

Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Ruben Miguel Ribeiro Gonçalves

**TRATAMENTO ANAERÓBIO TERMOFÍLICO
DE EFLUENTES RICOS EM ÁCIDOS GORDOS
DE CADEIA LONGA**



Universidade do Minho

Escola de Engenharia

Ruben Miguel Ribeiro Gonçalves

**TRATAMENTO ANAERÓBIO TERMOFÍLICO
DE EFLUENTES RICOS EM ÁCIDOS GORDOS
DE CADEIA LONGA**

Dissertação de Mestrado
Mestrado em Bioengenharia

Trabalho realizado sobre a orientação da
Doutora Diana Zita Machado de Sousa
e co-orientação da
Doutora Ana Júlia Viana Cavaleiro

outubro de 2013

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA DISSERTAÇÃO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE;

Universidade do Minho, ____/____/_____

Assinatura: _____

Agradecimentos

Quero expressar os meus sentimentos de gratidão...

À minha orientadora Diana Sousa, pelo apoio e orientação prestada ao longo de todo o projeto.

À minha co-orientadora Ana Júlia Cavaleiro, por todo o auxílio e acompanhamento que me prestou tanto a nível prático como teórico.

À professora Madalena Alves e à Ana Guedes pelos conselhos e apoio prestado em vários momentos.

A todos os meus colegas do grupo BRIDGE pelo excelente ambiente de trabalho proporcionado, assim como pelo apoio prestado quando necessário.

Aos meus pais, família e amigos que sempre me apoiaram em todos os momentos.

Este trabalho foi financiado por Fundos FEDER através do Programa Operacional Fatores de Competitividade – COMPETE e por Fundos Nacionais através da FCT Fundação para a Ciência e a Tecnologia no âmbito do projeto com referência FCOMP-01-0124-FEDER-014784.

TRATAMENTO ANAERÓBIO TERMOFÍLICO DE EFLUENTES RICOS EM ÁCIDOS GORDOS DE CADEIA LONGA

Resumo

A aplicação de sistemas anaeróbios termofílicos ao tratamento de efluentes ricos em lípidos e ácidos gordos de cadeia longa (AGCL) tem sido pouco explorada. A dificuldade de obtenção de inóculos termofílicos pode ser uma razão para este facto. Diminuição do tempo de retenção hidráulico, higienização das lamas e aplicação de elevadas cargas orgânicas são vantagens dos sistemas termofílicos. O presente trabalho teve como principal objetivo estudar a adaptação de biomassa anaeróbia mesofílica a condições termofílicas, para posterior tratamento de efluentes ricos em AGCL.

A adaptação da biomassa mesofílica foi efetuada em reator contínuo alimentado com leite magro à carga orgânica de $1 \text{ kg CQO m}^{-3} \text{ dia}^{-1}$. Após arranque a 37°C , a temperatura de operação foi aumentada gradualmente 5°C por semana até se atingir a temperatura de 55°C . Após a estabilização do reator testou-se o tratamento de um efluente sintético composto por uma mistura de leite magro e oleato de sódio (numa proporção de 50:50% da CQO). Foram realizados dois ciclos (contínuo/"batch"), utilizando-se uma carga orgânica aplicada de 10 e 20 $\text{kg CQO m}^{-3} \text{ dia}^{-1}$.

O desempenho do reator foi monitorizado durante 284 dias em termos de carência química de oxigénio (CQO) à entrada e à saída do sistema; ácidos gordos voláteis (AGV), sólidos e pH na corrente de saída; produção de metano e temperatura no interior do reator. Após introdução de oleato na alimentação, recolheram-se pontualmente amostras para análise de AGCL. Durante o período de adaptação às condições termofílicas recolheram-se amostras de biomassa em três momentos distintos ($t_0 = 0$, $t_1 = 78$ e $t_2 = 171$ dias), que foram caracterizadas em termos de atividade metanogénica específica (AME) em acetato e H_2/CO_2 , toxicidade do oleato na atividade metanogénica acetoclástica e capacidade de biodegradação do oleato.

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que é necessário um período de tempo relativamente longo (123 dias) para adaptação da biomassa mesofílica a condições termofílicas. Este tempo parece estar associado a uma adaptação da comunidade de microrganismos acetoclásticos, uma vez que houve diminuição e posterior recuperação da AME em acetato ao longo do tempo. A alimentação do reator com cargas elevadas de oleato levou à acumulação de AGV no sistema e consequente diminuição na produção de metano.

THERMOPHILIC ANAEROBIC TREATMENT OF LONG CHAIN FATTY ACIDS-RICH EFFLUENTS

Abstract

Anaerobic thermophilic treatment of wastewaters rich in lipids or long chain fatty acids (LCFA) is not fully exploited, which may be related with the difficulty to obtain a thermophilic inoculum. Decrease in hydraulic retention time, sludge hygienisation and application of high organic loads are advantages of thermophilic systems. In this study mesophilic anaerobic sludge was acclimatized to high temperature (55°C). Subsequently, a synthetic LCFA-rich effluent was treated alternating feeding and batch degradation phases, in order to optimize methane production.

Mesophilic biomass adaptation was performed in continuous bioreactor fed with skimmed milk at an organic load rate (OLR) of 1 kg COD m⁻³ day⁻¹. After startup at 37°C, the temperature was increased 5°C per week until 55°C. Treatment of a synthetic effluent, composed by a mixture of skimmed milk and sodium oleate (50:50% COD), was tested after stabilization of the system. Two cycles (continuous/batch) were performed applying an OLR of 10 and 20 kg COD m⁻³ day⁻¹.

Reactor performance was monitored through 284 days of operation in terms of chemical oxygen demand (COD) at the inlet and exit of the system; volatile fatty acids (VFA), pH and solids in the effluent; methane production and temperature inside the reactor. Samples of the reactor were collected periodically for LCFA analysis. During the period of thermophilic adaptation biomass samples were collected at three different times ($t_0 = 0$, $t_1 = 78$ and $t_2 = 171$ days) and characterized in terms of specific methanogenic activity (SMA) in acetate and H₂/CO₂, toxicity of oleate towards acetoclastic methanogens and oleate biodegradability.

The results of this study show that a relatively long time is necessary for mesophilic biomass adaptation to thermophilic conditions, in total 123 days. This period appears to be associated with adaptation of acetoclastic microorganisms, since there was a decrease and subsequent recovery of SMA in acetate over time. The reactor feeding with high oleate loads caused VFA accumulation in the system and a consequent decrease in methane production.

Índice

| | |
|---|-----------|
| Lista de Tabelas | IX |
| Lista de Figuras | X |
| Lista de Abreviaturas | XI |
| 1 – Introdução | 1 |
| 1.1 – Enquadramento e motivação | 1 |
| 1.2 - Processo de digestão anaeróbia | 2 |
| 1.3 - Digestão anaeróbia de lípidos | 4 |
| 1.3.1 – Degradação anaeróbia dos AGCL | 5 |
| 1.4 – Tratamento anaeróbio de efluentes ricos em lípidos | 6 |
| 1.5 – Digestão anaeróbia de efluentes ricos em lípidos sob condições termofílicas ... | 8 |
| 1.6 – Arranque de reatores termofílicos | 10 |
| 1.7 – Objetivos | 13 |
| 2 - Materiais e Métodos | 14 |
| 2.1 – Instalação experimental | 14 |
| 2.2 – Substrato | 15 |
| 2.3 - Modo de operação | 15 |
| 2.4 – Monitorização do sistema | 17 |
| 2.5 – Caracterização e amostragem da biomassa | 18 |
| 2.5.1 – Ensaio de atividade metanogénica | 19 |
| 2.5.2 – Ensaio de toxicidade do oleato sobre a atividade metanogénica acetoclástica..... | 20 |
| 2.5.3 – Ensaio de biodegradabilidade do oleato de sódio | 21 |

| | |
|---|-----------|
| 3 – Resultados e Discussão | 22 |
| 3.1 - Arranque do reator e adaptação da biomassa a condições termofílicas | 24 |
| 3.2 – Tratamento termofílico de efluente rico em oleato | 29 |
| 4 – Conclusões | 32 |
| 5 – Referências Bibliográficas | 33 |
| Anexo I | 38 |
| Anexo II | 40 |

Lista de Tabelas

Tabela 1.1 – Produção de biogás a partir de biomoléculas constituintes de resíduos industriais orgânicos (Li et al. 2002).

Tabela 1.2 – Termodinâmica de algumas reações de conversão anaeróbia de ácidos gordos (Thauer et al. 1977; Lalman, 2000).

Tabela 1.3 - Revisão de literatura – adaptação de biomassa mesofílica a condições termofílicas.

Tabela 2.1 – Condições operacionais aplicadas durante a experiência.

Tabela 3.1 – Valores médios das condições experimentais aplicadas e parâmetros de performance do reator nos vários períodos de operação.

Tabela 3.2 – Atividade metanogénica específica em acetato e H_2/CO_2 .

Tabela 3.3 – Rendimento de metano nos testes de biodegradabilidade do oleato.

Lista de Figuras

Figura 1.1 – Esquema ilustrativo do processo de digestão anaeróbia (adaptado de Gujer e Zehnder, 1983).

Figura 2.1 – (A) Representação esquemática do reator; (B) Imagem ilustrativa do reator.

Figura 3.1 – Evolução da carga orgânica aplicada e TRH ao longo do tempo de operação (1 - 9 representam os períodos de operação do reator).

Figura 3.2 – Evolução da temperatura no interior do reator e dados de operação durante a fase de arranque a adaptação da biomassa a condições termofílicas (1 - 4 representam os períodos de operação do reator).

Figura 3.3 – Produção específica de metano nos testes de toxicidade realizados nos tempos $t_0 = 0$ dias (a), $t_1 = 78$ dias (b) e $t_2 = 171$ dias (c). Os ensaios foram realizados na presença de 30 mM de acetato e diferentes concentrações de oleato de sódio; ensaio em branco – sem adição de acetato nem oleato; ensaio de controlo – 30 mM de acetato mas sem oleato.

Figura 3.4 – Parâmetros de performance do reator durante o tratamento termofílico de um efluente sintético rico em oleato de sódio (5 - 9 representam os períodos de operação do reator).

Figura 3.5 – Evolução da concentração de SSV na corrente de saída do reator, ao longo do tempo de operação. (1-9 representam os períodos de operação do reator).

Lista de Abreviaturas

| | |
|------|--|
| AGCL | Ácidos gordos de cadeia longa |
| AGV | Ácidos gordos voláteis |
| AME | Atividade metanogénica específica |
| CQO | Carência química de oxigénio |
| DGGE | Electroforese em gel de gradiente desnaturante |
| EGSB | Reator de manto de lamas de leito expandido |
| FOG | Óleos e gorduras |
| HPLC | Cromatografia líquida de alta eficiência |
| IASB | Reator anaeróbio de manto de lamas invertido |
| IC | Reator de recirculação interna |
| PTN | Condições normais de pressão e temperatura |
| SSV | Sólidos suspensos voláteis |
| SV | Sólidos voláteis |
| TRH | Tempo de retenção hidráulico |
| UASB | Reator anaeróbio de manto de lamas de fluxo ascendente |

1. Introdução

1.1 – Enquadramento e Motivação

Atualmente o desenvolvimento de novas tecnologias que visam a produção de energia representa uma prioridade de interesse mundial, nomeadamente de sistemas que permitam diminuir o impacto ambiental e económico produzido pela exploração de recursos energéticos não renováveis.

Neste contexto, a digestão anaeróbia de efluentes e resíduos com alto teor orgânico constitui uma alternativa viável uma vez que combina o tratamento dessas correntes com a produção de um vetor energia (biogás, mistura gasosa composta principalmente por metano e dióxido de carbono) (Nielsen e Ahring 2006). A utilização de resíduos industriais ricos em lípidos é particularmente interessante (Alves *et al.* 2009), uma vez que estes compostos apresentam um elevado potencial de produção de biogás quando comparado com outros substratos como proteínas ou hidratos de carbono (Tabela 1.1).

Tabela 1.1 – Produção de biogás a partir de biomoléculas constituintes de resíduos industriais orgânicos (Li *et al.* 2002).

| Componente | Reação | Biogás | % CH ₄ |
|----------------------------|--|-------------------------|-------------------|
| Lípidos | $C_{15}H_{90}O_6 + 24.5H_2O \rightarrow 34.75CH_4 + 15.25CO_2$ | 1.425 L g ⁻¹ | 69.5 |
| Hidratos de carbono | $(C_6H_{10}O_5) + nH_2O \rightarrow 3nCH_4 + 3nCO_2$ | 0.830 L g ⁻¹ | 50.0 |
| Proteínas | $C_{11}H_{24}O_5N_4 + 14.5H_2O \rightarrow 8.25CH_4 + 3.75CO_2 + 4NH_4^+ + 4HCO_3^-$ | 0.921 L g ⁻¹ | 68.8 |

Têm-se feito vários estudos utilizando lípidos e AGCL, revelando a existência de diversos problemas operacionais na digestão anaeróbia maioritariamente associados à acumulação dos AGCL na biomassa. Flutuação e consequente perda de biomassa por lavagem dos sistemas, e inibição das arquea metanogénicas são os principais problemas descritos. Pereira *et al.* (2002) mostraram que a degradação dos AGCL acumulados na

biomassa e sua conversão a metano era possível, sendo para tal necessário parar a alimentação ao reator. Tendo por base esta observação, Cavaleiro *et al.* (2009) operaram um reator em ciclos alternando fases de alimentação em contínuo e fases em “batch”. Nesta experiência o reator foi alimentado em contínuo com uma mistura de oleato e leite magro (50:50% CQO) até se verificar uma diminuição acentuada da produção de metano, indicativa de acumulação dos AGCL e inibição da atividade metanogénica. A alimentação ao reator foi então interrompida iniciando-se uma fase “batch” tendo em vista a degradação do substrato acumulado. Após conversão a metano deste substrato acumulado iniciou-se uma nova fase de alimentação em contínuo. Estes ciclos foram repetidos quatro vezes com uma carga orgânica aplicada de $5 \text{ kg CQO m}^{-3} \text{ dia}^{-1}$, findos os quais se verificou que a biomassa estava adaptada ao oleato permitindo posterior tratamento eficiente em contínuo a altas cargas. À carga orgânica aplicada de $21 \text{ kgCQO m}^{-3} \text{ dia}^{-1}$ atingiu-se uma eficiência de remoção da CQO de 99% e um rendimento em metano superior a 70%. O trabalho referido foi feito em condições mesofílicas, sendo que esta estratégia nunca foi testada em condições termofílicas. A digestão anaeróbia em condições termofílicas apresenta diversas vantagens (ex.: mais rápida, maior produção de metano) mas existe grande dificuldade na obtenção de inóculos termofílicos, daí o interesse deste estudo.

1.2 – Processo de digestão anaeróbia

O processo da digestão anaeróbia tem como finalidade a conversão de matéria orgânica em metano (CH_4) e dióxido de carbono (CO_2), através da ação de microrganismos que atuam na ausência de oxigénio. O processo da digestão anaeróbia, divide-se em quatro fases distintas (hidrólise, acidogénese, acetogénese e metanogénese) (Gujer e Zehnder, 1983).

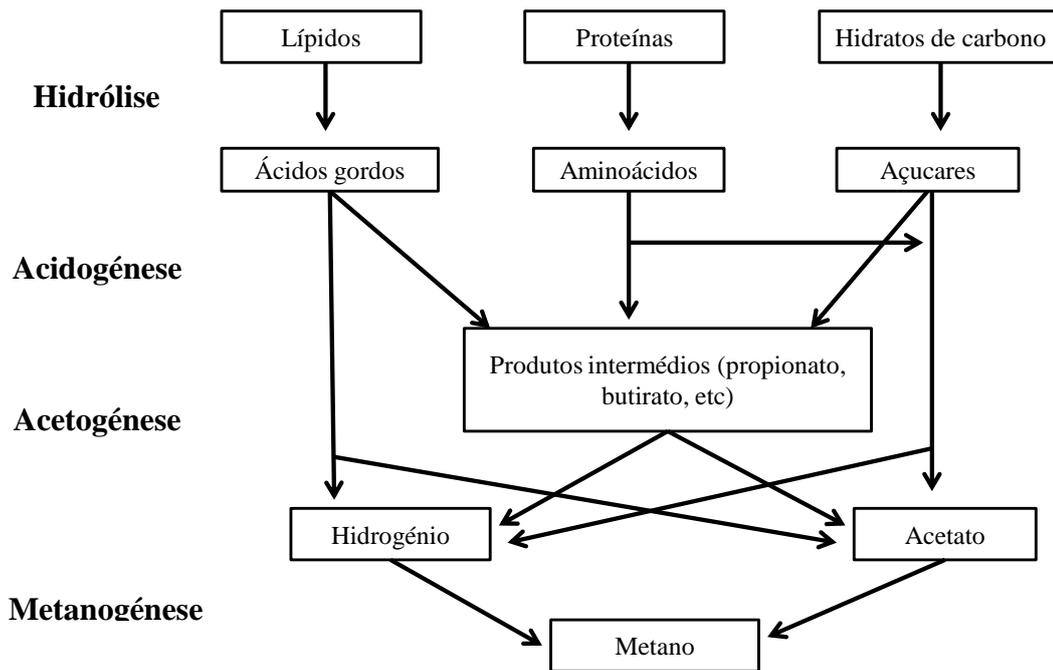


Figura 1.1 – Esquema ilustrativo do processo de digestão anaeróbia (adaptado de Gujer e Zehnder, 1983).

Na **hidrólise**, as bactérias transformam o material orgânico presente no sistema em moléculas com menor peso molecular (Sanders, 2001). Hidratos de carbono, proteínas e lípidos são substratos complexos, convertidos em compostos de cadeia mais curta neste processo, com o auxílio de hidrolases (enzimas excretadas pelas bactérias). Os lípidos são convertidos em ácidos gordos e glicerol pela ação das lipases; as proteínas são degradadas com formação de polipéptidos e aminoácidos, através da ação de proteases e peptidases; os hidratos de carbono transformam-se em açúcares solúveis, com o auxílio de celulasas (Vavilin *et al.* 1996; van Lier *et al.* 2001).

Os produtos da hidrólise são utilizados por bactérias acidogénicas que convertem aminoácidos, açúcares e glicerol em substâncias orgânicas simples como acetato, propionato, butirato e hidrogénio num processo que se designa por **acidogénese** (Harper e Pohland, 1986; Ribeiro, 1999).

Os produtos da fermentação e os AGCL são oxidados a acetato, dióxido de carbono e hidrogénio através da ação das bactérias acetogénicas sintróficas, num conjunto de reações designadas por **acetogénese** (Schink, 1997). Em condições normais este processo é termodinamicamente desfavorável sendo necessária a remoção do

hidrogénio formado de modo a manter uma baixa pressão parcial deste gás no sistema (Sousa *et al.* 2009). Normalmente, as arquea metanogénicas hidrogenotróficas asseguram a remoção do hidrogénio (Sousa *et al.* 2009).

A **metanogénese** consiste na produção de metano e dióxido de carbono e representa a etapa final da digestão anaeróbia. É realizada por arquea metanogénicas que metabolizam hidrogénio/dióxido de carbono (e/ou formato) e acetato. Existem duas vias metabólicas distintas para a conversão de H₂/CO₂ e de acetato, sendo realizadas por grupos diferentes de microrganismos. A conversão de H₂/CO₂ (e/ou formato) é realizada por arquea hidrogenotróficas como, por exemplo, espécies de *Methanobacterium*, *Methanospirillum*, *Methanoculleus* (Whitman *et al.* 1992). Nesta via metabólica o CO₂ é reduzido a metano sendo o H₂ utilizado como dador de electrões. A clivagem do acetato em CH₄ e CO₂ é realizada por arquea acetocásticas dos géneros *Methanosarcina* e *Methanosaeta* (Whitman *et al.* 1992). As arquea acetoclásticas são de crescimento lento e bastante sensíveis a alterações do ambiente (Kuang *et al.* 2002). Cerca de 30% da produção de metano resulta da redução do dióxido de carbono, enquanto os restantes 70% são obtidos através da clivagem do acetato (Jetten *et al.* 1992). As arquea metanogénicas são as mais sensíveis de todo o processo anaeróbio, nomeadamente a alterações de temperatura, contacto com substâncias tóxicas entre outras (Whitman *et al.* 1992).

1.3 – Digestão anaeróbia de lípidos

Os lípidos são constituídos por AGCL ligados a glicerol, álcoois e outros grupos através de uma ligação éster. As gorduras e os óleos constituem um subgrupo dos lípidos, apresentando-se maioritariamente na forma de triglicerídeos. As gorduras diferenciam-se dos óleos, pois estas contêm ácidos gordos saturados enquanto os óleos são normalmente compostos por ácidos gordos insaturados (Alves *et al.* 2009).

A hidrólise dos lípidos ocorre por ação de enzimas hidrolíticas (lipases), responsáveis pela hidrólise de lípidos a glicerol e ácidos gordos (Pereira *et al.* 2003). As reações lipolíticas ocorrem na interface lípido-água. Em 1973 Verger e De Haas, propuseram um processo de duas etapas distintas, para descrever a cinética da catálise através de enzimas lipolíticas: adsorção física da enzima na interface dos lípidos, com ativação da enzima; formação do complexo enzima-substrato; e, finalmente, hidrólise dos lípidos, obtendo-se glicerol e AGCL e regeneração das enzimas adsorvidas. As

lipases podem ser divididas em três grupos: lipases não específicas; 1,3-lipases específicas (hidrolisam apenas ligações éster no C1 e C3 do glicerol); lipases específicas de ácidos gordos (apresentam uma preferência pelos ácidos gordos) (Jaeger *et al.* 1994). Segundo estudos realizados, a hidrólise dos lípidos é um processo rápido quando comparado com a hidrólise de hidratos de carbono e proteínas (Kuang *et al.* 2002). Após ser hidrolisado, o glicerol é maioritariamente convertido em 1,3-propanediol (PD) e piruvato (Leja *et al.* 2011). A degradação dos AGCL ocorre durante a acetogénese, pois os AGCL necessitam de um aceitador de eletrões externo (por exemplo, nitrato ou sulfato) ou a presença de parceiros metanogénicos para que possam sofrer oxidação (Kuang *et al.* 2002).

1.3.1 - Degradação anaeróbia dos AGCL

Os ácidos gordos são ácidos carboxílicos que contêm uma cauda alifática que pode ser saturada ou insaturada. Ácidos carboxílicos como o ácido butírico (4 átomos de carbono) designam-se por ácidos gordos de cadeia curta, já os ácidos carboxílicos compostos por 6 a 12 átomos de carbono são chamados ácidos gordos de cadeia média, enquanto todos os ácidos carboxílicos compostos por mais de 12 átomos de carbono são considerados AGCL.

Os AGCL são degradados por β -oxidação. Durante este ciclo, pares de átomos de carbono são removidos da extremidade do grupo carboxilo, até a cadeia ser reduzida a acetil-CoA (Batstone, 1999). Os AGCL insaturados podem ser oxidados diretamente ou sofrer hidrogenação antes de entrarem no ciclo de β -oxidação (Weng e Jeris, 1976; Roy *et al.* 1986).

Os AGCL só são degradados na presença de um aceitador de eletrões externo ou, quando CO_2 é o único aceitador externo de eletrões, na presença de microrganismos metanogénicos. As arquea metanogénicas atuam em sintrofia com bactérias acetogénicas; as bactérias acetogénicas convertem os AGCL a hidrogénio e acetato e as arquea acetogénicas utilizam esses produtos para a produção de metano. Esta cooperação é fundamental para tornar a conversão de AGCL termodinamicamente favorável (Schink, 1997).

Reações com energia de Gibbs positiva são desfavoráveis (representadas na tabela 1.2), mas possíveis quando sujeitas a condições ambientais apropriadas, como

por exemplo uma menor pressão parcial de hidrogénio e menor concentração de acetato (conseguida através das reações 4 e 5, tabela 1.2).

Tabela 1.2 – Termodinâmica de algumas reações de conversão anaeróbia de ácidos gordos (Thauer *et al.* 1977; Lalman, 2000)

| Substrato | Reação | ΔG° | |
|------------------------------|---|------------------|-------|
| Reações acetogénicas | | | |
| Butirato | $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^- + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{CH}_3\text{COO}^- + 2\text{H}_2 + \text{H}^+$ | +48.3 | Eq. 1 |
| Palmitato | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COO}^- + 14\text{H}_2\text{O} \rightarrow 8\text{CH}_3\text{COO}^- + 14\text{H}_2 + 7\text{H}^+$ | +418.6 | Eq. 2 |
| Oleato | $\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2 + 16\text{H}_2\text{O} \rightarrow 9\text{CH}_3\text{COO}^- + 15\text{H}_2 + 8\text{H}^+$ | +390.8 | Eq. 3 |
| Reações metanogénicas | | | |
| Hidrogénio | $4\text{H}_2 + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_4 + 3\text{H}_2\text{O}$ | -33.9 | Eq. 4 |
| Acetato | $\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HCO}_3^- + \text{CH}_4$ | -31.0 | Eq. 5 |

1.4 – Tratamento anaeróbio de efluentes ricos em lípidos

Podem identificar-se dois principais problemas relacionados com o tratamento anaeróbio de efluentes ricos em lípidos: flutuação de lamas e lavagem de biomassa devido à adsorção de lípidos / AGCL à biomassa; inibição de microrganismos metanogénicos pela presença de AGCL (Alves *et al.*, 2009).

Os efeitos inibitórios de AGCL insaturados são mais graves do que os provocados pelos AGCL saturados, e as arqueas metanogénicas são as mais afetadas pelos efeitos inibitórios dos lípidos / AGCL (Lalman e Bagley, 2001). Pereira *et al.* (2005) sugeriram que estes efeitos podem estar associados a fenómenos de limitação de transferência de massa, devido ao facto dos AGCL envolverem a biomassa, encapsulando-a e desta forma severamente restringindo o fluxo de substratos e produtos. Um estudo de Cirne *et al.* 2006, mostrou que a adsorção de lípidos / AGCL à superfície da biomassa pode inibir a hidrólise enzimática, impedido a ação das enzimas.

Já em 1998 Hwu *et al.* mostraram que a carga específica de AGCL necessária para causar flutuação da biomassa ($0.203 \text{ g CQO g}^{-1} \text{ SSV dia}^{-1}$) correspondia a

concentrações de 263 mg AGCL L⁻¹, concentrações estas muito inferiores às descritas como mínimas inibitórias das arquea metanogénicas (401 mg AGCL L⁻¹). Este facto sugere que a deterioração do processo de tratamento anaeróbio devido a perda da biomassa por flutuação e lavagem ocorrerá muito antes da inibição dos microrganismos metanogénicos.

Vários estudos têm sido efetuados com o objetivo de aperfeiçoar as tecnologias de tratamento de efluentes ricos em lípidos (Cirne *et al.* 2006). O desenvolvimento de sistemas de tratamento anaeróbio de efluentes como o reator anaeróbio de manto de lamas de fluxo ascendente (UASB), o reator de manto de lamas de leito expandido (EGSB) e reatores de recirculação interna (IC), tornaram a digestão anaeróbia numa das tecnologias de tratamento de efluentes mais competitiva (Sousa, 2006).

Atualmente o reator UASB é o processo mais utilizado para tratamento de efluentes. Este reator utiliza um sistema de separação gás/líquido/sólido, isto é, na parte mais inferior fica a matéria sólida, seguida do líquido que perfaz o reator até a saída para o esgoto e na parte superior encontra-se a matéria gasosa. O reator é alimentado pela parte inferior, tendo uma saída de efluente numa parte mais superior e uma saída de gases no seu topo. Uma boa operação está dependente da formação de um leito de lamas granular estável na base do reator. Os reatores UASB são considerados uma tecnologia validada, sendo os mais utilizados até então e quase considerados tecnologia padrão. O reator EGSB que tem conformação e funcionamento semelhante ao UASB, diferenciando-se no leito expandido por meio da recirculação do efluente e o reator IC que é composto por dois ou mais compartimentos do tipo UASB, dispostos uns sobre os outros onde a biomassa e o fluido recirculam internamente (Habets *et al.* 1997), são mais recentes relativamente ao UASB, não sendo ainda alvo de estudos tão aprofundados (Angelidaki *et al.* 2011).

Alves *et al.* (2007) referem um novo reator patenteado de seu nome reator anaeróbio de manto de lamas invertido (IASB), que foi baseado em dois princípios: maximizar a área de contacto entre a biomassa e os AGCL para otimizar a adsorção dos AGCL; usar a flutuação como técnica primária para retenção da biomassa. Este reator é alimentado pela parte superior, sendo a saída do efluente feita pela parte inferior.

Um estudo realizado por Cavaleiro *et al.* (2009) sugere como otimizar a produção de metano proveniente dos AGCL, indicando a realização de ciclos contínuo/"batch" como a estratégia a adoptar para adaptação da biomassa aos AGCL. Estes autores verificaram que após três ciclos constituídos por uma fase de alimentação

em contínuo e uma fase de reação em “batch”, a comunidade de microrganismos presente no reator era capaz de converter eficientemente os AGCL em metano, evitando a acumulação destes compostos no sistema. A aplicação alternada de condições de fartura e fome foi a força de seleção da comunidade microbiana, permitindo posterior operação em contínuo até altas cargas orgânicas. À carga orgânica aplicada de 21 kg CQO m⁻³ dia⁻¹ (50% oleato) a eficiência de conversão a metano obtida foi de 72%, com uma eficiência de remoção da CQO de 99%. Todavia a estratégia referida ainda não foi utilizada em condições termofílicas.

1.5 – Digestão anaeróbia de efluentes ricos em lípidos sob condições termofílicas

Em condições termofílicas as cadeias poliméricas das biomoléculas que compõem os resíduos orgânicos são quebradas mais facilmente, dando origem a monómeros degradáveis. Este facto leva a uma maior eficiência na produção de biogás, através da redução de sólidos inertes, assim como um aumento na concentração de substâncias orgânicas na alimentação (Del Borghi *et al.* 1999).

A digestão anaeróbia em condições termofílicas apresenta como vantagens a redução do tempo de retenção total necessário para a digestão, a higienização das lamas e a possibilidade de uma operação com elevadas cargas orgânicas. Para além das vantagens referidas, operações em condições termofílicas geralmente apresentam maior produção de biogás e podem ser utilizadas maiores cargas de material orgânico. Todavia a elevada produção de energia (proveniente de proteínas e lípidos), temperatura elevada, aumento da produção de ácidos orgânicos e a acumulação microbiana em reatores de condições termofílicas, provocam uma maior instabilidade no funcionamento do reator, constituindo uma desvantagem em comparação com a operação em condições mesofílicas (Weiss *et al.* 2009).

Existe um maior número de espécies mesofílicas do que termofílicas. As espécies mesofílicas são mais tolerantes a alterações nas condições ambientais. A operação em sistemas mesofílicos é considerada mais estável do que em sistemas termofílicos (Kim *et al.* 2012). Os sistemas termofílicos caracterizam-se geralmente pela presença de maiores concentrações de ácidos gordos voláteis à saída do sistema, especialmente quando cargas orgânicas elevadas são aplicadas, indicando menor estabilidade do processo (van Lier, 1996).

A solubilidade dos lípidos aumenta com a temperatura, fazendo com que estes compostos estejam mais acessíveis aos microrganismos e suas enzimas lipolíticas em condições termofílicas. Contudo, tal como referido no ponto 1.4, a digestão anaeróbia termofílica de efluentes ricos em lípidos ou AGCL apresenta diversos problemas operacionais. Por exemplo, Angelidaki *et al.* (1990) reportaram que a adição de óleo a reatores termofílicos semi-contínuos com chorume de vaca inibia o arranque dos sistemas, mas este efeito inibitório era menos acentuado quando o óleo era adicionado juntamente com bentonite. Após adaptação da comunidade microbiana, o óleo era degradado eficientemente, i.e. mais de 80% do óleo era degradado em poucas horas após a sua adição. Nielsen e Ahring (2006) também verificaram um efeito semelhante quando testaram a adição de pulsos de oleato a reatores perfeitamente agitados alimentados com chorume de vaca. Segundo Hwu e Lettinga (1997) o oleato tem um efeito mais tóxico sobre o acetato utilizado na metanogénese em condições termofílicas, do que em condições mesofílicas. A interface físico química da associação entre o oleato e o acetato utilizado pelos microrganismos metanogénicos desempenha um papel importante no grau de toxicidade.

Num estudo de Khemkhao *et al.* (2012), foi tratado óleo de palma num reator UASB a operar em condições mesofílicas durante 21 dias, sendo que a partir de então o reator foi alterado gradualmente para condições termofílicas (57°C). O UASB produziu até 13,2 L de biogás/dia, com um teor de metano a rondar os 76%. A análise de electroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) mostrou que os perfis da comunidade bacteriana foram alterados significativamente aquando da transição da temperatura. Aos 57°C especificamente, o perfil de microrganismos apresentado difere completamente do inicial.

Um estudo realizado por Kabouris *et al.* (2009), teve como objetivo avaliar e quantificar a degradação anaeróbica de lamas municipais, contendo grandes quantidades de óleos e gorduras (FOG). Este teste foi feito com dois processos distintos, realizando-se uma digestão anaeróbia mesofílica (35°C) e outra termofílica (52°C). No final concluiu-se que os FOG aumentaram significativamente a produção de metano, mais concretamente verificou-se que esta produção foi 2,95 vezes superior no reator que operou a 35°C e 2,6 vezes superior no reator que operou a 52°C.

Num estudo realizado por Kim *et al.* (2012), pretendeu-se avaliar a importância quantitativa da atividade das enzimas hidrolíticas no processo da digestão anaeróbia, quando se usam reatores mesofílicos e termofílicos. Para isso foram utilizados resíduos

orgânicos municipais. Após o primeiro dia verificou-se que a atividade da amilase, protease e lipase no reator termofílico foi de 46%, 270%, 19% respectivamente, valores superiores em relação ao reator mesofílico. Os resultados finais revelaram que as diferenças na atividade das enzimas, condicionam a acidogênese e a metanogênese.

1.6 – Arranque de reatores termofílicos

Atualmente existem poucos estudos realizados para o arranque de reatores termofílicos, mais concretamente para a adaptação de biomassa mesofílica a condições termofílicas. Neste sentido realizou-se uma pesquisa que incidiu sobre o arranque de reatores termofílicos a partir de biomassa mesofílica.

Na tabela 1.3 estão resumidos alguns dos estudos realizados sobre o arranque de reatores termofílicos a partir de biomassa mesofílica.

Tabela 1.3 - Revisão de literatura – adaptação de biomassa mesofílica a condições termofílicas

| Tipo de reator | Tipo de inóculo | Substrato | Método utilizado | Resultados da operação | Referência Bibliográfica |
|---|--|--|--|--|--------------------------------|
| CSTR (escala piloto) 3000L | Mistura de lamas primárias e secundárias, provenientes de uma estação de tratamento de águas residuais. | Resíduos de uma estação de tratamento de águas residuais e resíduos orgânicos municipais. | Aumento de 37 °C para 55 °C num único passo. | Sistema estável após 224 dias de operação a 55 °C. | Bolzanella <i>et al.</i> 2003 |
| CSTR 4,5L (2,6L volume de trabalho) | Lamas mesofílicas digeridas. | Lamas primárias e lamas ativadas, oriundas de estação de tratamento de águas residuais (ETAR). | Operação durante 2 meses em condições mesofílicas (37°C). Subsequente subida gradual da temperatura: Reator A: 37 °C → 42 °C → 47 °C → 51 °C → 55 °C Reator B: 37 °C → 55 °C | No reator A a temperatura foi alterada nos dias 1, 11, 35 e 42. Verificou-se produção de biogás durante todo o período de operação, variando em quantidade. No reator B, após o segundo dia de operação (55°C) e durante 5 dias consecutivos, a produção de biogás foi quase nula, verificando-se a estabilização do sistema após 28 dias. | Bousková <i>et al.</i> 2005 |
| UASB 2,8L | Biomassa floculenta (reator 1); Biomassa granular (reator 2); Biomassa granular desintegrada (reator 3). | Água residual sintética composta essencialmente por leite e sacarose. | Operação a 37 °C durante 10 dias, seguida de um aumento para 55 °C num único passo. Foram utilizados 3 reatores com características idênticas. | Após 100 dias de operação, todos os reatores apresentaram uma remoção de CQO com eficiência superior a 95%. | Fang e Lau 1996 |
| SEBAC modificado 35L (25L volume trabalho) | Mistura de lixiviado com lamas. | Estrume de porco (reator A). Lamas de uma estação de tratamento de águas residuais (reator B). | Operação inicial a 55 °C. Utilização de dois reatores com as mesmas características, A e B. | No reator A durante os primeiros 12 dias, a produção de biogás foi praticamente nula, verificando-se uma produção oscilante nos restantes 88 dias de operação. No reator B registou-se produção de biogás a partir do 5º dia de operação, sendo que após o 75º dia deixou de haver produção. | Fdéz-Guelfo <i>et al.</i> 2010 |

| | | | | | |
|---|---|--|--|---|-----------------------------|
| CSTR 5L | Lamas mesofílicas digeridas. | Lamas primárias e lamas ativadas secundárias. | Aumento imediato de 38 °C para 55 °C. | Foram necessários 10 a 15 dias para a adaptação da biomassa às condições termofílicas. | Ferrer <i>et al.</i> 2010 |
| Reator de fluxo ascendente (Filter) 5L | | Resíduos de um matadouro (Tunísia) | O reator foi operado durante 140 dias a temperatura termofílica. Aumento de 37 °C para 55 °C num único passo | Durante os primeiros 30 dias a produção de biogás foi diminuta, verificando-se um aumento até aos 120 dias, voltando a diminuir ligeiramente até aos 140 dias | Gannoun <i>et al.</i> 2009 |
| UASB (5,3L volume de trabalho) | Lamas obtidas de uma estação de tratamento de águas residuais | Óleo de palma | Operação a temperatura mesofílica até a remoção da CQO ser 80%, durante 3 vezes do TRH. Aumento de 5 °C por etapa até atingir aos 55 °C | Verificou-se uma produção de biogás crescente durante os 123 dias de operação | Khemkhao <i>et al.</i> 2012 |
| UASB 5L (4L volume de trabalho) | Biomassa granular e não granular (50:50) | Resíduos de comida produzidos numa cafetaria | Operação durante 13 dias a 35 °C. Ao 13º dia realizou-se aumento imediato para 55 °C | Após o aumento de temperatura para 55°C, verificou-se um aumento instantâneo na produção de biogás, voltando a diminuir para um valor mais baixo | Ortega <i>et al.</i> 2008 |
| Dois CSTR (51L) | Lamas mesofílicas digeridas, provenientes de uma estação de tratamento de águas residuais | Lamas primárias e secundárias provenientes de uma estação de tratamento de águas residuais | Operação durante 80 dias. Aumento instantâneo da temperatura de 35 °C para 55 °C (reator A). Aumento da temperatura em vários passos: 35 °C → 43 °C; 43 °C → 50 °C; 50 °C → 55°C | Em ambos os reatores foram necessários cerca de 20 dias para haver uma produção de biogás semelhante à que se verificava antes da alteração da temperatura | Palatsi <i>et al.</i> 2009 |

1.7 – Objectivos

Este trabalho teve como objetivos principais a adaptação de um inóculo mesofílico a condições termofílicas e posterior aplicação no tratamento de diferentes cargas de oleato, avaliando o rendimento na produção de metano. Para tal operou-se um reator em contínuo, inoculado com a biomassa mesofílica, a 37°C, realizando-se aumentos de temperatura de 5°C por semana até à temperatura final de 55°C. Após a adaptação do inóculo, foram aplicadas cargas de 5, 10 e 20 kg CQO m⁻³ dia⁻¹ (50% CQO-oleato) testando-se a eficiência do tratamento de efluente rico em AGCL em condições termofílicas. A biomassa em adaptação foi caracterizada quanto à atividade metanogénica específica em acetato e H₂/CO₂, toxicidade do oleato e biodegradabilidade do oleato.

2. Materiais e Métodos

2.1 - Instalação experimental

A instalação experimental consistiu num reator de fluxo ascendente em acrílico, de 3.5L de volume útil e 4.2L de volume total. O reator foi inoculado com 400g de biomassa granular mesofílica proveniente da Central de Cervejas (0.083 gSV g⁻¹ peso húmido). Promoveu-se a agitação do conteúdo do reator através de uma corrente de reciclo instalada entre a base e a terceira porta de amostragem, a um caudal de 778 L dia⁻¹.

Ao topo do reator ligou-se uma linha de gás, contendo uma porta de amostragem e um contador de biogás (Ritter MGC-1 V3.0 600 ml h⁻¹). O sistema foi aquecido através da circulação de água quente numa camisa externa de aquecimento, tendo-se ainda revestido o reator com um material isolante para evitar perdas de calor. Na Figura 2.1 representa-se esquematicamente a instalação experimental.

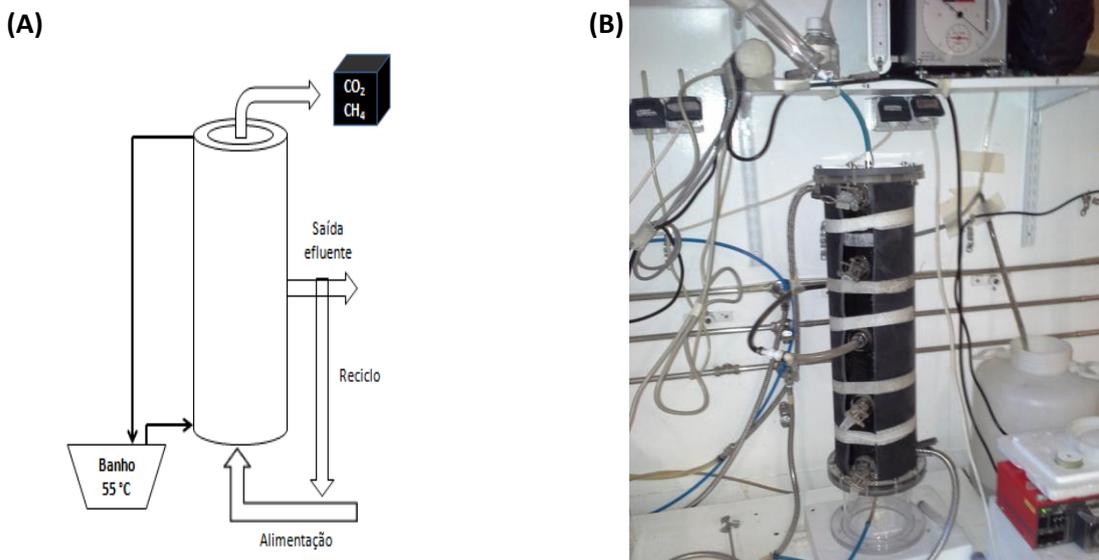


Figura 2.1 – (A) Representação esquemática do reator; (B) Imagem ilustrativa do reator.

2.2 – Substrato

Numa fase inicial o reator foi alimentado com uma água residual sintética composta por leite magro diluído em água da rede municipal. Numa fase posterior do trabalho (171º dia) acrescentou-se oleato de sódio a esta água residual sintética, sendo a razão leite:oleato de 50:50% da CQO total. Ao longo de todo o trabalho a alimentação foi suplementada com micronutrientes (1 mL L^{-1}), macronutrientes (0.6 mL g^{-1} CQO) e bicarbonato de sódio (5 g L^{-1}), de acordo como descrito por Alves *et al.* (2001). A composição das soluções de nutrientes adicionadas foi a seguinte:

Macronutrientes – $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 30.2 g L^{-1} ; KH_2PO_4 : 28.3 g L^{-1} ; KCl : 45 g L^{-1} .

Micronutrientes – $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 2 g L^{-1} ; H_3BO_3 : 0.05 g L^{-1} ; ZnCl_2 : 0.05 g L^{-1} ; $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0.038 g L^{-1} ; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: 0.5 g L^{-1} ; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: 0.05 g L^{-1} ; $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 0.09 g L^{-1} ; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 2 g L^{-1} ; $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 0.092 g L^{-1} ; $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: 0.164 g L^{-1} ; EDTA: 1 g L^{-1} ; Resazurina: 0.2 g L^{-1} ; HCl 37%: 1 mL L^{-1} . A composição desta solução foi baseada no trabalho de Zehnder *et al.* (1980).

2.3 – Modo de operação

Na tabela 2.1 encontram-se resumidas as principais condições de operação do reator. O arranque do sistema (período 1) foi efectuado em “batch” em condições mesofílicas (37°C) até se verificar produção de biogás a partir do substrato adicionado (leite magro). Durante o período 2 (dias 10 a 52 de operação) o reator foi alimentado em contínuo com uma carga orgânica aplicada de $1 \text{ kg CQO m}^{-3} \text{ dia}^{-1}$, e a temperatura de operação foi aumentada 5°C por semana até se atingir os 55°C . No final desta fase de adaptação, os resultados experimentais mostraram um mau desempenho do sistema (ver Resultados e Discussão), pelo que uma fase “batch” foi imposta no período 3, seguida de nova fase de alimentação em contínuo no período 4. Só após estabilização do sistema se iniciou a alimentação em contínuo com a mistura de leite e oleato de sódio, aplicando-se uma carga orgânica de 5, 10 e $20 \text{ kg CQO m}^{-3} \text{ dia}^{-1}$ nos períodos 5, 6 e 8 respetivamente.

Tabela 2.1 – Condições operacionais aplicadas durante a experiência

| Período | Tempo (dias) | Temperatura no banho de aquecimento (°C) | Modo de operação | Alimentação | Concentração (g CQO L ⁻¹) | TRH (dias) | OLR (kg CQO m ⁻³ dia ⁻¹) |
|----------|--------------|--|------------------|-------------|---------------------------------------|------------|---|
| 1 | 0-9 | 37 | B | L | 1 | - | - |
| | 10-17 | 37 | | | | | |
| | 18-24 | 45 | | | | | |
| | 25-29 | 50 | | | | | |
| 2 | 30-45 | 55 | C | L | 1 | 1 | 1 |
| | 46-49 | 60 ^(*) | | | | | |
| | 50-52 | 65 | | | | | |
| 3 | 53-73 | 65 | B | - | - | - | - |
| 4 | 74-98 | 65 | C | L | 1 | 1 | 1 |
| | 98-170 | 67 | | | | | |
| 5 | 171-235 | 67 | C | L + OL | 5 | 1 | 5 |
| 6 | 236-247 | 67 | C | L + OL | 10 | 1 | 10 |
| 7 | 248-262 | 67 | B | - | - | - | - |
| 8 | 263-266 | 67 | C | L + OL | 20 | 1 | 20 |
| 9 | 267-284 | 67 | B | - | - | - | - |

(*) Instalação do revestimento térmico do reator.

B – “batch”, C – contínuo, L – leite magro, OL – oleato de sódio.

2.4 – Monitorização do sistema

O sistema foi monitorizado periodicamente através da medição diária da quantidade de biogás produzida, utilizando um *Ritter MilliGascounter* (Ritter MGC-1 V3.0 600 ml/h). Duas a três vezes por semana analisou-se também a percentagem de metano no biogás, a temperatura e pH no interior do reator, a CQO total à entrada e a CQO total e solúvel+coloidal à saída do sistema, a concentração AGV à saída e o teor de sólidos totais e voláteis na corrente de saída. O caudal de alimentação também foi medido e ajustado quando necessário. Realizou-se também análise de AGCL em tempos específicos durante os períodos 5 a 9 de operação.

A composição do biogás foi analisada através de cromatografia gasosa, utilizando o aparelho Micro GC CP 4900 (Varian) com uma coluna de 10 m PPU, aquecida a 80 °C. Foi usado um detetor de condutividade térmica aquecido a 55 °C e hélio (150 kPa) como gás de arraste. A temperatura de injeção foi 110 °C. A quantidade de metano produzida em cada período de operação, foi convertida em rendimento de metano (%) através da equação 2.1:

$$\text{Rendimento de metano (\%)} = \frac{\text{CH}_4 \text{ (gCQO) produzido durante um período}}{\text{CQO removida (gCQO)}} \times 100 \quad (2.1)$$

A CQO foi analisada através de kits rápidos (COD LCK, Hach Lange) de acordo com o método do refluxo fechado (Standard Methods, 1989), e a leitura foi feita em espectrofotómetro DR 2800 (Hach-Lange GmbH). A CQO solúvel+coloidal foi analisada após centrifugação da amostra durante 10 minutos a 10000 rpm.

As amostras para análise de AGV foram centrifugadas durante 10 min a 10000 rpm, preservando-se o sobrenadante a -20°C. Imediatamente antes da análise adicionou-se ácido crotónico como padrão interno. A análise foi efectuada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), usando uma coluna Chrompack (30 x 6.5 mm) para análise de ácidos orgânicos, com uma fase móvel de 5 mM H₂SO₄ 0.01N a um caudal de 0.6 mL min⁻¹. A temperatura da coluna foi de 60°C e a deteção espectrofotométrica feita a 210 nm. A fase móvel foi desgasificada num banho de ultrassons (BRANSON 5510) durante 20 minutos.

A determinação dos sólidos foi feita por gravimetria de acordo com o método descrito no Standard Methods (1989).

Periodicamente efetuou-se recolha de amostras do conteúdo perfeitamente agitado do reator para análise de AGCL. Os AGCL saturados e insaturados, presentes na fase líquida ou associados à biomassa (fase sólida), foram extraídos e quantificados de acordo com o método descrito por Neves *et al.* (2009). De forma sucinta, os AGCL livres presentes nas amostras são esterificados com propanol em meio ácido a alta temperatura (100 °C) durante 3.5 horas, e extraídos com diclorometano. Para a quantificação utilizou-se um cromatógrafo Varian 3800 com um detetor de ionização de chama, com uma coluna (Teknokroma, TR-WAX) eq.CPSil 52 CB 30 m × 0.32 mm × 0.25 µm. Foi usado hélio como gás de arraste com um caudal de 1 ml min⁻¹. A temperatura inicial do forno foi 50°C (2 min), aumentando 10°C min⁻¹ até à temperatura final de 225°C. A temperatura do injetor e detetor foi 220°C e 250°C respetivamente.

2.5 - Amostragem e caracterização da biomassa

Ao longo da operação do reator fizeram-se três amostragens da biomassa, em três tempos distintos de operação: $t_0 = 0$ dias, correspondente ao inóculo inicial com características mesofílicas que foi testado a 37°C; $t_1 = 78$ dias, que consistiu numa amostra de conteúdo perfeitamente agitado do reator, após este ser operado em “batch”, testado a 55°C; $t_2 = 171$ dias, referente a uma amostra de conteúdo perfeitamente agitado do reator, após este ser operado em contínuo com uma carga de 1 kg CQO m⁻³ dia⁻¹, testado a 55°C.

Para a recolha das amostras de biomassa abriu-se a tampa do reator e agitou-se todo o conteúdo presente no interior, com o auxílio de um agitador manual, retirando-se (em simultâneo) a amostra pela segunda porta de amostragem do reator. No final da amostragem injetou-se N₂ através da parte superior do reator, para refluxar e manter o ambiente em condições anaeróbias.

As amostras retiradas foram utilizadas para testes de atividade metanogénica específica em acetato e H₂/CO₂, testes de toxicidade onde se utilizou acetato e oleato (concentrações de 100, 300, 500, 700 e 900 mg L⁻¹) e testes de biodegradabilidade na presença de oleato (concentrações de 100, 300, 500, 700 e 900 mg L⁻¹). Estes testes foram realizados na sala quente (37°C) e em incubadoras a 55°C, onde foram monitorizados regularmente através da medição da pressão no interior das garrafas, utilizando-se para isso um transdutor de pressão (*Centrepoints Electronics, Galway*,

Irlanda) com um sensor de diafragma (*nº 303-343, R.S. Components Ltd., Corby, Northants, Inglaterra*), que mede variações de pressão com uma capacidade de ± 2 atmosferas ($0 \pm 202.6 \text{ kPa}$), que corresponde a uma gama de (-200mV a 200mV). O transdutor é ainda composto por um painel (*nº 258-041, R.S. Components Ltd., Corby, Northants, Inglaterra*) que está ligado ao sensor e é alimentado por um transformador de 9V DC.

2.5.1 – Ensaios de atividade metanogénica específica

A atividade metanogénica específica foi determinada de acordo com o método descrito por Colleran *et al.* (1992). Os ensaios foram feitos em duplicado/triplicado para cada substrato e para os brancos. Em cada garrafinha o volume de trabalho foi de 12.5 mL em 25 mL (volume total) para os substratos líquidos (acetato) e 12.5 mL em 70 mL (volume total) para os substratos gasosos. Nos testes gasosos utilizou-se uma mistura de H_2/CO_2 (80:20% v/v) como substrato e uma mistura de N_2/CO_2 (80:20% v/v) como branco.

Em cada frasco adicionaram-se determinados volumes de biomassa e tampão anaeróbio, com a finalidade de se obter uma concentração de sólidos voláteis entre 2 e 5 g L^{-1} , num volume de trabalho de 12.5 mL. Os frascos foram fechados com rolhas de borracha e selados com cápsulas de alumínio. Seguidamente todos os frascos de 25 mL foram refluxados com N_2/CO_2 e adicionou-se 0.1 mL de Na_2S (agente redutor), ficando durante uma noite a $37^\circ\text{C}/55^\circ\text{C}$ agitados a 150 rpm.

Em cada frasco de 25 mL colocou-se 0.125 mL de substrato (acetato), correspondendo a uma concentração de 30 mM, excetuando os frascos dos ensaios em branco. De seguida acertou-se a pressão no interior das garrafas, de modo a ficarem pouco pressurizadas (20 – 30 mV) e foram colocadas a $37^\circ\text{C}/55^\circ\text{C}$ com agitação de 150 rpm. Relativamente às garrafas de 70 mL, pressurizou-se cada uma a 1 bar (100 mV) com a respetiva mistura gasosa, sendo igualmente incubadas a $37^\circ\text{C}/55^\circ\text{C}$ e 150 rpm.

A medição da pressão foi iniciada passada cerca de uma hora, repetindo-se as medições com intervalos de 1 a 2 horas, mediante a produção de biogás em cada garrafa.

Em relação aos substratos, a degradação dos substratos líquidos resulta num aumento de pressão, enquanto na degradação do substrato gasoso (H_2/CO_2) verifica-se um decréscimo de pressão. Isto explica-se pela transformação de 5 moles de H_2 e CO_2

numa única mole de metano ($4\text{H}_2+\text{CO}_2\rightarrow\text{CH}_4+2\text{H}_2\text{O}$). Os testes de atividade metanogénica consideraram-se terminados quando a pressão deixa de variar, e simultaneamente o valor da pressão obtida corresponde ao consumo aproximado do total de substrato.

Após o término dos testes realizou-se análise ao biogás, mediu-se o volume vazio de cada garrafa e determinaram-se os sólidos voláteis presentes em cada garrafa. Para analisar a percentagem de metano, utilizou-se o Micro GC CP 4900 (Varian) que possui uma coluna de 10 m PPU, aquecida a 80 °C. Foi usado um detetor de condutividade térmica aquecido a 55 °C e hélio (150 kPa) como gás de arraste. A temperatura de injeção foi 110 °C. Injetou-se uma amostra em triplicado de padrão (40% CH₄, 40% CO₂, restante N₂) e uma amostra em triplicado retirada de cada garrafa.

A determinação do volume vazio em cada garrafa realizou-se através da injeção de 5 mL de ar, registando-se o aumento de pressão utilizando o transdutor. Repetiu-se este procedimento três vezes por cada garrafa analisada. Os sólidos voláteis foram determinados pelo método descrito no Standard Methods (1989).

O procedimento para cálculo da atividade metanogénica específica encontra-se descrito no anexo I.

2.5.2 – Ensaios de toxicidade do oleato sobre a atividade metanogénica acetoclástica

O procedimento utilizado para a realização dos ensaios de toxicidade metanogénica foi baseado no descrito por Colleran e Pistilly (1994). O objetivo destes testes consiste na monitorização da produção de biogás, na presença de um inibidor de atividade específico, neste caso oleato de sódio comercial em concentrações de 100, 300, 500, 700 e 900 mg L⁻¹. Como substrato foi usado acetato de sódio 30 mM. Os testes realizaram-se em garrafas de 25 mL, com um procedimento idêntico ao descrito nos pontos 2.5 e 2.5.1. Os ensaios em branco foram preparados sem adição de substrato nem inibidor; ensaios de controlo foram preparados apenas com acetato, mas sem oleato. O meio basal utilizado foi também o mesmo descrito no anexo I.

A toxicidade do oleato de sódio foi expressa em termos do índice de toxicidade (IC₅₀), que representa a concentração de oleato para a qual a atividade metanogénica acetoclástica é reduzida a 50% da atividade máxima (obtida nos ensaios de controlo).

2.5.3 – Ensaios de biodegradabilidade do oleato de sódio

Os testes de biodegradabilidade foram realizados para verificar a capacidade de biodegradação por parte da biomassa. O oleato foi usado como substrato, nas concentrações de 100, 300, 500, 700 e 900 mg L⁻¹. O procedimento experimental foi idêntico ao descrito nos ensaios de atividade e toxicidade. O meio basal utilizado foi suplementado com nutrientes, de acordo com o descrito no anexo II. O procedimento para cálculo da produção específica de metano encontra-se descrito no anexo II.

3. Apresentação de Resultados e Discussão

A acumulação de AGCL em reatores contínuos, por adsorção à biomassa, tem limitado severamente o tratamento anaeróbio de efluentes ricos em gorduras, bem como a recuperação do potencial energético destes compostos na forma de biogás. A chave para um tratamento eficiente e máxima produção de metano parece residir na capacidade de evitar a acumulação destes compostos no sistema. Cavaleiro *et al.* (2009) mostraram que se a biomassa for adaptada aos AGCL através de uma operação em ciclos, alternando fases de alimentação em contínuo e fases “batch” de degradação do substrato acumulado, o tratamento contínuo a altas cargas é possível. Estes autores trabalharam em condições mesofílicas e esta estratégia nunca foi testada em condições termofílicas. Neste trabalho, após uma primeira fase de adaptação de biomassa mesofílica a condições termofílicas, testou-se o tratamento de um efluente sintético contendo oleato de sódio usando uma estratégia semelhante à descrita por Cavaleiro *et al.* (2009).

Durante os períodos de alimentação em contínuo a carga orgânica aplicada variou entre 1.0 ± 0.1 e 21.4 ± 1.0 kg CQO $m^{-3} dia^{-1}$, e o TRH manteve-se aproximadamente 1 dia (figura 3.1 e tabela 3.1).

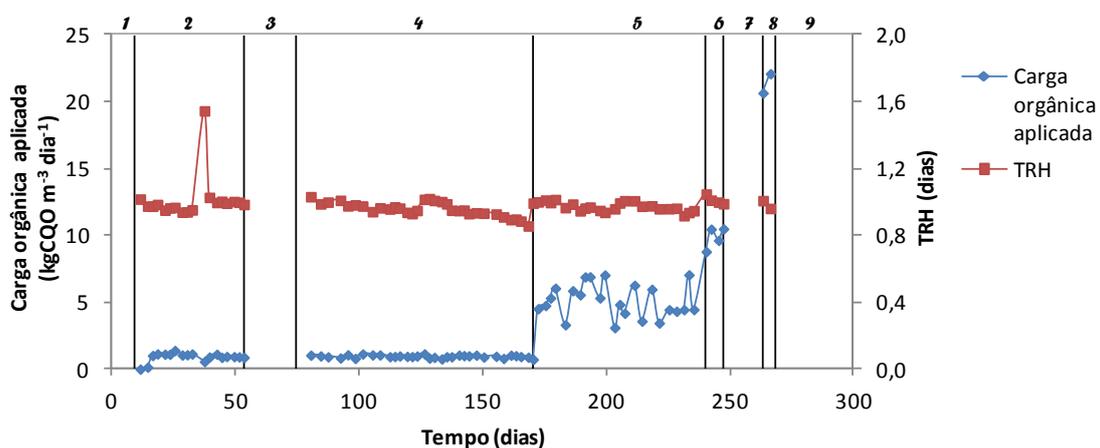


Figura 3.1 – Evolução da carga orgânica aplicada e TRH ao longo do tempo de operação (1 - 9 representam os períodos de operação do reator).

Tabela 3.1 – Valores médios das condições experimentais aplicadas e parâmetros de performance do reator nos vários períodos de operação

| Período | Tempo (dias) | Modo de operação | CQO à entrada (mg L ⁻¹) | TRH (dias) | Carga orgânica aplicada (kgCQO m ⁻³ dia ⁻¹) | Eficiência de remoção da CQO sol.+col. (%) | Rendimento em metano (%) |
|---------|--------------|------------------|-------------------------------------|-------------|--|--|--------------------------|
| 1 | 0-9 | B | - | - | - | - | - |
| 2 | 9-53 | C | 1009 ± 125 | 1.01 ± 0.14 | 1.0 ± 0.2 | 83.2 ± 23.0 | 21.3 |
| 3 | 53-74 | B | - | - | - | - | - |
| 4 | 74-171 | C | 926 ± 123 | 0.96 ± 0.04 | 1.0 ± 0.1 | 76.2 ± 21.8 | 36.9 |
| 5 | 171-236 | C | 4978 ± 1194 | 0.97 ± 0.03 | 5.1 ± 1.2 | 86.2 ± 5.9 | 48.1 |
| 6 | 236-248 | C | 9965 ± 646 | 1.01 ± 0.03 | 9.9 ± 0.8 | 79.1 ± 11.3 | 40.5 |
| 7 | 248-263 | B | - | - | - | - | - |
| 8 | 263-267 | C | 21070 ± 297 | 0.99 ± 0.03 | 21.4 ± 1.0 | 71.7 ± 2.7 | 5.1 |
| 9 | 267-284 | B | - | - | - | - | - |

B, “Batch”; C, Contínuo.

3.1 - Arranque do reator e adaptação da biomassa a condições termofílicas

A evolução da temperatura no interior do reator durante a fase de arranque e adaptação da biomassa a condições termofílicas encontra-se representada na figura 3.2(a). Devido a perdas de calor no sistema notou-se alguma instabilidade neste parâmetro durante os períodos 1 e 2 de operação, mas após instalação do revestimento térmico do reator este problema foi ultrapassado, conseguindo-se assegurar uma maior estabilidade e rigor nos valores da temperatura medidos no interior do sistema.

O aumento da temperatura imposto durante os períodos 1 e 2 perturbou de forma acentuada a comunidade microbiana mesofílica presente no inóculo, em particular as arquea metanogénicas, tal como se pode ver pela elevada instabilidade registada na produção de metano (figura 3.2(b)). A remoção da CQO solúvel+coloidal também apresentou uma tendência decrescente que se tornou mais abrupta no final do período 2, facto que foi acompanhado pela ausência de produção de metano e aumento da concentração de acetato à saída do sistema (figura 3.2(a) e (b)). Estes resultados mostram que o aumento de temperatura inibiu a atividade dos microrganismos metanogénicos acetoclásticos, mas não das bactérias acetogénicas.

A diminuição drástica da produção de metano levou à decisão de parar a alimentação ao reator durante o período 3 (“batch”), como forma de tentar recuperar a atividade da comunidade microbiana presente no sistema. Contudo, durante este período a concentração de acetato continuou a aumentar, atingindo cerca de 950 mg ácido L⁻¹. O poder tampão do sistema, proporcionado pela adição de bicarbonato de sódio, garantiu que o pH nunca baixou excessivamente devido à produção de ácidos. Com efeito, durante todo o tempo de operação, o pH manteve-se aproximadamente constante, tendo como valor médio 7.7±0.3. Para promover lavagem deste ácido do sistema e evitar completa inibição de todo o processo reiniciou-se a alimentação em contínuo no período 4. Efetivamente, a recuperação da atividade metanogénica verificou-se após um período de cerca de 50 dias, durante os quais a produção de metano foi nula, após diminuição acentuada da concentração de acetato do sistema. Outros autores (e.g. Bousková *et al.* 2005; Palatsi *et al.* 2009), também verificaram a existência de períodos de muito baixa produção de metano durante a adaptação de biomassa mesofílica a condições termofílicas quando o aumento da temperatura foi feito gradualmente, tal como neste trabalho. Geralmente quando os microrganismos metanogénicos são sujeitos a temperaturas entre 43 – 50°C, a sua atividade diminui drasticamente, sejam eles

mesofílicos ou termofílicos (Choorit e Wisarnwan 2007). A produção de metano atingiu valores relativamente estáveis por volta do dia 123 de operação (figura 3.2(b)), a partir do qual se considerou que a biomassa estava adaptada às condições termofílicas impostas. A eficiência de remoção da CQO também recuperou para valores elevados e manteve-se cerca de $93\pm 2\%$ desde esse dia até ao final do período 4.

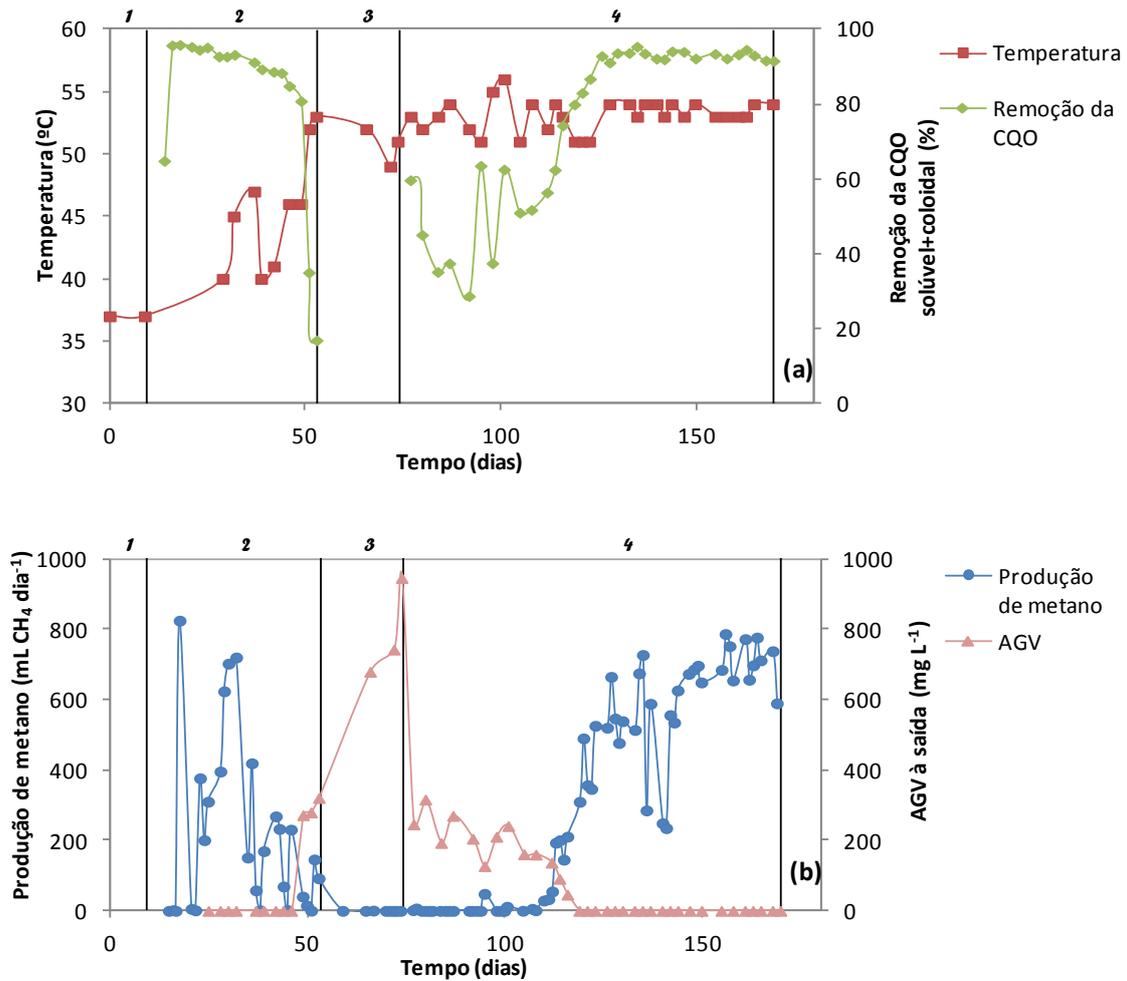


Figura 3.2 – Evolução da temperatura no interior do reator e dados de operação durante a fase de arranque a adaptação da biomassa a condições termofílicas (1 - 4 representam os períodos de operação do reator).

A inibição das arquea metanogénicas consumidoras de acetato foi confirmada através dos testes de atividade metanogénica específica realizados com o inóculo (t_0) e com as amostras de biomassa recolhidas após 78 e 171 dias de operação, correspondendo respetivamente ao início e ao final do período 4 de operação (durante o qual ocorreu a recuperação da produção de metano). Os resultados obtidos encontram-se compilados na tabela 3.2 e mostram que os valores de atividade em acetato no tempo t_0 e t_2 são semelhantes, enquanto que em t_1 esta atividade é praticamente nula. Em H_2/CO_2 a atividade em t_0 e t_1 é praticamente idêntica, sendo superior em t_2 . Aparentemente a estratégia de adaptação aplicada funcionou como força motriz para a seleção das arquea metanogénicas acetoclásticas que, estando presentes no inóculo mesofílico, são capazes de resistir e crescer ativamente à temperatura de 55 °C.

Tabela 3.2 – Atividade metanogénica específica em acetato e H_2/CO_2

| Atividade metanogénica específica (mLCH ₄ @PTN g ⁻¹ SV dia ⁻¹) | | |
|--|----------|---------------------------------|
| Tempo | Acetato | H ₂ /CO ₂ |
| t_0 (0 dias) | 199 ± 18 | 611 ± 16 |
| t_1 (78 dias) | 13 ± 2 | 600 ± 34 |
| t_2 (171 dias) | 217 ± 33 | 1118 ± 390 |

Tendo em vista o posterior tratamento de uma água residual com oleato, a toxicidade deste composto face às arquea metanogénicas acetoclásticas presentes nas amostras de biomassa (t_0 , t_1 e t_2) foi também avaliada. Os ensaios de toxicidade realizados focaram-se neste grupo microbiano uma vez que, de entre os diversos grupos tróficos presentes na digestão anaeróbia, estas estão descritas como sendo as mais sensíveis a condições adversas e à presença de substâncias tóxicas (Gujer and Zehnder. 1983).

Os resultados obtidos nos testes de toxicidade realizados com o inóculo (figura 3.3(a)) mostram que não houve inibição da atividade metanogénica acetoclástica pelas diferentes concentrações de oleato testadas, uma vez que todas as curvas apresentam declives semelhantes e ausência de fases lag. Estes ensaios foram realizados a 37 °C e comprovam o potencial deste inóculo para o trabalho a realizar.

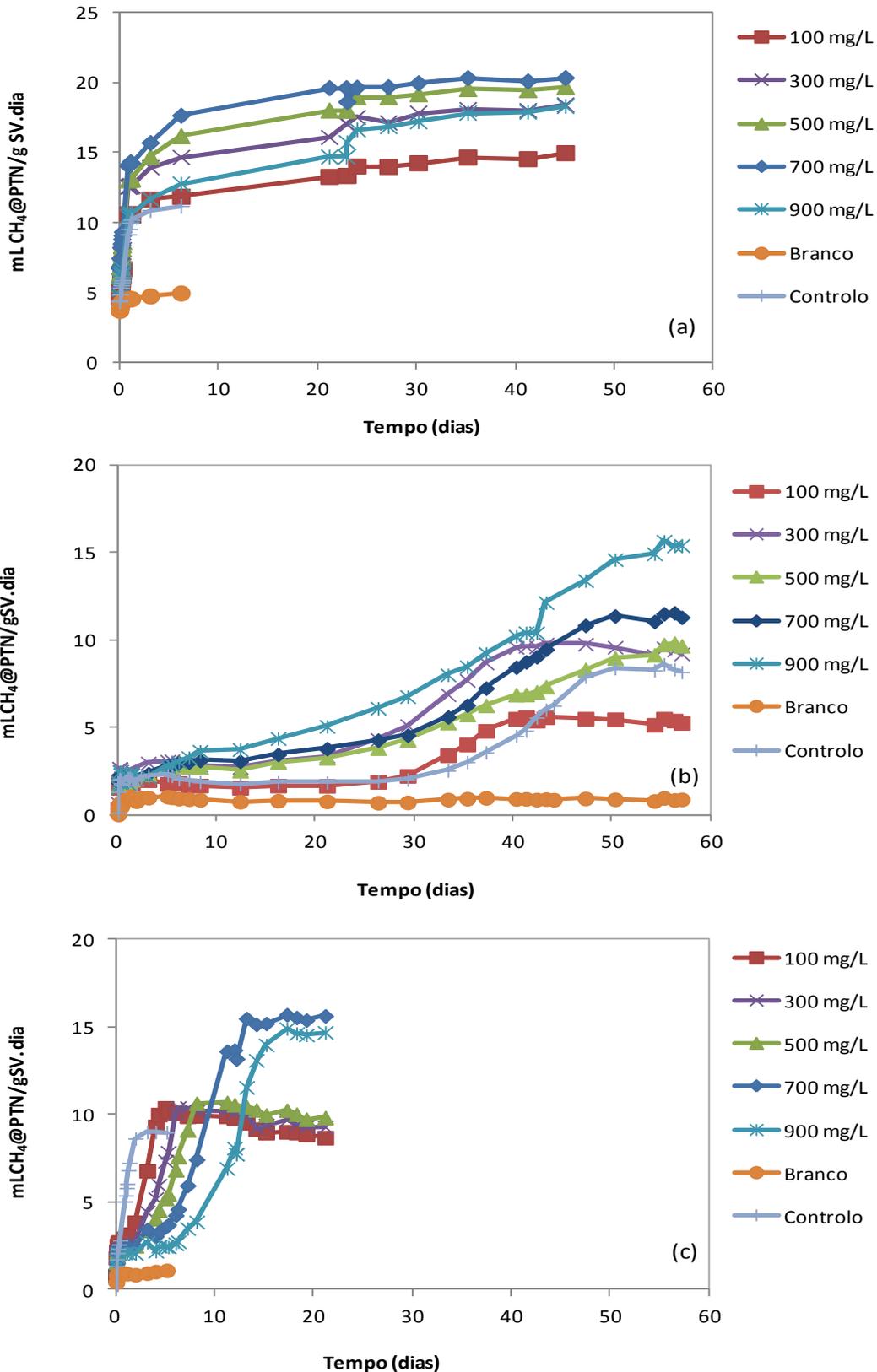


Figura 3.3 – Produção específica de metano nos testes de toxicidade realizados nos tempos $t_0 = 0$ dias (a), $t_1 = 78$ dias (b) e $t_2 = 171$ dias (c). Os ensaios foram realizados na presença de 30 mM de acetato e diferentes concentrações de oleato de sódio; ensaio em branco – sem adição de acetato nem oleato; ensaio de controlo – 30 mM de acetato mas sem oleato.

Após 78 dias de operação, a reduzida atividade metanogénica específica torna difícil a avaliação da toxicidade do oleato (figura 3.3(b)), mas no final do período de adaptação ($t_2 = 171$ dias) a toxicidade do oleato de sódio é evidenciada pela diminuição do declive das curvas de produção de metano e aumento da fase lag com o aumento da concentração de oleato adicionada. Neste ensaio todas as concentrações testadas induziram uma diminuição da atividade metanogénica específica em acetato superior a 53%, justificando a necessidade de adaptar esta biomassa termofílica ao oleato de sódio.

Relativamente aos ensaios de biodegradabilidade realizados foi possível verificar que as três amostras de biomassa testadas apresentavam capacidade de biodegradar oleato. Contudo, a produção máxima de metano registada ficou sempre aquém da esperada teoricamente, como é possível verificar na tabela 3.3. Genericamente foi no tempo t_2 que se obtiveram os melhores valores de rendimento em metano, evidenciando uma melhor capacidade de degradação do oleato relativamente ao inóculo e à biomassa presente no reator no início do período 4 de operação (78 dias). Por outro lado, a degradação do oleato por estas biomassas revela-se um processo lento, uma vez que os valores de rendimento em metano apresentados na tabela 3.3. referem-se a períodos de incubação sempre superiores a 20 dias.

Tabela 3.3 – Rendimento de metano nos testes de biodegradabilidade do oleato

| Rendimento de metano (%) | | | |
|--|----------------|-----------------|------------------|
| Concentração oleato (mg L^{-1}) | $t_0 = 0$ dias | $t_1 = 78$ dias | $t_2 = 171$ dias |
| 100 | 72 | 39 | 71 |
| 300 | 36 | 46 | 60 |
| 500 | 33 | 51 | 44 |
| 700 | 34 | 49 | 62 |
| 900 | 28 | 50 | 40 |

3.2 – Tratamento termofílico de efluente rico em oleato

Após adaptação da biomassa testou-se o tratamento termofílico de um efluente sintético rico em oleato (períodos 5 a 9 de operação), tendo-se mantido a temperatura no interior do reator aproximadamente constante, i.e. $54.3 \pm 0.9^\circ\text{C}$. Aplicou-se uma carga orgânica de $5.1 \pm 1.2 \text{ kg CQO m}^{-3} \text{ dia}^{-1}$ (50:50% leite:oleato), de acordo com o descrito por Cavaleiro *et al.* (2009), correspondendo esta carga a uma concentração de cerca de $2.5 \text{ g CQO-oleato L}^{-1}$ de alimentação (tabela 3.1). Durante este período a eficiência de remoção da CQO manteve-se elevada, com valores médios de $86 \pm 6\%$ (figura 3.4(a) e tabela 3.1), embora ligeiramente mais baixa do que no final do período anterior. Notou-se uma certa instabilidade na produção de metano ao longo do tempo (figura 3.4(b)) e o rendimento em metano deste período foi de 48%, mostrando que nem toda a CQO removida estava a ser convertida a metano. Esta diferença pode dever-se à acumulação transiente de AGV (concentrações inferiores a 500 mg/L , figura 3.4(c)) ou ao acúmulo de AGCL, uma vez que no final do período se quantificou cerca de 240 mg oleato/L (figura 3.4(d)), que corresponde a cerca de $690 \text{ mg CQO-oleato/L}$. O crescimento da biomassa também pode ter contribuído para esta diferença.

Quando se aumentou a carga orgânica aplicada para $9.9 \pm 0.8 \text{ kg CQO m}^{-3} \text{ dia}^{-1}$ (período 6) ou $21.4 \pm 1.0 \text{ kg CQO m}^{-3} \text{ dia}^{-1}$ (período 8) a produção de metano diminuiu de forma abrupta, tornando-se praticamente nula (figura 3.4(b)) e verificou-se acumulação de AGV no sistema, em particular de ácido acético (figura 3.4(c)). Aparentemente, as elevadas cargas de oleato aplicadas inibiram as arquea metanogénicas acetoclásticas. No final do período 8 quantificaram-se cerca de $2700 \text{ mg oleato L}^{-1}$ e $440 \text{ mg palmitato L}^{-1}$, valores bastante superiores aos descritos como capazes de induzir inibição das arquea metanogénicas. A interrupção da alimentação ao reator com vista à recuperação desta atividade parece ter sido eficaz durante o período 7, como mostra a diminuição da concentração de AGV / ácido acético e o reiniciar da produção de metano. Contudo, após os 16 dias de operação em “batch” do período 9 a recuperação do sistema ainda não tinha sido alcançada, verificando-se elevadas concentrações de AGV e um baixo rendimento em metano (5%, tabela 3.1).

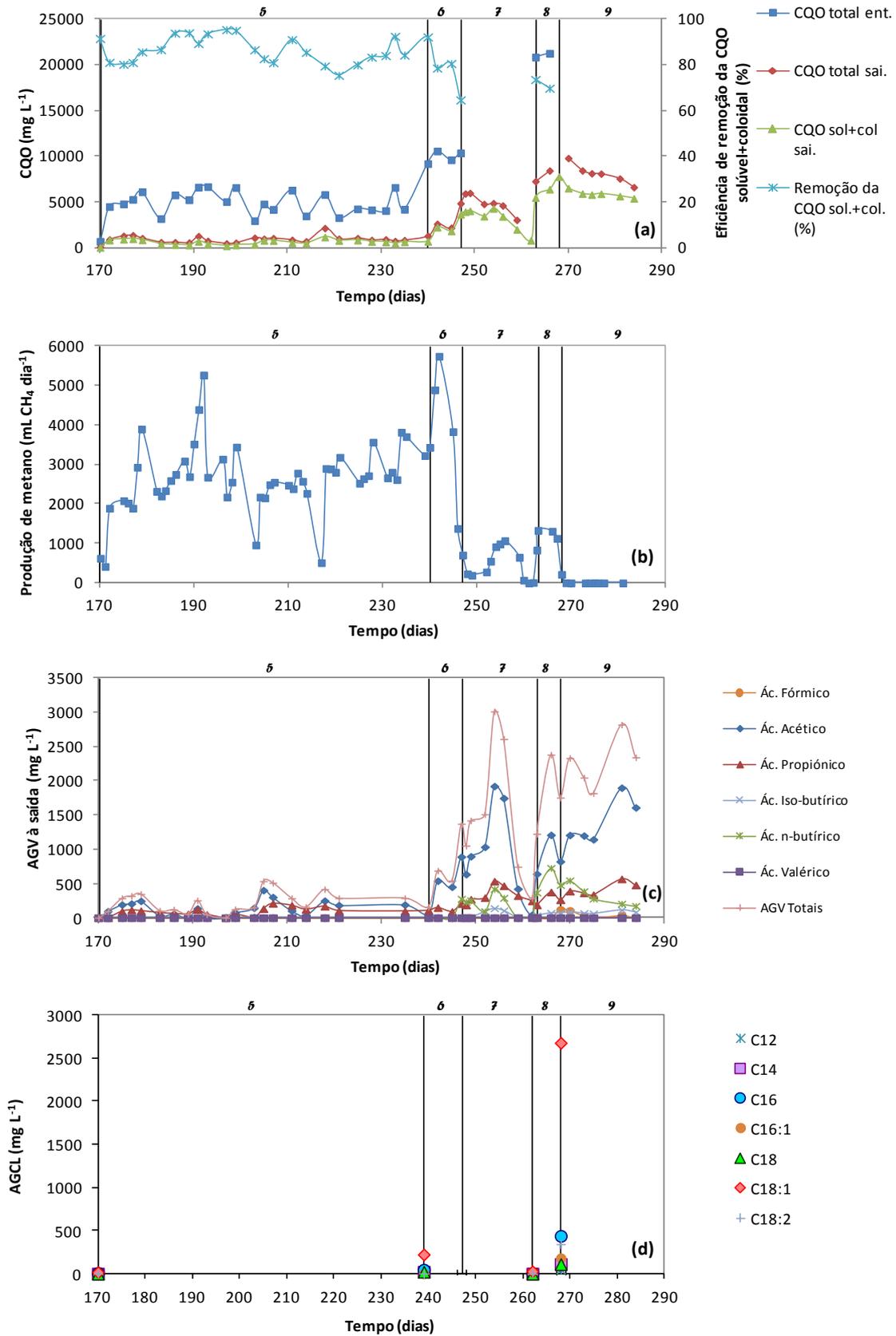


Figura 3.4 – Parâmetros de performance do reator durante o tratamento termofílico de um efluente sintético rico em oleato de sódio (5 - 9 representam os períodos de operação do reator).

Os sólidos suspensos voláteis (SSV) à saída do reator apresentaram valores relativamente constantes ao longo do tempo (cerca de 200 mg SSV L⁻¹), verificando-se um aumento a partir do período 5 de operação (figura 3.5), correspondendo ao período em que o reator deixou de ser alimentado apenas com leite, e se passou a adicionar também oleato na alimentação. Esta situação pode ser consequência da adsorção do oleato na biomassa, o que a torna flutuante e mais susceptível a ser eliminada por lavagem, conduzindo a um teor de SSV mais elevado na corrente de saída (Hwu, 1997). A perda de biomassa ativa também pode ter contribuído para a diminuição da atividade dentro do reator.

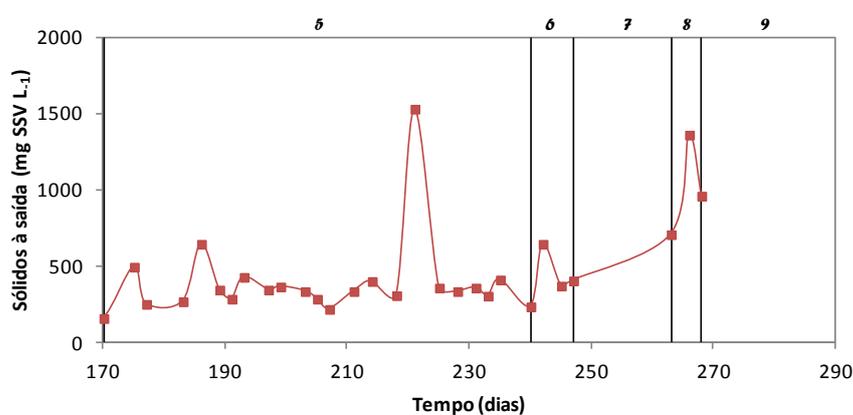


Figura 3.5 – Evolução da concentração de SSV na corrente de saída do reator, ao longo do tempo de operação. (1-9 representam os períodos de operação do reator).

No trabalho de Cavaleiro *et al.* (2009), que serviu de referência a este estudo os autores realizaram quatro ciclos sucessivos de fases contínuo/”batch” com a mesma carga orgânica aplicada, tendo verificado um aumento do rendimento de metano a cada ciclo. O quinto ciclo foi efetuado com carga orgânica aplicada superior, e o rendimento de metano foi também mais elevado. Os resultados obtidos neste estudo sugerem que poderia ter sido boa opção fazer vários ciclos sucessivos aplicando uma carga orgânica de 5 kg CQO m⁻³ dia⁻¹, até se alcançar um bom rendimento em metano, e só depois avançar para cargas orgânicas mais elevadas.

4. Conclusões

A adaptação de biomassa mesofílica a condições termofílicas foi alcançada com sucesso neste trabalho, tendo-se utilizado um método de aumentos graduais da temperatura de 5°C por semana. O aumento da temperatura, em particular na gama entre 45 e 55°C, levou a uma diminuição acentuada da produção de metano, tornando-se praticamente nula durante cerca de 50 dias. Após este período o sistema foi capaz de recuperar a sua atividade, alcançando valores elevados de remoção da CQO (93%) e produção de metano (aproximadamente 700 mL CH₄ dia⁻¹). A adaptação revelou-se um processo relativamente lento, uma vez que foram necessários cerca de 123 dias até estabilização do reator. Este processo de adaptação parece estar associado a uma inibição das arquea metanogénicas acetoclásticas e posterior seleção daquelas capazes de crescer ativamente a 55°C.

Após adaptação da biomassa testou-se o tratamento termofílico de um efluente sintético com oleato às cargas 5, 10 e 20 kgCQO m⁻³ dia⁻¹. As cargas mais elevadas obrigaram à aplicação de fases em “batch” para degradação do substrato acumulado, uma vez que a produção de metano diminuiu de forma acentuada e houve acumulação de AGV no sistema. Os resultados obtidos sugerem a necessidade de adaptar a biomassa ao oleato antes de avançar para as cargas orgânicas mais elevadas.

5. Referências Bibliográficas

- Alves, M.-M., Mota-Vieira, J.-A., Pereira-Alvares, R.-M., Pereira, M.-A., and Mota, M. (2001). Effect of lipids and oleic acid on biomass development in anaerobic fixed-bed reactors. Part I: Biofilm growth and activity. *Water Resource* **35**, 1
- Alves, M.-M., Pereira, M.-A., Sousa, D.-Z., Cavaleiro, A.-J., Picavet, M., Smidt, H., and Stams, A.-J.-M. (2009). Waste lipids to energy: how to optimize methane production from long-chain fatty acids (LCFA). *Microbial Biotechnology* **2(5)**, 538–550.
- Alves, M.-M., Picavet, M.-A., Pereira, M.-A., Cavaleiro, A.-J., and Sousa, D.-Z. (2007). Novel anaerobic reactor for the removal of long chain fatty acids from fat containing wastewater (patent WO2007058557).
- Angelidaki, I., Karakashev, D., Batstone, D.-J., Plugge, C.-M., and Stams, A., J.-M. (2011). Biomethanation and Its Potential. *Methods in Enzymology* **494**, 327-351.
- Angelidaki, I., Petersen, S.-P., and Ahring, B.-K. (1990). Effects of lipids on thermophilic anaerobic digestion and reduction of lipid inhibition upon addition of bentonite. *Appl Microbiol Biotechnol* **33(4)**, 469-472.
- APHA, AWWA, and WPCF. (1989). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. American Public Health Association, Washington, DC.
- Batstone. (1999). *High Rate Anaerobic Treatment of Complex Wastewater*. Tese de Doutorado. Universidade de Queensland.
- Bolzonella, D., Innocenti, L. and Pavan, P. (2003). Semi-dry thermophilic anaerobic digestion of the organic fraction of municipal solid waste : focusing on the start-up phase. *Bioresource Technology* **86**, 123-129.
- Bousková, A., Dohányos, M., Schmidt, J.-E., and Angelidaki, I. (2005). Strategies for changing temperature from mesophilic to thermophilic conditions in anaerobic CSTR reactors treating sewage sludge. *Water research* **39(8)**, 1481–8.
- Cavaleiro, A.-J., Salvador, A.-F., Alves, I.-A., and Alves, M. (2009). Continuous high rate anaerobic treatment of oleic acid based wastewater is possible after a step feeding start-up. *Environmental Science Technology* **43**, 2931–2936.
- Choorit, W., and Wisarnwan, P. (2007). Effect of temperature on the anaerobic digestion of palm oil mill effluent. *Electron. J. Biotechnol.* **10(3)**, 376–385.
- Cirne, D.-G., Paloumet, X., Bjornsson, L., Alves, M.-M., and Mattiasson, B. (2006). Anaerobic digestion of lipid-rich waste—Effects of lipid concentration. *Renewable Energy* **32**, 965-975.

- Colleran, E., and Pistilli, A. (1994) Activity test system for determining the toxicity of xenobiotics chemicals to the methanogenic process. *Ann. Microbiol. Enzimol.* **44**, 1.
- Del Borghi, A., Converti, A., Palazzi, E., and Del Borghi, M. (1999). Hydrolysis and thermophilic anaerobic digestion of sewage sludge and organic fraction of municipal solid waste. *Bioprocess Engineering* **20**, 553-560.
- Fang-Herbert, H.-P., and Lau-Ivan, W.-C. (1996). Startup of thermophilic (55°C) UASB reactors using different mesophilic seed sludges. *Water Science Technology* **34**, 445-452.
- Fdez-Güelfo, L.-A., Alvarez-Gallego, C., Sales Márquez, D., and Romero García, L.-I. (2010). Start-up of thermophilic-dry anaerobic digestion of OFMSW using adapted modified SEBAC inoculum. *Bioresource technology* **101(23)**, 9031–9.
- Ferrer, I., Vázquez, F., and Font, X. (2010). Long term operation of a thermophilic anaerobic reactor: process stability and efficiency at decreasing sludge retention time. *Bioresource technology* **101(9)**, 2972–80.
- Gannoun, H., Bouallagui, H., Okbi, A., Sayadi, S., and Hamdi, M. (2009). Mesophilic and thermophilic anaerobic digestion of biologically pretreated abattoir wastewaters in an upflow anaerobic filter. *Journal of Hazardous Materials* **170(1)**, 263–271.
- Gujer, W., and A. J. B. Zehnder, A.-J.-B. (1983) Conversion processes in anaerobic digestion. *Water Science and Technology* **15**, 127-167.
- Habets, L.-H.-A., Engelaar, A.-J.-H.-H., and Groeneveld, N. (1997) Anaerobic treatment of inuline effluent in an internal circulation reactor. *Water Science Technology* **35(10)**, 189-197.
- Harper, S.-R., and Pohland, F.-G. (1986). Recent developments in hydrogen management during anaerobic biological wastewater treatment. *Biotechnol Bioeng* **28(4)**, 585-602.
- Hwu, C.-S. (1997). *Enhancing anaerobic treatment of wastewaters containing oleic acid*. Tese de Douturamento, Wageningen Agricultural University, Wageningen, The Netherlands.
- Hwu, C.-S., and Lettinga, G. (1997). Acute toxicity of oleate to acetate-utilizing methanogens in mesophilic and thermophilic anaerobic sludges. *Enzyme and Microbial Technology* **21**, 297-301.
- Hwu, C.-S., van Lier, J.-B., and Lettinga, G. (1998b). Physicochemical and biological performance of expanded granular sludge bed reactors treating long-chain fatty acids. *Process Biochemistry* **33**, 75-81.
- Jaeger, K.-E., Ransac, S., Dijkstra, B.-W., Colson, C., van Heuvel, M., and Misset, O. (1994). Bacterial lipases. *FEMS Microbiol Rev.* **15(1)**, 29-63.

- Jetten, M.-S.-M., Stams, A.-J.-M., and Zehnder A.-J.-B. (1992). Methanogenesis from acetate: a comparison of the acetate metabolism in *Methanotherix soehngenii* and *Methanosarcina* spp. *FEMS Microbiol Rev* **88**, 181-197.
- Kabouris, J.-C., Tezel, U., Pavlostathis, S.-G., Engelmann, M., Dulaney, J., Gillette, R.-A., and Allen C. Todd, A.-C. (2009). Methane recovery from the anaerobic codigestion of municipal sludge and FOG. *Bioresource Technology* **100**, 3701–3705.
- Khemkhao, M., Nuntakumjorn, B., Techkarnjanaruk, S., and Phalakornkule, C. (2012). UASB performance and microbial adaptation during a transition from mesophilic to thermophilic treatment of palm oil mill effluent. *Journal of Environmental Management* **103**, 74-82.
- Kim, H.-W., Nam, J.-Y., Kang, S.-T., Kim, D.-H., Jung, K.-W., and Shin, H.-S. (2012). Hydrolytic activities of extracellular enzymes in thermophilic and mesophilic anaerobic sequencing-batch reactors treating organic fractions of municipal solid wastes. *Bioresource Technology* **110**, 130–134.
- Kuang, Y., Lepesteur, M., Pullammanappallil, P., and Ho, G.-E. (2002). Influence of co-substrates on structure of microbial aggregates in long-chain fatty acid-fed anaerobic digesters. *Lett Appl Microbiol* **35(3)**, 190-194.
- Lalman, J.-A. (2000). *Anaerobic degradation of linoleic (C18:2), oleic (C18:1) and stearic (C18:0) acids and their inhibitory effects on acidogens, acetogens and methanogens*. Tese de Doutorado, Universidade de Toronto, Canada.
- Lalman, J.-A., and Bagley, D.-M. (2001). Anaerobic degradation and methanogenic inhibitory effects of oleic and stearic acids. *Water Res.* **35(12)**, 2975-2983.
- Leja, K., Czaczyk, K., and Myszka, K. (2011). Biotechnological synthesis of 1,3-propanediol using *Clostridium* ssp. *African Journal of Biotechnology* **10(54)**, 11093-11101.
- Li, Y.-Y., Sasaki, H., Yamashita, K., Seki, K., and Kamigochi, I. (2002). High-rate methane fermentation of lipid-rich food wastes by a high-solids co-digestion process. *Water Sci Technol.* **45(12)**, 143-150.
- Neves, L., Pereira, M.-A., Mota, M., and Alves, M.-M. (2009) Detection and quantification of long chain fatty acids in liquid and solid samples and its relevance to understand anaerobic digestion of lipids. *Bioresource Technology* **100**, 91-96.
- Nielsen, H.-B., and Ahring, B.-K. (2006). Responses of the biogas process to pulses of oleate in reactors treating mixtures of cattle and pig manure. *Biotechnol Bioeng* **95(1)**, 96-105.
- Ortega, L., Barrington, S., and Guiot, S.-R. (2008). Thermophilic adaptation of a mesophilic anaerobic sludge for food waste treatment. *Journal of environmental management* **88(3)**, 517–25.

- Palatsi, J., Gimenez-Lorang, A., Ferrer, I., and Flotats, X. (2009). Start-up strategies of thermophilic anaerobic digestion of sewage sludge. *Water science and technology: a journal of the International Association on Water Pollution Research* **59(9)**, 1777–84.
- Pereira. (2003). *Anaerobic Biodegradation of Long Chain Fatty Acids*. Tese de Doutorado. Universidade do Minho.
- Pereira, M.-A., Pires, O.-C., Mota, M. and Alves, M.-M. (2002) Anaerobic degradation of oleic acid by suspended and granular sludge: identification of palmitic acid as a key intermediate. *Wat Sci Technol* **45**, 139–144.
- Pereira, M.-A., Pires, O.-C., Mota, M., and Alves, M.-M. (2005). Anaerobic biodegradation of oleic and palmitic acids: evidence of mass transfer limitations caused by long chain fatty acid accumulation onto the anaerobic sludge. *Biotechnol Bioeng* **92**, 15–23.
- Ribeiro. (1999). *Estudos dinâmicos do processo de digestão anaeróbia com vista ao desenvolvimento de um sistema inteligente de supervisão baseado em conhecimento*. Tese de mestrado. Universidade do Minho.
- Roy, F., Samain, E., Dubourguier, H.-C., and Albagnac, G. (1986). *Synthrophomonas sapovorans* sp. nov., a new obligately proton reducing anaerobe oxidizing saturated and unsaturated longchain fatty acids. *Arch Microbiol* **145**, 142–147.
- Sanders, W.-T.-M. (2001). *Anaerobic hydrolysis during digestion of complex substrates*. PhD thesis, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands.
- Schink, B. (1997). Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiol Mol Biol Rev.* **61(2)**, 262-280.
- Sousa. (2006). *Ecology and physiology of anaerobic microbial communities that degrade long chain fatty acids*. Tese de Doutorado. Universidade do Minho.
- Sousa, D.-Z., Smidt, H., Maria M. Alves, M.-M., and Stams, J.-M.-A. (2009). Ecophysiology of syntrophic communities that degrade saturated and unsaturated long-chain fatty acids. *FEMS Microbiol Ecol.* **68(3)**, 257-272.
- Thauer, R.-K., Jungermann, K., and Decker, K. (1977). Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriol Rev* **41**, 100–180.
- van Lier, J.-B. (1996). Limitations of thermophilic anaerobic wastewater treatment and the consequences for process design. *Antonie Van Leeuwenhoek* **69(1)**, 1-14.
- van Lier, J.-B., Tilche, A., Ahring, B.-K., Acarie, H., Moletta, R., Dohanyos, M., L.W. Hulshoff Pol, L.-W., Lens, P., and Verstraete, W. (2001). New perspectives in anaerobic digestion. *Water Science and Technology* **43(1)**, 1-18.

- Vavilin, V.-A., Vasiliev, V.-B., and Rytov, S.-V. (1996). Simulation of constituent processes of anaerobic degradation of organic matter by the “methane” model. *Antonie van Leeuwenhoek* **69(1)**, 15-23.
- Verger, R., and De Haas, G.-H. (1973). Enzyme reactions in a membrane model. 1. A new technique to study enzyme reactions in monolayers. *Chem Phys Lipids* **10(2)**, 127-136.
- Weiss, A., Jérôme, V., Burghardt, D., Likke, L., Peiffer, S., Eugen, M., Hofstetter., Gabler, R., and Freitag, R. (2009). Investigation of factors influencing biogas production in a large-scale thermophilic municipal biogas plant. *Appl Microbiol Biotechnol* **84**, 987–1001.
- Weng, C., and Jeris, J.-S. (1976). Biochemical mechanisms in methane fermentation of glutamic and oleic acids. *Water Res* **10**, 9–18.
- Whitman, W.-B, Bowen, T.-L, Boone, D.-R. (1992). The methanogenic bacteria. In: Balows, A., Trüper, H.-G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K.-H. eds. *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications*, 2nd edn., Vol. 1. New York: Springer-Verlag, pp. 719-767.
- Zehnder, A.-J., Huser, B.-A., Brock, T.-D., and Wuhrmann, K. (1980). Characterization of an acetate-decarboxylating, non-hydrogen-oxidizing methane bacterium. *Arch Microbiol* **124(1)**, 1-11.

Anexo I

Atividade metanogénica específica

Meio basal (tampão anaeróbio)

Na preparação do meio basal adicionou-se 1 mL/L de rezasurina (1g/L) a água destilada. De seguida ajustou-se o pH a um valor de 7 – 7.2, através da adição de NaOH ou HCl 8N. Por fim adicionaram-se 3.05 g/L de bicarbonato de sódio.

Cálculo da atividade metanogénica (acetotrófica)

Os valores de mV obtidos, representaram-se graficamente em função do tempo e calcularam-se os respetivos declives na zona linear inicial, em mV por hora. Os valores correspondentes ao aumento de pressão em mV/mL de ar injetado divididos pelos declives anteriores, exprimem os valores dos declives em ml de biogás produzido por hora (mL/h). Através da seguinte equação determinou-se a percentagem de metano presente no biogás (MP):

$$MP = \frac{(Vh+Vc)}{Vc} \times \%CH_4 \quad (I)$$

Vh representa o volume de gás presente inicialmente na garrafa

Vc corresponde ao volume de biogás produzido durante o teste

%CH₄ é a percentagem de metano presente no biogás em cada frasco (no final do ensaio)

Sendo Vh e Vc calculados através das seguintes equações:

$$Vh = \frac{\text{leitura em mV correspondente a 1 atm}}{\text{mV/mL}} \quad (II)$$

$$Vc = \frac{\text{leitura final, mV}}{\text{mV/mL}} \quad (III)$$

Multiplicando os mL de gás produzido numa hora por 24, pela percentagem de metano e pelo fator de calibração do transdutor (FC) e fazendo a divisão deste resultado pelos sólidos voláteis, obteve-se o valor final da atividade metanogénica específica

$$\text{Atividade metanogénica específica} = \frac{\text{mL/h} \times 24 \times \text{MP} \times \text{FC}}{\text{SV}} \quad (\text{IV})$$

que se expressa em $\text{mLCH}_4@PTN/\text{gSV.dia}$. O fator de calibração de cada transdutor é representado por FC, e permite a conversão dos valores para as condições normais de temperatura e pressão (PTN). Com os valores de atividade obtidos subtrai-se a atividade específica calculada para os brancos (calcula-se da mesma forma).

Cálculo da atividade metanogénica (hidrogenotrófica)

Nos substratos gasosos o decréscimo de pressão verificado, converteu-se diretamente em mL de CH_4 que foram produzidos em cada etapa de registo de pressão, utilizando a seguinte equação:

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

sendo que $P_{(n-1)}$ e $P_{(n)}$ correspondem aos mV nos tempos n-1 e n respetivamente. A produção total de gás corresponde ao somatório do volume de metano produzido em cada ponto.

Através do declive inicial da representação gráfica do volume de metano produzido ao longo do tempo, obteve-se a taxa inicial de produção de metano (mL/h). Assim sendo determinou-se a atividade metanogénica hidrogenofílica pela seguinte equação:

$$\text{Atividade metanogénica específica} = \frac{\text{mLCH}_4/\text{h} \times 24 \times \text{FC}}{\text{SV}} \quad (\text{VI})$$

expressa em $\text{mLCH}_4@PTN/\text{gSV.dia}$.

A atividade final foi obtida pela subtração dos valores de atividade nos ensaios em branco (atividade calculada da mesma forma).

Anexo II

Meio basal (tampão anaeróbio)

Nos testes de biodegradabilidade usou-se um meio basal descrito por Angelidaki and Sanders (2004). No parágrafo seguinte apresenta-se a composição dos diferentes reagentes utilizados na elaboração do meio basal. As concentrações apresentam-se em g L⁻¹ de água destilada.

(A) NH₄Cl, 100; NaCl, 10; MgCl₂·6H₂O, 10; CaCl₂·2H₂O, 5

(B) K₂HPO₄·3H₂O, 200

(C) resazurina 0.5

(D) FeCl₂·4H₂O, 2; H₃BO₃, 0.05; ZnCl₂, 0.05; CuCl₂·2H₂O, 0.038; MnCl₂·4H₂O, 0.05; (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O, 0.05; AlCl₃, 0.05; CoCl₂·6H₂O, 0.05; NiCl₂·6H₂O, 0.092; etilenodiaminoeteracetato, 0.5; HCl concentrado, 1 mL; Na₂SeO₃·5H₂O, 0.1

(E) mistura de vitaminas (mg L⁻¹): biotina, 2; ácido fólico, 2; ácido pirídico, 10; riboflavina, 5; tiamina hidrocloreto, 5; eianocobalamina, 0.1; ácido nicotínico, 5; ácido P-aminobenzóico, 5; ácido lipídico, 5; ácido DL-pentatiônico

Para a preparação de 1 litro de meio basal adicionou-se 974 mL de água destilada, 10 mL da solução (A), 2 mL da solução (B), 1 mL da solução (C), 1 mL da solução (D), 1 mL da solução (E), 0.5 g de cisteína hidrocloreto e 2.6 g de NaHCO₃.

Cálculo da produção específica de metano

No final calculou-se a produção específica de metano através da seguinte equação:

$$\text{Produção específica de metano (mL CH}_4\text{/gSV.dia)} = \frac{\text{mL/h} \times 24 \times \text{MP} \times \text{FC}}{\text{SV}} \quad (I)$$

onde

mL/h traduz a produção inicial de metano

MP corresponde à percentagem de metano no biogás produzido durante o teste e calculada de acordo com a equação *I* do anexo *I*.

FC é o fator de calibração do transdutor

SV representa o teor de sólidos voláteis presentes na garrafa

Aos valores obtidos foram subtraídos os valores calculados do mesmo modo para os ensaios em branco.