ácido sulfúrico, Dubois *et al.*, 1956. O estágio preliminar de extracção foi efectuada num almofariz.

### **iii) Proteínas.**

A determinação de proteínas foi efectuada pelo método do reagente de Folin, Lowry *et al.*, 1951.

### **iv) Mobilidade electroforética e potencial zeta.**

A mobilidade electroforética e o potencial zeta foram medidas numa célula de micro-electroforese, Zetameter Inc. 3.0+. Efecturam-se 20 medições por conjunto de análise, a pH 7.0 e a 300 V.

### **PROCEDIMENTO OPERACIONAL**

A alimentação foi preparada de modo a possuir uma concentração inicial de 1000-1500 mg de CQO/l, procedendo-se ao aumento da carga orgânica de 0.2 kgCOD/m<sup>3</sup>.dia até 3.1 kgCOD/m<sup>3</sup>.dia, por diminuição do tempo de retenção hidráulico. O protocolo de operação seguiu no essencial o modo operacional devido a Hulshoff Pol *et al*, 1983, e já referido na Introdução. Numa primeira fase da experiência procurou-se criar as condições ambientais e ecológicas necessárias para o desenvolvimento do conjunto da comunidade trófica anaeróbia. Numa segunda fase procurou-se promover o enriquecimento em bactérias metanogénicas, aumentando a proporção de ácidos voláteis em detrimento do teor em glucose. O reactor foi operado com recirculação do efluente, por forma a aproximar a velocidade ascensional de valores entre 0.5-1m/h.

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Aspectos gerais**

Durante a fase inicial de operação, cerca de três meses de operação, verificou-se uma lixiviação parcial de biomassa e sólidos difusos. A evolução da estrutura da biomassa no interior do reactor foi, neste período, lenta mas gradual. Ocorreu uma progressiva modificação no aspecto do leito de lamas, observando-se a formação de agregados, ainda que com uma estrutura pouco consistente. A composição da alimentação parece ter desempenhado um papel no processo de agregação. Com efeito, após a fase inicial, a alteração na proporção relativas das fonte de carbono na alimentação (glucose e ácidos voláteis), bem como o reforço da concentração de micronutrientes, parecem ter potenciado uma aceleração do processo de granulação. As dimensões e a densidade aparente dos agregados foram progressivamente aumentando, durante o mês referente à segunda fase da experiência. Este comportamento pode ser explicado considerando que nesta fase se procedeu a um enriquecimento de bactérias acetotróficas do tipo filamentoso, como *Methanotrix sp.*, bactérias que marcam decisivamente as estruturas granulares, Hulshoff Pol *et al.*, 1983, Hulshoff Pol *et al.*, 1988, Fang *et al.*, 1994. Esta evolução foi igualmente comprovada por observações efectuadas durante o presente estudo através de microscopia electrónica de varrimento.

### **Mobilidade electroforética e potencial zeta**

O valor mais elevado de mobilidade electroforética correspondeu aos microorganismos presentes no inóculo, -2.77µ/s.V.cm. Os microorganismos

existentes nos agregados do reactor e do UASB industrial apresentam valores inferiores, -2.09 e -1.95  $\mu\text{s.V.cm}$ , respectivamente. O desvio padrão das medições foi inferior a 0.158  $\mu\text{s.V.cm}$

As Figura 1 apresenta os valores de potencial zeta, sendo os valores medidos no inóculo inicial e no fim do periodo de operação, bem como nos grânulos provenientes do UASB industrial.

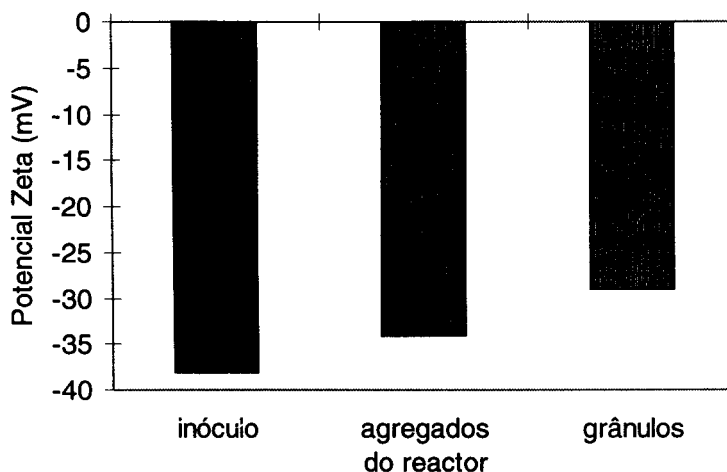


Fig. 1 - Valores do potencial zeta.

Os resultados apresentados nas Figuras 1 ilustram uma alteração nos valores obtidos para o potencial zeta, comparando os valores iniciais do inóculo, -38 mV com os valores finais dos agregados no UASB, -34 mV. Estes valores indicam uma tendência de evolução, em que os valores dos grânulos do UASB industrial podem ser genericamente considerados os valores objectivo, -28 mV. Esta tendência está de acordo com os dados determinados por Alibhai e Forster, 1986. Estes autores indicam valores de potencial zeta em grânulos numa gama entre -14.2 e e -24.2 mV e, para um outro tipo de biomassa, -30 mV.

A redução do potencial electrostático superficial indicia um aumento da possibilidade de agregação entre colóides, Weber, 1972. Em consequência, sendo o potencial zeta uma medida da potencial eléctrica na camada interior da camada difusa, pode entender-se que os microorganismos presentes no reactor, aquando das medições, possuíam uma carga superficial superior à das células que constituíam o inóculo. Em consequência, "*per si*", estes dados sugerem que com o decorrer do período experimental a repulsão inter-partículas diminuiu e, portanto, haverá uma maior facilidade de agregação.

## Biopolímeros

A Figura 3 apresenta os valores obtidos na determinação de proteínas e polissacarídeos das diversas estruturas de biomassa.

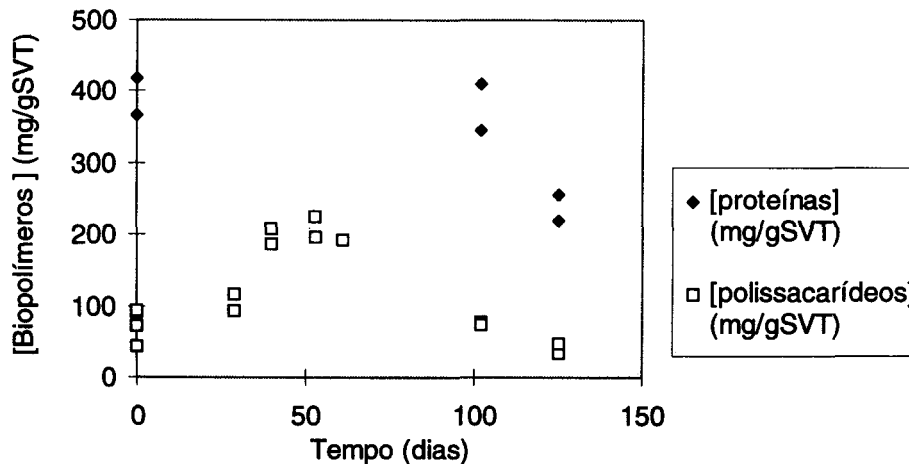


Fig 2 - Teor em proteínas e em polissacarídeos *versus* tempo.

A análise dos valores indicados na Figura 2, sugere a existência de uma resposta do teor em polissacarídeos face à variação na composição da alimentação. Efectivamente, o valor inicial em polissacarídeos aumenta de 85.1 mg/gSVT até um valor máximo de 211.0 mg/gSVT. No entanto, com a diminuição de carboidratos na alimentação e o aumento de ácidos voláteis, o teor em polissacarídeos reduz-se, atingindo-se no final da experiência valores significativamente inferiores aos do inóculo inicial, 41.5 mg/gSVT. Com diferentes processos de extracção do material polimérico de grânulos em efluentes de açucareiras das células, Dolfing *et al.*, 1985, determinaram um teor de polissacarídeos de 11-26 mg/gSVT e Grotenhuis *et al.*, 1991, 2.6 mg/gSVT. Os grânulos do UASB industrial analisados no presente estudo apresentavam valores de 4.6 mg/gSVT. Esta variação nos dados indicia a importância dos métodos de extracção utilizados nos valores absolutos obtidos (contabilização de polissacarídeos extra e intra-celulares) mas, muito provavelmente, também poderá reflectir características individuais próprias dos grânulos, resultantes do tipo de substrato e composição microbiológica.

No que concerne ao teor em proteínas, os dados obtidos demonstram a existência de um teor proteico menor no final da experiência. A um valor inicial médio de 391 mg/mgSVT correspondeu uma diminuição para 238 mg/mgSVT, embora longe ainda do valor determinado nos grânulos metanogénicos do reactor industrial, 18 mg/SVT. Dolfing *et al.*, 1985, determinou nos grânulos provenientes de efluentes de açucareiras um valor de proteínas de 50-58 mg/gSVT e Grotenhuis *et al.*, 1991, de 5.5 mg/gSVT.

As proteínas e polissacarídeos possuem superfícies hidratadas que geram efeitos adicionais de repulsão, Weber, 1972. A redução do teor de proteínas à superfície poderá ser favorável à agregação, através de uma diminuição do efeitos de solvatação, eventualmente acompanhado por outros efeitos positivos, como a diminuição de interações estéricas ou a formação de pontes poliméricas. No entanto, os dados obtidos são insuficientes para se retirarem conclusões sobre a magnitude das interações potencialmente actuantes.

Outros aspectos complementares poderão certamente existir, tomando ainda mais complexa esta questão. De Beer, 1995, determinou a composição em ácido urónico em diferentes agregados e refere que existe uma relação positiva entre a qualidade dos grânulos e a quantidade de polímeros extracelulares indicando, no entanto, a existência de um gradiente na distribuição de polímeros. Grânulos de boa qualidade possuiriam a maior parte dos polímeros à superfície, ao contrário de flocos pouco consistentes, onde se concentrariam no interior. Ainda segundo o mesmo autor, a existência de polímeros superficiais, hidrofílicos, tenderia a impedir a adsorção do gás e, portanto, a minimizar uma eventual flotação dos grânulos.

#### **4. CONCLUSÕES**

O conjunto de resultados obtidos neste estudo permitem concluir que a monitorização de potencial zeta, mobilidade electroforética, proteínas e polissacarídeos, podem contribuir para auxiliar o acompanhamento do processo de granulação. Os valores da mobilidade electroforética e do potencial zeta traduziram uma diminuição do potencial eléctrico dos grânulos relativamente ao medido na biomassa dispersa. O teor de proteínas e polissacarídeos determinado nos grânulos foi menor do que o determinado em biomassa não-agregada, redução essa que poderá associar a diminuição de efeitos de solvatação ou estéricos, bem como a formação de pontes poliméricas, factores positivos nas interações intra-partículas e tendentes a favorecer a agregação.

Em consequência, a estratégia de granulação baseada numa selecção e enriquecimento de bactérias metanogénicas filamentosas, promoveu a formação de agregados com propriedades diferentes das iniciais. Comprovou-se ainda a importância da composição da alimentação e que o processo de granulação se revela mais moroso no caso de efluentes diluídos. Efectivamente, apesar de alterações na estrutura da biomassa e da formação de agregados consistentes, o conjunto de informações obtidas revela que o processo de granulação não pode ser dado por terminado ao fim de cerca de 150 dias de operação do reactor.

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado pelo Programa Operacional PRAXIS XXI, Projecto 2/201/BIO/37/94. Os autores desejam agradecer a colaboração de M. Santos, Universidade do Minho, fundamental para a execução da instalação experimental.

## REFERÊNCIAS

- ALIBHAI, K.R.K., FORSTER, C.F., 1986. Physicochemical and biological characteristics of sludges. *Enzyme Microb. Technology*, **8**, 601-606.
- DeBEER, 1995 Granulation in UASB reactors. In: *Proceedings of the 3<sup>rd</sup> meeting of the HCMP network on Improved Application of Anaerobic Digestion Technology*, Ed. M. Bellouti and M. Mota, Braga.
- DOLFING J., GRIFFIOEN, A., NEERVEN, A.R.W., ZEVENHUIZEN, L.P., 1985. Chemical and bacteriological composition of granular methanogenic sludge. *Can. Journal of Microbiology*, **31**, 744-750.
- DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A., SMITH, F., 1956. Colorimetric method for determining sugars and related substances. *Anal. Chem.*, **28**, 350-356.
- FANG, H.H.P., CHUI, H.K., LI, Y.Y., 1992. Microbial structure and activity of UASB granules treating different wastewaters. *Water Science and Technology*, **25**, 7.
- GROOTENHUIS, J.T.C., SMIT, M., VAN LAMMEREN, A.A.M., STAMS, A.J.M., ZEHNDER, A.J.B., 1991. Localization and quantification of extracellular polymers in methanogenic granular sludge. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **36**, 115-119.
- HULSHOFF POL, L.W., ZEEW, W., VELZEBOER, C.T., LETTINGA, G., 1983. Granulation in UASB reactors. *Water Science and Technology*, **15**, 8, 291-304.
- HULSHOFF POL, L.W., HEIJNEKAMP, K., LETTINGA, G., 1988. The selection pressure as a driving force behind the granulation of anaerobic sludge, In: *Granular anaerobic sludge; microbiology and technology, Proceedings of the GASMAT-workshop*, Lunteren, Netherland, 25-27 October, 1987. Puduc Wageningen.
- LETTINGA, G., HULSHOFF POL, L.W., 1992. UASB-process design for various types of wastewaters. *Water Science and Technology*, **24**, 8, 87-108.
- LOWRY, O.H., ROSEBOURG, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. 1951. Protein measurements with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- WEBER W.J., 1972. *Physicochemical processes for water quality control*. Wiley-Interscience, New York. 621 pp.