



Pedro Longueiro **Efeito de inibidores metanogénicos na digestão**
Helena **anaeróbia**



Pedro Longueiro
Heleno

Efeito de inibidores metanogénicos na digestão anaeróbia

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia do Ambiente, realizada sob a orientação científica do Professora Doutora Maria Isabel Aparício Paulo Fernandes Capela.

"O livro interior do leitor que somos é, paradoxalmente, o mais fechado e o mais aberto de todos os livros"

José M. Heleno

o júri

presidente

Professor Doutor Luís Manuel Guerreiro Alves Arroja

Professor Associado do Departamento de Ambiente e Ordenamento da Universidade de Aveiro

Professor Doutor Cheng Chia-Yau

Professor Auxiliar Convidado Faculdade de Engenharia - Universidade do Porto
(Arguente)

Professora Doutora Maria Isabel Aparício Paulo Fernandes Capela

Professora Associada do Departamento de Ambiente e Ordenamento da Universidade de Aveiro
(Orientadora)

agradecimentos

Gostaria de começar por agradecer à minha orientadora, Professora Isabel Capela, pela disponibilidade e prontidão no esclarecimento de dúvidas, na partilha de conhecimento científico, possibilitando a conclusão desta dissertação.

Em segundo lugar quero agradecer à Fátima Sousa, pelo apoio incondicional ao longo de todo o trajeto percorrido, no esclarecimento de dúvidas e paciência. De seguida, gostaria de agradecer à colega e amiga Tânia Gameiro pela coerência científica que atribuiu ao meu trabalho, por me fazer ver qualquer tipo de negligências minhas e pelas horas do seu trabalho que abdicou por mim.

À colega Cátia Couras por palavras e atos de amizade. Ao Tiago Pereira por horas partilhadas na biblioteca. Ao Doutor Flávio Silva e à Mestre Ana Pedrosa.

Aos amigos Carina Ferreira, Patrícia Rodrigues, Berta Oliveira, Carla Pequeno, Francisco Crespo, Francisco Roldão e Bruno Campino por o interesse e paciência demonstrados em ouvir os meus problemas.

Ao meu irmão João Heleno, pelo companheirismo e amizade desde sempre.

Por último, um agradecimento especial aos meus pais, José Morgado Heleno e Maria Teresa Longueiro, por todo o apoio e carinho cedido ao longo do meu percurso académico e vida.

palavras-chave

Tratamento de efluentes, digestão anaeróbia, inibição metanogênese, carga orgânica, ácidos orgânicos voláteis

resumo

O presente trabalho experimental teve como objetivo avaliar o grau de supressão da população metanogênica e o efeito de determinados inibidores da metanogênese na produção de ácidos orgânicos voláteis (AOV). Foram usados frascos *oxitops* e foram feitas medições da quantidade de metano produzido ao longo do tempo de incubação, num total de três etapas, utilizando soro de queijo como o substrato em estudo. Na primeira etapa foi estudada a concentração de substrato, entre 3,5 a 21 g CQO/L, a ser aplicada posteriormente nos testes com inibidores. Na segunda etapa foi avaliado o efeito do tipo de inóculo, utilizando inóculos recolhidos em datas distintas. Por último, foram testados cinco inibidores da metanogênese: BES, clorofórmio, alicina, alcalinidade e temperatura. Os testes com os inibidores resultaram no aumento da acidificação do meio e conseqüente diminuição da formação de metano. A alcalinidade foi o único inibidor testado que apresentou um efeito contrário, resultando num aumento da quantidade de metano formada com o aumento do poder tampão do meio. A concentração de BES mais baixa (20 mM, ensaio BES 1), com F/M de 1,2, obteve grau de acidificação e rendimento de conversão de substrato mais elevado, relativamente às restantes condições em que este inibidor foi testado. Utilizando 200 µM de clorofórmio (CHCl₃ 3) e rácio F/M de 0,8, obteve-se um grau de acidificação de 69% e um rendimento de conversão do substrato de 0,71 gCQO/gCQO_{removido}. Estas condições foram as que obtiveram melhores resultados, no que diz respeito à inibição da metanogênese e conseqüente acidificação. O efeito inibitório da alicina foi dissimulado pelo aumento da carga orgânica, podendo esta ter inibido também o processo de produção de AOV, obtendo-se grau de acidificação entre 27 e 38%. O aumento da temperatura de 20 para 33°C diminui o grau de acidificação e o rendimento de conversão do substrato a AOV em 12%.

keywords

Waste management, anaerobic digestion, methanogenic inhibition, organic load, volatile fatty acids

abstract

This experimental work aimed the evaluation of the suppression degree of methanogenesis and the effect of few methanogenic inhibitors in volatile fatty acids (VFA) formation. To succeed in this process oxiclones devices were used and the methane production was measured during the assays, divided in three steps, using cheese whey as substrate. In the first step, a range of applied organic load from 3,5 to 21 g COD/L was studied and applied in posterior assays. In the second step were tested two different types of inoculum, collected at different days. In the last step, five different methanogenic inhibitors were tested: BES, chloroform, allicin, alkalinity and temperature. The inhibition tests result in an increase of acidification and lower methane formation. Alkalinity was the only inhibitor that shows an opposite effect, decreasing the methane formation when the buffering capacity increases. Lower BES concentration and F/M of 1,2, rise the acidification degree (AD) and conversion yield comparing with other experiments using BES as inhibitor. With 200 μM of chloroform (CHCl_3) and F/M ration of 0,8, was obtained 69% of AD and a conversion yield of 0,71 gCOD/gCOD_{removed}. These conditions lead to methanogenic inhibition and increasing of acidification. The inhibitor effect of allicin was masked by the increasing of organic load, leading to AD in the range of 27 to 38%. With temperature increase from 20 to 33°C, the AD and the conversion yield decrease 12%.

Índice

1	Introdução.....	1
1.1	Enquadramento.....	1
1.2	Objetivos do presente trabalho	3
2	Revisão bibliográfica.....	5
2.1	Contextualização.....	5
2.2	Mudança de paradigma do tratamento de efluentes	6
2.2.1	A biorrefinaria	6
2.3	Resíduos agroalimentares: soro de queijo	7
2.4	Digestão anaeróbia.....	8
2.4.1	Hidrólise.....	9
2.4.2	Acidogénese	9
2.4.3	Acetogénese.....	10
2.4.4	Metanogénese	10
2.5	Inibidores da metanogénese.....	10
2.5.1	Inibidores específicos	12
2.5.1.1	BES (2-bromoetanosulfato)	12
2.5.1.2	Clorofórmio (CHCl ₃)	12
2.5.1.3	Alicina (<i>Allium sativum</i>).....	13
2.5.2	Inibidores não específicos	13
2.5.2.1	Temperatura.....	13
2.5.2.2	pH.....	14
2.5.2.3	Alcalinidade.....	14
2.6	Produtos de valorização obtidos na digestão anaeróbia	14
2.6.1	Produção de Hidrogénio - Dark fermentation.....	14
2.6.2	Produção de AOV em culturas mistas.....	16
3	Materiais e métodos	18
3.1	Materiais.....	18
3.1.1	Parâmetros de controlo	18
3.1.1.1	CQO.....	18
3.1.1.2	WTW <i>Oxitop</i> ®.....	19
3.1.1.3	Biogás	19
3.1.1.4	Ácidos Orgânicos Voláteis (AOV)	20
3.1.1.5	Sólidos Suspensos Totais e Voláteis.....	21
3.1.1.6	pH.....	22
3.1.1.7	Alcalinidade.....	22
3.2	Métodos	22
3.2.1	Inóculo	25

3.2.2	Substrato.....	26
3.2.3	Meio nutricional.....	26
3.2.4	Métodos analíticos.....	27
4	Resultados e discussão.....	30
4.1	Efeito da carga orgânica.....	30
4.1.1	pH ao longo do tempo.....	30
4.1.2	CQO e AOV ao longo do tempo.....	32
4.1.2.1	Reator de controlo ou Branco.....	34
4.1.3	efeito da concentração do substrato.....	35
4.2	Resposta do sistema a diferentes inóculos.....	43
4.2.1	Análise pH.....	43
4.2.2	CQO e AOV ao longo do tempo.....	45
4.2.3	Comparação do efeito de dois inóculos diferentes.....	47
4.2.4	Eficiência de remoção de CQO.....	56
4.3	Teste dos inibidores.....	58
4.3.1	BES.....	59
4.3.2	Clorofórmio – CHCl ₃	63
4.3.3	Alho (alicina) - Garlic.....	66
4.3.4	Testes térmicos (T1 e Ta) e de alcalinidade (A3 e A10).....	69
4.3.5	Comparação de resultados.....	74
5	Conclusão.....	80
	Referências bibliográficas.....	82
	Anexo A – Inibidores específicos e não específicos, descrição e referência.....	87

Índice de Figuras

Figura 1 – Princípios básicos de uma biorrefinaria.....	7
Figura 2 – Processo da digestão anaeróbia, imagem retirada de Liu <i>et al.</i> 2011.	9
Figura 3 – Processo de consumo e produção de hidrogénio na digestão anaeróbia, imagem retirada de Guo <i>et al.</i> 2010.....	16
Figura 4 – Cromatógrafo gasoso usado nas análises de biogás.....	20
Figura 5 – Cromatógrafo gás-líquido usado nas análises de AOV.....	21
Figura 6 – Análise de pH para as três réplicas de cada concentração de substrato analisada, A- 3,5 g CQO/L; B- 4,6 g CQO/L; C- 10 g CQO/L; D- 11 g CQO/L; E- 21 g CQO/L, para o primeiro dia, o dia 14 e último dia de operação.	31
Figura 7 - CQO e concentração de AOV totais ao longo do tempo para a réplica 1 dos ensaios: a) Carga 3,5 g CQO/L; b) Carga 4,6 g CQO/L; c) Carga 10 g CQO/L; d) Carga 11 g CQO/L; e) Carga 21 g CQO/L.	32
Figura 8 – Representação dos valores de AOV totais (em mg CQO/L) para as concentrações de substrato testadas ao longo do tempo (em dias).....	36
Figura 9 – Análise quantitativa e qualitativa de AOV para as diferentes concentrações de substrato estudadas, A- 3,5 g CQO/L; B- 4,6 g CQO/L; C- 10 g CQO/L; D- 11 g CQO/L; E- 21 g CQO/L.	37
Figura 10 - Relação entre o grau de acidificação obtido e a carga orgânica aplicada em cada ensaio.	39
Figura 11 - Composição da mistura de AOV obtida no final de cada ensaio, com as diferentes cargas orgânicas estudadas.	40
Figura 12 - Valores de SST e SSV para o primeiro dia (Dia 0) e último dia (Dia 24) para as diferentes cargas orgânicas testadas.	41
Figura 13 - Análise de pH para as duas réplicas do inóculo mais recente (LN) e uma réplica do inóculo menos recente (LA) de cada concentração de substrato analisada, A- 0,6 g CQO/L; B- 2 g CQO/L; C- 3g CQO/L; D- 4 g CQO/L; E- 6 g CQO/L, para o primeiro dia, o nono dia e último dia de operação.	44
Figura 14 - CQO e concentração de AOV totais ao longo do tempo para a réplica 1 e média do inóculo mais recente (LN) e menos recente (LA).....	46
Figura 15 - Evolução da concentração total de AOV ao longo do tempo para os dois tipos de inóculo com as diferentes condições aplicada.....	48
Figura 16 - Evolução da concentração de AOV individuais para cada ensaio, com LA e LN, para as diferentes concentrações de substrato estudadas.....	50
Figura 17 – Composição da mistura de AOV obtida no final de cada ensaio, com as diferentes cargas orgânicas.	52

Figura 18 - Relação entre o grau de acidificação obtido e a carga orgânica aplicada em cada ensaio: A – Lamas novas; B – Lamas antigas.	53
Figura 19 - SST e SSV obtidos em cada ensaio, medidos no início e no final de cada ensaio. A - Lamas novas; B - Lamas Velhas.....	55
Figura 20 - Remoção de CQO nos dois ensaios efetuados com lamas diferentes.	56
Figura 21 - pH medido no início e final do ensaio usando quatro condições estudadas de BES. ..	59
Figura 22 - Evolução de CQO e AOV nos ensaios com o inibidor BES.	60
Figura 23 - Composição da mistura de AOV obtida para o dia de produção máxima, para cada amostra de BES.	61
Figura 24 – Valores do grau de acidificação para as amostras de BES.....	62
Figura 25 - pH medido no início e final do ensaio usando três concentrações de clorofórmio.	63
Figura 26 – Valores CQO e AOV para as amostras usando clorofórmio ao longo do tempo.	64
Figura 27 - Composição da mistura de AOV obtida para o dia de produção máxima, para cada amostra de clorofórmio.....	65
Figura 28 - Valores do grau de acidificação para as amostras com clorofórmio.	65
Figura 29 - pH medido no início e final do ensaio usando três concentrações de alicina.	66
Figura 30 – Valores de CQO e AOV para as três amostras de alicina ao longo do tempo.	67
Figura 31 - Composição da mistura de AOV obtida para o dia de produção máxima, para cada amostra de alicina.	68
Figura 32 - Valores do grau de acidificação para as amostras da alicina.	69
Figura 33 – pH medido no início e final do ensaio para as amostras de alcalinidade, temperatura e branco.....	70
Figura 34 - Valores de alcalinidade para as amostras relativas ao teste da alcalinidade para o primeiro e último dia de operação.	70
Figura 35 - Valores de CQO e AOV para as amostras relativas à alcalinidade, temperatura e branco ao longo do tempo.....	71
Figura 36 - Composição da mistura de AOV obtida para o dia de produção máxima, para cada amostra da alcalinidade, temperatura e branco.....	72
Figura 37 - Valores do grau de acidificação para as amostras de alcalinidade, temperatura e branco.....	73
Figura 38 – Valores da produção de metano em percentagem.....	77
Figura 39 - SST e SSV obtidos em cada ensaio, medidos no início e no final de cada ensaio.	79
Figura 40 – Lista de inibidores específicos para a metanogénese, sua descrição e referência.	87
Figura 41 - Lista de inibidores não específicos para a metanogénese, sua descrição e referência.	88

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Parâmetros de controlo e frequência de análise.	18
Tabela 2 – Experiências realizadas, data da realização e duração das mesmas.	23
Tabela 3 – Etapa experimental 1 com representação das concentração de substrato usada, rácio F/M e número de réplicas efetuadas.	23
Tabela 4 – Etapa experimental 2 representação das concentrações de substrato usadas, rácio F/M e número de réplicas.	24
Tabela 5 – Etapa experimental 3 representação dos inibidores e condições usadas, da concentração do substrato teórico e real e número de réplicas.	25
Tabela 6 – Caraterização das Lamas Antigas.	26
Tabela 7 – Caraterização das Lamas Novas.	26
Tabela 8 – Composição nutricional do sistema.	27
Tabela 9 – Reta de calibração do CGL.	28
Tabela 10 – Fatores de conversão dos AOV.	28
Tabela 11 Parametros fisico-químicos obtidos para o ensaio sem adição de substrato: CQO solúvel, SST, SSV e pH.	35
Tabela 12 – Parâmetros analisados em cada carga orgânica testada.	38
Tabela 13 – Parâmetros analisados em casa carga orgânica utilizada.	51
Tabela 14 - Composição do biogás produzido em cada ensaio utilizando as lamas novas.	54
Tabela 15 - Eficiência de remoção para os ensaios efetuados com as lamas antigas.	57
Tabela 16 - Eficiência de remoção para os ensaios efetuados com lamas novas.	57
Tabela 17 - Tipo de inibidores e respetivas condições experimentais iniciais testadas.	58
Tabela 18 - Resumo dos parâmetros calculados para cada inibidor testado: BES, clorofórmio, alicina, alcalinidade e temperatura.	76

Lista de abreviaturas

- A10 - Alcalinidade 10 (10 mg CaCO₃/L)
A3 - Alcalinidade 3 (3 mg CaCO₃/L)
AOV - Ácidos Orgânicos Voláteis
BATCH - Reator descontínuo
BES - 2-bromoetanosulfato
CGL - Cromatógrafo Gás-Líquido
CH₄ - Metano
CHCl₃ - Clorofórmio
CO₂ - Dióxido de carbono
CQO - Carência Química de Oxigénio
CQOs - Carência Química de Oxigénio solúvel
DA - Digestão Anaeróbia
F/M - Food-to-Microorganism rácio
GA - Grau de acidificação
Garlic - Alho (alicina)
LA - Lamas Antigas
LN - Lamas Novas
SST - Sólidos Suspensos Totais
SSV - Sólidos Suspensos Voláteis
T1 - Temperatura 1 (33°C)
Ta - Temperatura ambiente (20°C)
 Y_{AOV} - Rendimento de conversão do substrato consumido em AOV
 $Y_{AOV/SSV}$ - Rendimento de conversão em AOV por unidade de biomassa inicial
 ΔAOV_T - Quantidade máxima de ácidos orgânicos voláteis produzidos

1 INTRODUÇÃO

1.1 ENQUADRAMENTO

Atualmente vive-se uma crise económica sem precedentes. A nível global os recursos não renováveis que consumimos desenfreadamente, juntamente com o abuso de fertilizantes químicos para desenvolver uma indústria agrícola que alimenta uma população em massa, são factos de uma exigência crescente sobre o nosso planeta e os seus recursos. Por isso é urgente mudar os costumes energéticos atuais, e assumir esforços para desenvolver outras formas energéticas essencialmente assentes nos recursos sustentáveis e renováveis. A temperatura média global não cessa de aumentar, o nível do mar, o buraco do ozono, entre outros, são problemas atuais e reais, não podemos continuar a evitá-los.

Desde a revolução industrial que se procura satisfazer uma população em constante crescimento, resultando num efeito nefasto para o meio ambiente, desta forma existe cada vez mais a preocupação na reutilização de todo o tipo de resíduos produzidos pelos seres humanos. A descarga de elevadas concentrações de matéria orgânica em bacias hidrográficas é um dos problemas em causa, a eutrofização causada pelo elevado teor de compostos azotados reduz a quantidade de oxigénio dissolvido na água, reduzindo então o número de espécies que dependem de oxigénio para viver [1]. O tratamento de efluentes tem vindo a sofrer uma mudança de paradigma, no qual se tenta promover uma economia linear. Ou seja, os resíduos voltam a ser usados como recursos fomentando uma economia verde.

Atualmente a dependência dos combustíveis fósseis é cerca de 80% [2]. Toda a nossa economia e plano energético é assente essencialmente na queima de combustíveis fósseis, na produção de plásticos, medicamentos, fertilizantes, que estão diretamente dependentes do petróleo. Por se tratar de um recurso finito com muita procura, o 'ouro negro' sofre constantes flutuações de preço. A utilização de recursos renováveis como a biomassa é um dos processos alternativos cada vez mais estudados [3]. Assim a partir da biomassa procede-se à produção de produtos de valor acrescentado como biopolímeros, ácidos orgânicos voláteis (AOV), hidrogénio, bioetanol, biodiesel, etc [3].

A finalidade deste estudo é a obtenção de AOV que servirão como percursos para a produção de bioenergia e biomateriais substituintes daqueles que têm origem

petroquímica. Neste sentido, foi desenvolvido o estudo de vários parâmetros por forma a maximizar a produção de AOV. A estratégia principal residiu na inibição da metanogénese (a última fase da digestão anaeróbia).

Relativamente ao tratamento aeróbio que apresenta soluções para organismos superiores, visto que no metabolismo aeróbio convencional a maior parte da matéria orgânica é convertida por via anabólica em biomassa celular, assim produz grande quantidade de lamas excedentários que requerem tratamento posterior [4]. Apesar da rentabilização, o tratamento anaeróbio está longe de conhecer soluções para ser aplicado à escala global. Porém este revela-se eficaz na medida que na gestão de efluentes líquidos, são produzidos uma série de nutrientes essenciais para a vida futura, sendo ainda possível valorizar os desperdícios através de critérios de sustentabilidade e auto eficiência energética [5].

As principais vantagens relativamente ao tratamento por vias aeróbias são:

- Baixa produção de biomassa por unidade de matéria orgânica removida;
- Baixa necessidade de recorrer a nutrientes inorgânicos (fósforo e azoto);
- Não necessita de arejamento;
- Subprodução de metano, tipicamente $0,35 \text{ Nm}^3/\text{kg CQO}$ removido [6];
- Elevada resistência a choques de carga;
- Elevada densidade de biomassa ativa, em condições favoráveis;
- Degrada compostos recalcitrantes (por exemplo leninha) e xenobióticos (p.e. organoclorados) e converte não só hidratos de carbono mas também proteínas e lípidos.

As principais desvantagens deste tipo de tratamento são:

- Taxas de remoção de substrato por unidade de biomassa mais baixas que o processo aeróbio;
- Devido a estas taxas baixas de remoção a fase de *lag* dos microrganismos também é maior, o que reverte em maiores períodos de adaptação;
- Necessidade de maiores tempos de residência, e maiores volumes dos reatores;
- Grande sensibilidade a compostos oxidantes (O_2 , H_2O_2 , Cl_2).

1.2 OBJETIVOS DO PRESENTE TRABALHO

O objetivo passa por definir um inibidor, entre vários, o mais eficiente e rentável na inibição de uma das etapas da digestão anaeróbia, neste caso a última, a metanogénese. Para isso é importante definir uma série de passos cruciais, tais como: como realizar a planificação da experiência, quais inibidores usar, em que quantidades e com que condições. Desta forma vai ser definido um teste inicial para saber em que condições a metanogénese é mais favorecida.

Portanto, pretende-se suprimir a metanogénese de modo a obter uma maior produção de ácidos orgânicos voláteis (AOV), obstando a última fase do processo de digestão anaeróbia pela aplicação de supressores metanogénicos.

Resumindo:

- Testar diferentes inibidores metanogénicos;
- Avaliar o grau de supressão da população metanogénica e o efeito na produção de AOV;
- Compreender os fenómenos físico-químico-biológicos que originam o tratamento anaeróbio através da identificação dos parâmetros cruciais para a otimização dos processos;
- Resolver eventuais perturbações dos sistemas e as medidas corretas a adotar no controlo e prevenção da metanogénese.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CONTEXTUALIZAÇÃO

A digestão anaeróbia ganhou automaticamente interesse científico assim que foi descoberta, no séc. XVII pelas mãos de Robert Boyle e Stephen Hale, que repararam na libertação de um gás inflamável ao depositarem resíduos em riachos e lagos. Em 1776, Volta percebeu que existia uma relação direta entre a quantidade de matéria orgânica e a quantidade de gás produzido. Já em 1808, Sir Humphry Davy determinou que um desses gases libertados era metano [7]. O primeiro digestor anaeróbio foi construído numa colónia de leprosos em Bombay, Índia, em 1859. Em 1868 Bechamp entendeu que isto se deve a um processo complexo microbial, mas foi na década de 90 (1890) que Omelianski isolou os microrganismos responsáveis pela libertação de hidrogénio, ácido acético e ácido butírico durante a formação de metano na produção de celulose. Coube também a este investigador compreender que a produção de metano se devia a uma relação entre o hidrogénio e o dióxido de carbono [8]. Em 1895 foi desenvolvida uma forma alternativa de produzir luz nas ruas de Exeter, Inglaterra, através do metano libertado nos esgotos da cidade, encaminhando-o para espécie de câmara fluorescente que emite luz. Também em Inglaterra foi construído o primeiro reator de tratamento de águas, com sedimentação e tratamento anaeróbio [7].

O reconhecimento académico chegou em 1930, através da investigação científica descobriu-se a bactéria anaeróbia e os microrganismos que facilitam o processo. Durante a Segunda Guerra Mundial a Alemanha e França desenvolveram investigações à volta do funcionamento das bactérias metanogénicas no processo de tratamento de estrume. À medida que foram feitos esforços científicos no desenvolvimento deste bioprocessos, emergiram novos equipamentos associados a novas técnicas de remoção de matéria orgânica, nomeadamente o reator, sistema fechado que recorre à utilização de temperaturas e velocidades de mistura com vista à otimização do tratamento por digestão anaeróbia. Assim surgem os vários tipos de reatores existentes atualmente (UASB, Plug-Flow, Batch, etc.) adequados para determinados tipos de efluentes e biomassa [9].

2.2 MUDANÇA DE PARADIGMA DO TRATAMENTO DE EFLUENTES

O tratamento de efluentes assume atualmente um papel diferente, entende-se que existe uma valorização anteriormente desprezada de um resíduo, de forma a rentabilizar economicamente um produto sem valor comercial.

2.2.1 A BIORREFINARIA

A biorrefinaria, ou uma refinaria biológica, consiste na refinação ou purificação de determinados compostos, aproveitando as propriedades específicas destes materiais orgânicos. É, portanto, um conceito que consiste na conversão da biomassa em biocombustíveis e produtos químicos que podem ser convertidos, posteriormente em eletricidade. Tal como numa refinaria de petróleo, o objetivo passa pela maximização dos seus inúmeros produtos, através da produção de compostos químicos em pequenos volumes mas com alto valor unitário, assim como grandes volumes de combustíveis líquidos de baixo valor e ao mesmo tempo gerar eletricidade [10, 11 e 12].

O principal recurso energético atual para o sector dos transportes (assim como na produção de químicos, aproximadamente 4%) é o petróleo [11]. O impacto da mudança sobre o atual paradigma energético irá afetar diretamente os costumes energéticos. Espera-se que em 2020 nos EUA 25% (comparando com 1994) dos químicos usados como matéria-prima na indústria petroquímica tenham origem em fontes renováveis como a biomassa [12].

As três áreas de aplicação das biorrefinaria são: biocombustíveis, energia e bioquímicos. Na área dos combustíveis e produção de químicos a biomassa poderá ser a única alternativa viável, porque se tratam de compostos ricos em carbono, para além do petróleo [11].

Existem dois tipos de biomassa convertível em biocombustíveis, os biocombustíveis de primeira geração que entram em competição direta com a indústria agroalimentar pela disputa de terra fértil, logo trata-se de uma questão associada a constrangimentos éticos. No caso dos biocombustíveis de segunda geração que são produzidos a partir de uma variedade de compostos lignocelulósicos, como os resíduos da agricultura, florestais e industriais. Estes têm como principais vantagens a fácil acessibilidade a baixo custo [11]

Na figura 1 estão apresentados os princípios básicos das biorrefinarias, as matérias-primas, processos e tecnologias envolvidas e produtos finais obtidos

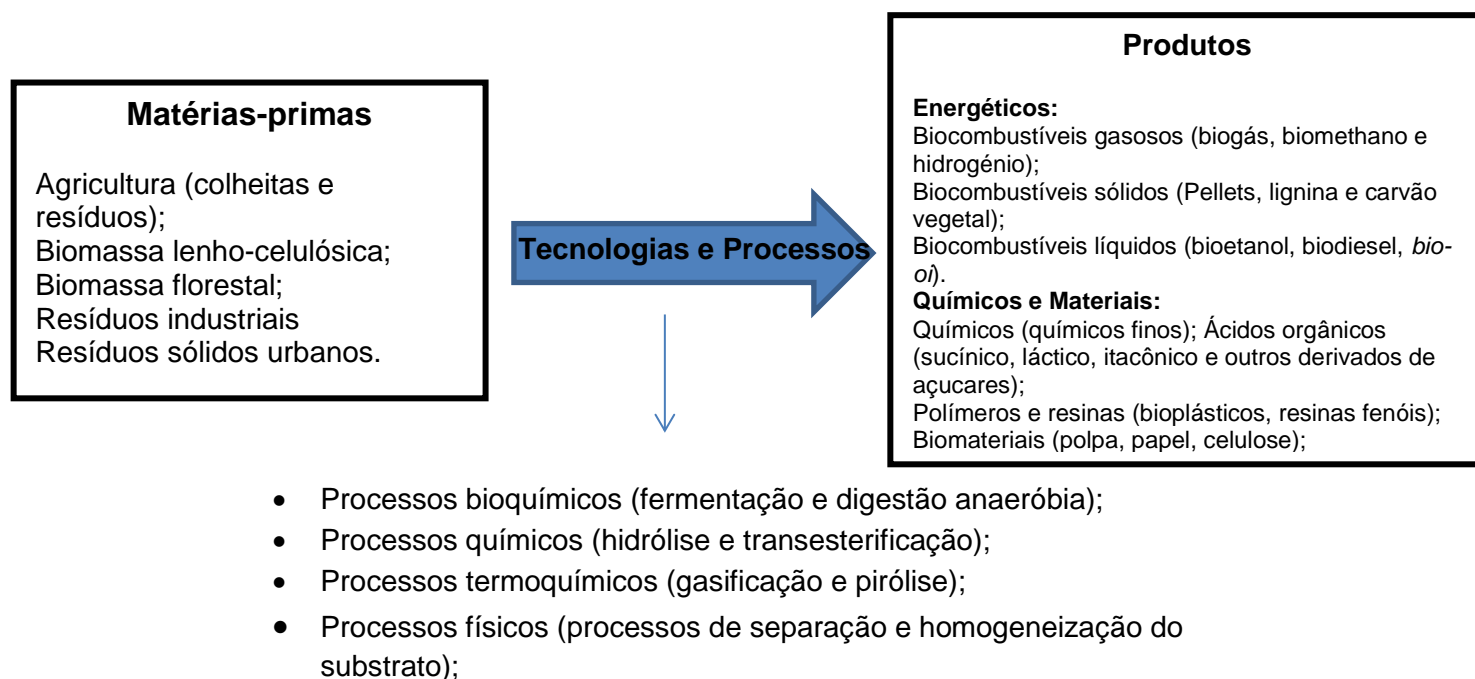


Figura 1 – Princípios básicos de uma biorrefinaria.

2.3 RESÍDUOS AGROALIMENTARES: SORO DE QUEIJO

O soro de queijo é oriundo da produção de leite, trata-se de um efluente que sem tratamento posterior é prejudicial ao ambiente [13]. É encarado então como um subproduto e não um resíduo, porque contém elevado valor nutricional e um alto teor orgânico (99% biodegradável) e salino; rico em hidratos de carbono e proteínas, nomeadamente, lactose e caseína, que poderá ser reaproveitado.

Este tipo de efluente poderá ser usado em várias áreas nomeadamente no(a):

- Tratamento biológico sem valorização;
- Tratamento biológico com valorização;
- Tratamento físico-químico;
- Aplicação direta no campo.

No primeiro caso tem-se o exemplo da digestão aeróbia, em que existe degradação do substrato com o objetivo de eliminar o conteúdo que é prejudicial ao meio ambiente, mas não existe valorização deste. Já no tratamento biológico com valorização tem-se várias técnicas, das quais: digestão anaeróbia, hidrólise da lactose, fermentação para etanol, hidrogénio ou ácido láctico e produção direta de eletricidade com recurso a células de combustíveis microbianas. Relativamente ao tratamento físico-químico é

possível valorizar o resíduo através da precipitação térmica e isoelétrica, da coagulação e floculação, da precipitação ácida e processos eletroquímicos e tecnologias de membrana, estas últimas são áreas em desenvolvimento [14].

Contudo existe uma série de contaminantes associados a este processo como o elevado conteúdo de gordura, sólidos suspensos e nutrientes (nomeadamente azoto e fósforo) [14].

Neste caso particular a área em estudo é o tratamento de um efluente a nível biológico com valorização dos seus produtos, a digestão anaeróbia. Concretamente a inibição da metanogénese permite a obtenção de Ácidos Orgânicos Voláteis, assim a lactose é convertida ácido propiónico e acético em quantidades superiores [14].

2.4 DIGESTÃO ANAERÓBIA

A Digestão Anaeróbia (DA) também conhecida como biogásificação ou metanização, é uma forma atrativa de tratar resíduos, é conseguido um controlo eficaz sobre a poluição, principalmente na obtenção, otimização e rentabilização de energia por vias “limpas”. Trata-se de um processo de metabolização desempenhado por um conjunto de bactérias e microrganismos, que na ausência de oxigénio (O_2) degradam um substrato orgânico biodegradável e produzem biogás, composto essencialmente por metano (CH_4) e dióxido de carbono (CO_2), existem porém pequenas porções de outros gases “contaminantes” (como por exemplo ácido sulfídrico (H_2S)). As tecnologias desenvolvidas de digestão anaeróbia permitem a valorização energética de uma grande variedade de resíduos orgânicos, nomeadamente resíduos pecuários, agrícolas, industriais e municipais. No entanto existem algumas complicações, como os níveis relativamente baixos na produção/obtenção de metano, assim como a elevada instabilidade associada a todo o processo, visto que depende de várias variáveis.

A DA tem diversas aplicações, inicialmente encarada unicamente como técnica aplicada ao tratamento de efluentes, nomeadamente na remoção da matéria orgânica [15]. Nos dias de hoje a DA é encarada como técnica de rentabilização de efluentes, principalmente na maximização de biogás [16] e na produção de hidrogénio [17].

A DA é definida pelas seguintes quatro etapas: hidrólise, acidogénese, acetogénese e metanogénese (figura 2).

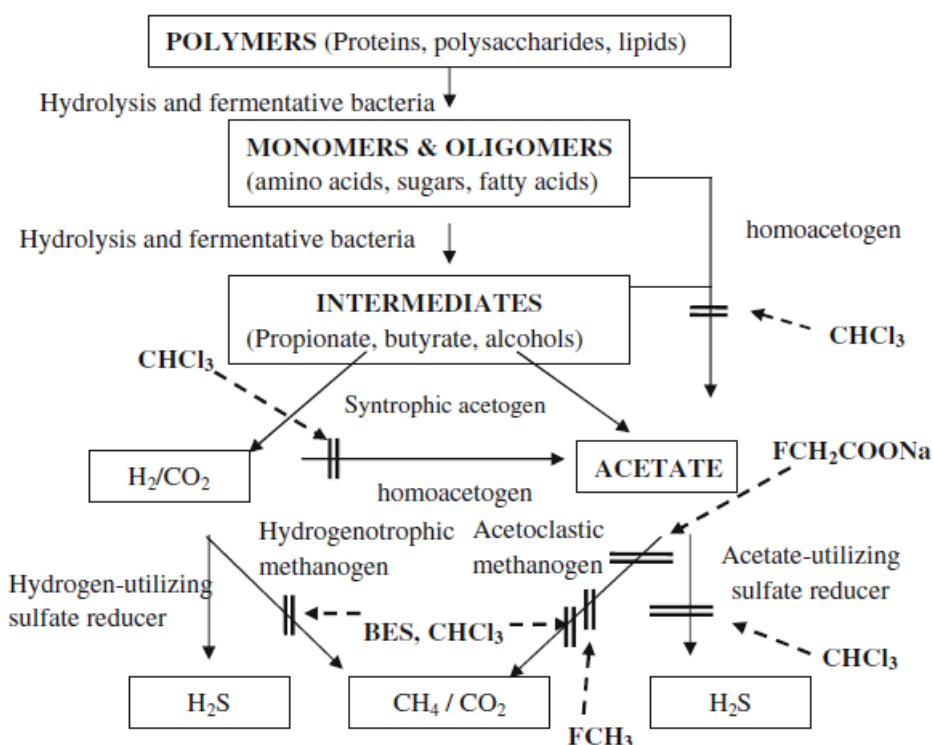


Figura 2 – Processo da digestão anaeróbia, imagem retirada de Liu *et al.* 2011.

2.4.1 HIDRÓLISE

A primeira etapa, a hidrólise, trata-se de uma conversão das moléculas complexas (proteínas, hidratos de carbono e lípidos) nos seus monómeros (aminoácidos, ácidos gordos e açúcares) pela ação dos microrganismos hidrolíticos, as bactérias fermentativas primárias [18]. Visto que se trata de uma etapa desempenhada por enzimas extracelulares, as bactérias não têm capacidade para armazenar material orgânico na forma particulada. A velocidade da hidrólise está diretamente dependente da superfície específica, do tipo de substrato, entre outras variáveis [19]. A velocidade global da etapa hidrolítica é lenta o que pode em substratos complexos piorar, e transformar-se na etapa limitante de todo o processo de degradação [20].

2.4.2 ACIDOGÉNESE

De seguida, dá-se a acidogénese, tem como substrato os monómeros obtidos no passo anterior, formam compostos intermediários tais como: AOV (ácido acético, ácido propiónico, ácido caproico, ácido butírico), álcoois (por exemplo etanol) e gases como o

CO₂, H₂ e sulfureto de hidrogénio [21]. É levada a cargo por série de bactérias fermentativas acidogénicas como por exemplo: *Clostridium*, *Bifidobacterium* e *Bacteroids*. É uma etapa em que as reações que se dão são termodinamicamente favoráveis, apresenta desta forma a maior taxa de crescimento de todo o processo.

2.4.3 ACETOGÉNESE

Na acetogénese, os produtos da acidogénese são metabolizados pelas bactérias homoacetogénicas e sintróficas que consomem o CO₂ e o H₂ produzidos na etapa anterior e produzem acetato.

2.4.4 METANOGÉNESE

Por último a fase que se pretende inibir, a metanogénese, que tem como substrato o ácido acético, metanol, metilaminas e hidrogénio (compostos com teor reduzido de carbonos) e resulta no biogás (50-70% de CH₄ e 30-40% de CO₂) [4]. As bactérias responsáveis por este tipo de ação pertencem a dois grandes grupos:

- Metanogénicas acetoclásticas: formam metano a partir do ácido acético, são microrganismos predominantes responsáveis por cerca de 60 a 70% de toda a produção de metano. Provêm de duas espécies fundamentais: *Methanosarcina* e *Methanosaeta* [22].
- Metanogénicas hidrogenotróficas: formam metano a partir do hidrogénio e dióxido de carbono, os géneros mais frequentemente isolados são: *Methanobacterium*, *Methanospirillum* e *Methanobrevibacter*.

2.5 INIBIDORES DA METANOGÉNESE

No presente trabalho pretende-se suprimir a metanogénese, a última fase da digestão anaeróbia pela aplicação de supressores metanogénicos. A inibição da metanogénese pode ser classificada em específica, na utilização de substâncias que afetam moléculas específicas das células metanogénicas e não específica, que afetam as funções gerais dos microrganismos [23].

Tecnicamente a inibição da metanogénese consiste na inibição dos grupos microbianos que consomem hidrogénio tais como [24]:

- Archaea metanogénicas;
- Bactérias sulfatoredutoras;
- Bactérias acetogénicas autotróficas.

Sabe-se que o estudo desenvolvido na área dos inibidores metabólicos é útil para aprofundar o nosso conhecimento sobre os processos microbiológicos no ambiente [25]. Foram testados vários químicos com o objetivo de estudar a importância relativa da inibição da metanogénese e outros processos de mineralização de carbono, tanto em culturas bacterianas como no ambiente [23]. Trata-se de um bioprocessamento complexo com vários fatores a influenciar a sua dinâmica. Por exemplo, sabendo que a sobrecarga orgânica produz um desequilíbrio entre a fermentação acidogénica e a metanogénese, faz com que a acumulação de ácidos orgânicos de baixo peso molecular provoque uma diminuição do pH, este, que por si só já é um inibidor não específico da metanogénese. Esta reação diminui o pH para valores em que as archaea metanogénicas se inibem ou morrem. Isto porque o pH provoca diferentes ações consoante o valor assumido, por exemplo, se a sobrecarga orgânica persistir e o pH assumir valores inferiores a 5.5, já existe consumo de hidrogénio (H_2), produto da acetogénese, através da solventogénese [24]. A monitorização do pH entre 5.5 e 6 é essencial para evitar este fenómeno [2].

Existem dois grupos de inibidores específicos químicos que interessam para o caso em estudo, as estruturas análogas da coenzima M ($HSCH_2CH_2SO_3$) e da HMG-CoA (Hidroximetilglutaril-SCoA). Relativamente à coenzima M faz parte o BES (2-bromoetanosulfato), o MES (2-mercaptoetanosulfonato), o CES (2-cloroetanosulfonato) e a lumazina [26]. No que toca à HMG-CoA temos os ácidos gordos saturados de cadeia média ou longa, os compostos azotados e fosfato, o etileno e acetileno, os hidrocarbonetos alifáticos e halogenados, o fluoroacetato e o fluorometano, na tabela do anexo A encontram-se descritas as suas áreas de ação.

Na figura 2 é visível onde três compostos químicos (clorofórmio, BES e fluorometano) atuam. Por exemplo, o clorofórmio ($CHCl_3$) age não só na inibição da metanogénese, como na acetogénese com a inibição das homoacetogénicas e das sintróficas acetogénicas, poderá inibir igualmente as bactérias sulfato redutoras na formação de ácido sulfídrico (H_2S), dependendo da concentração usada. O BES e o fluorometano atuam unicamente na formação do CO_2 e CH_4 [23].

No anexo A encontram-se representados um conjunto de inibidores químicos/específicos e não específicos juntamente com uma breve descrição das suas

áreas de ação, ainda assim, procedeu-se a uma caracterização dos inibidores usados mais pormenorizada.

2.5.1 INIBIDORES ESPECÍFICOS

2.5.1.1 BES (2-BROMOETANOSULFATO)

O BES é um análogo estrutural da coenzima M (CoM; HSCH₂CH₂SO₃), é um coFator envolvido da etapa terminal da biossíntese do metano, onde o grupo metil provindo do CoM é reduzido a metano. Trata-se, portanto, de um potente inibidor da metanogénese. É assumido que outras culturas bacterianas anaeróbias não são afetadas pelo BES, e os dados são interpretados com a interferência das metanogénicas noutros consorciuns bacterianos. Contudo, recentemente descobriu-se que o BES poderá inibir não-metanogénicas que reduzem PCBs (Bifenilos Policlorados) e etenos clorados [27], 10 mM de BES (98% de pureza, *Aldrich Netherlands*) são suficientes para inibir completamente a metanogénese [23, 28].

2.5.1.2 CLOROFÓRMIO (CHCl₃)

Ou triclorometano é um hidrocarboneto halogenado, um líquido incolor e volátil, é um anestésico externo, sendo muito tóxico, dependendo do nível e do tempo de exposição. Trata-se de um trihalometano, a sua presença na água é um Fator de poluição, como tal a lei só permite doses mínimas. Por ser demasiado volátil, teve de ser condicionado num frasco que impeça a penetração da radiação solar, para evitar a sua oxidação a fosgênio, gás tóxico e corrosivo prejudicial à saúde humana. O clorofórmio foi obtido pela primeira vez em 1831, por Liebig e Soubeiran, através do álcool etílico, sob ação de cloro e solução diluída de hidróxido de sódio. Em 1847 começou a ser usado como anestésico em procedimentos cirúrgicos, para mais tarde ser abolido devido ao seu elevado grau de toxicidade. A nível comercial o clorofórmio é obtido através da redução do tetracloreto de carbono. Este faz parte dos análogos estruturais da coenzima HMG-CoA (Hidroximetilglutanil-SCoA) [29]. Liu *et al.* (2011) diz que o CHCl₃ (99,99% de pureza, *Fisher Scientific UK*) varia consoante a concentração usada, poderá não só inibir as metanogénicas como as sulfato-redutoras na formação final de H₂S, as homoacetanogénicas e as sintróficas acetanogénicas na formação de acetato; especificamente na formação de metano inibe as acetoclásticas (degradam acetato) e as

hidrogenotróficas (consomem o H₂) [26]. A concentração indicada para inibir somente as metanogénicas é 100 µM [23], embora Liu *et al.* (2011) afirma que a dose ideal de CHCl₃ é 100 mM, o que não deve afetar a composição microbial do sistema [26].

2.5.1.3 ALICINA (*ALLIUM SATIVUM*)

O alho contém um composto natural chamado de alicina (dialil-tiosulfinato) que é conhecido como um possível inibidor da metanogénese [30]. No entanto existem estudos recentes que indicam a dose ideal de alicina para obter uma maior produção de AOV, entre 31.2 e 312 mg/L de alicina [31]. A fração de alicina no alho é de 0.5 - 9 mg_{alicina} /g_{alho} [32], no presente trabalho admitiu-se 0,7 mg_{alicina} /g_{alho}. No entanto, o mecanismo de inibição metanogénica com a alicina, não é conhecido; Gebhardt *et al.* (1996) propõe que está relacionado com a capacidade dos compostos organosulfúricos inibirem a redução da coenzima A (HMG-CoA) [33]. Feldberg *et al.* (1988) relaciona o efeito da inibição metanogénica com recurso a alho à inibição do ARN, ADN e a capacidade de sintetização de proteínas pela comunidade Archaea metanogénica [30].

2.5.2 INIBIDORES NÃO ESPECÍFICOS

2.5.2.1 TEMPERATURA

Existem relatos de duas gamas favoráveis à metanogénese uma situa-se na escala mesofílica é entre os 30-40°C, e outra termofílica entre 50-60°C [34]. Embora exista alguma ambiguidade em volta deste valor, Conrad *et al.* (2000) indica que a temperatura ideal ao favorecimento da metanogénese é 30 °C [23]. Já por si, Chen *et al.* (2008) realizou ensaios termofílicos e mesofílicos na digestão anaeróbia e relata que a 37°C a produção de AOV diminui e o rendimento de biogás aumenta, conclui ainda que um aumento na temperatura no geral tem um resultado positivo no ritmo metabólico, resulta numa maior produção de AOV, e numa consequente inibição da metanogénese [35]. Coates *et al.* (1996) reforça esta ideia e diz que a temperatura ideal de favorecimento da metanogénese ronda os 37°C [36].

2.5.2.2 PH

O pH tem interferência na atividade normal dos microrganismos, conduz à troca de carga entre as membranas celulares, influenciando posteriormente a ingestão de substâncias nutritivas, e a atividade enzimática durante os processos metabólicos [2]. Interfere nos produtos da fermentação e é um fator ecológico que influencia diretamente as bactérias na interação CH_4/CO_2 , o tipo de AOV acumulados e a velocidade específica de produção de H_2 [37]. A fase de *lag*, a fase de adaptação dos microrganismos é influenciada pelo pH, para pH iniciais baixos (4-4.5) as fases *lag* são mais prolongadas [2]. A metanogénese tolera valores de pH compreendidos entre os 6.5 e 7.5. Normalmente após a fase *lag*, dá-se um crescimento exponencial da população bacteriana acidogénica o que provoca a acidificação do substrato, reduzindo os valores de pH.

2.5.2.3 ALCALINIDADE

É possível maximizar a acidificação do substrato com a adição de altas alcalinidades, combinada com baixas cargas orgânicas [38]. É considerada alcalinidade moderada 2-3 g CaCO_3/L , a fase metanogénica revela uma sensibilidade alta à inibição e baixa à cinética da reação [39]. Para um grau de acidificação de 61%, Castro adicionou 7 g CaCO_3/L e um rácio F/M de 4 [38].

2.6 PRODUTOS DE VALORIZAÇÃO OBTIDOS NA DIGESTÃO ANAERÓBIA

2.6.1 PRODUÇÃO DE HIDROGÉNIO - DARK FERMENTATION

A degradação da biomassa e conseqüente rentabilização na produção de hidrogénio (H_2) através de processos anaeróbios revela-se a alternativa mais promissora nos próximos anos. Trata-se de uma espécie altamente energética (286 kJ/mol) e limpa, visto que só tem como produtos residuais água (H_2O). As formas mais promissoras de gerar H_2 envolvem a biofotólise indireta da água com recurso a algas verdes e a cianobactérias, a foto fermentação com bactérias fotossintéticas e a *dark fermentation* com um grupo restrito de bactérias anaeróbias [40].

Apesar de algumas limitações técnicas, como o alto custo de produção, dificuldades de armazenamento e métodos de distribuição, torna o conceito de

biorrefinaria eco amigável difícil mas possível. Atualmente 88% do hidrogénio comercial é derivado dos combustíveis fósseis (gás natural, petróleo e carvão) [41], do qual 70% deste tem origem direta na queima a vapor de nafta ou gás natural, na gasificação do carvão e na eletrólise da água [17].

O aproveitamento de resíduos agrícolas, resíduos alimentares e efluentes, tudo o que seja orgânico com misturas bacterianas complexas e rico em hidratos de carbono, é útil na produção com ponto de vista económico de H_2 . Isto significa que a matéria-prima deste processo energético é de fácil acesso, sem custo e altamente biodegradável, com a possibilidade de rentabilização de um resíduo a nível ambiental. Em Portugal são gerados em média 515 kg de resíduos municipais por pessoa por ano, o que dá em média 1,4 kg de resíduos diários (informação fornecida por Eurostat), neste caso são resíduos com potencial energético desperdiçado. As bactérias degradam a matéria orgânica e libertam H_2 e CO_2 , enquanto a maior parte dos hidratos de carbono são convertidos em AOV de cadeia longa. Embora os AOV e proteínas também estejam envolvidos no processo de formação de H_2 , a fermentação dos hidratos de carbono em H_2 é um processo termodinamicamente favorável [17]. Na figura 3 tem-se uma representação esquemática do bioprocessos de produção de H_2 por tratamento anaeróbio. No processo esquemático é possível visualizar as vias de consumo (setas a tracejado) e produção (setas a cheio) envolvidas no processo; uma vez inibindo a metanogénese e as bactérias sulfato-redutoras privilegia-se a formação de H_2 , ácido acético e ácido butírico [40].

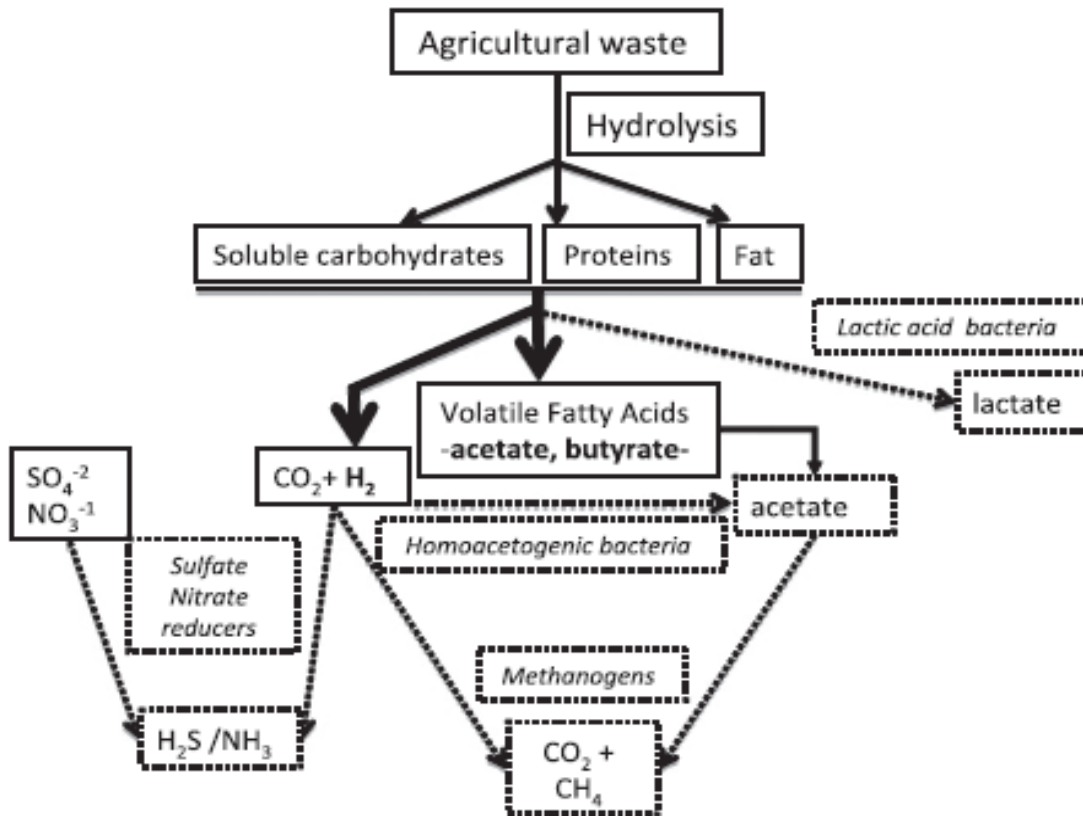


Figura 3 – Processo de consumo e produção de hidrogénio na digestão anaeróbia, imagem retirada de Guo *et al.* 2010

2.6.2 PRODUÇÃO DE AOV EM CULTURAS MISTAS

A produção de biogás envolve processos de natureza complexa, a formação de metano que se descreve como uma etapa relativamente lenta, é precedida por uma fase de atividade exponencial levada a cargo das bactérias fermentativas acidogénicas. Nesta etapa da DA são produzidos Ácidos Orgânicos Voláteis (AOV), que são ácidos gordos de cadeia curta compostos principalmente acetato e butirato (formas ionizadas do ácido acético e butírico) e são rapidamente produzidos a partir da fração da biomassa não lenhosa por intermédio do consórcio de microrganismos anaeróbios [3].

Os principais AOV obtidos, como produto da inibição metanogénica são o ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico, ácido valérico e o ácido caproico. Para além dos ácidos ainda se obtém pequenas quantidades de acetona, metanol, butanol, metilaminas e hidrogénio; essencialmente compostos com baixo número de carbono [2]. Estes ácidos, cetonas, álcoois e aminas são úteis como matéria-prima da indústria química para a produção de fertilizantes e na indústria de alimentação animal. Os AOV são os

intermediários chave na transformação da matéria orgânica em ambientes anaeróbios [29]. Quantitativamente ácido acético é o principal substrato para as metanogénicas e na formação de sulfato em meios líquidos, as sulfato-redutoras competem potencialmente com as bactérias acetoclásticas metanogénicas na degradação do acetato [42, 43 e 44]. A inibição total das sulfato-redutoras é conseguida com 5 mM de molibdato de sódio [29]. McCarty (1964) considera 72% do metano produzido utiliza como substrato ácido acético, 13% provém do ácido propiónico e 15 % de outros AOV intermediários que embora sejam significantes, são de importância menor [45].

Quando existe uma maximização na produção de AOV, nomeadamente ácido acético e ácido butírico em grandes quantidades, dá-se a acumulação de H_2 e o pH permanece entre o 4,5 e 6. Um ligeiro aumento na gama de pH muda a tendência e provoca a degradação do ácido acético e ácido butírico e dá-se a acumulação de etanol e ácido propiónico em maiores quantidades [40].

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

3.1.1 PARÂMETROS DE CONTROLO

Os parâmetros de controlo são apresentados na tabela 1 assim como a frequência da análise:

Tabela 1 – Parâmetros de controlo e frequência de análise.

Parâmetro	Frequência de análise
Sólidos Suspensos Totais (SST)	Primeiro e último dia
Sólidos Suspensos Voláteis (SSV)	Primeiro e último dia
Carência Química de Oxigénio solúvel	Diariamente
pH/alcalinidade*	Primeiro e último dia
AOV formados	Duas vezes por semana**
Produção de biogás (CH ₄ /CO ₂)	Duas vezes por semana**

*Alcalinidade foi medida na última etapa experimental.

**As medições realizadas estiveram diretamente dependentes da disponibilidade do equipamento.

Foram realizadas análises da CQO ao soro de queijo e análises de caracterização das lamas com os parâmetros SST e SSV. A frequência de análise dos AOV formados poderá não ser duas vezes por semana devido a dificuldades técnicas com o material de medição. Não houve possibilidade de medição da formação de H₂.

3.1.1.1 CQO

A Carência Química de Oxigénio (CQO) é um parâmetro que mede a quantidade de amostra suscetível de oxidação, portanto, o carbono susceptível de ser consumido pela população microbiana em condições controladas. Para determinação deste parâmetro foi usado o método de refluxo fechado por espectrofotometria (método 5220 D descrito em APHA (1998)). Foram adicionados 1,5 mL de dicromato de potássio (K₂Cr₂O₇), a 3,5 mL de ácido sulfúrico com prata (sulfato de prata (Ag₂SO₄)) e 2,5 mL de

amostra. Os tubos foram digeridos a 150°C durante duas horas. Depois de arrefecer procedeu-se à medição por absorvância, através do espectrofotómetro de marca AQUALYTIC® (modelo PC023212), que converte as absorvâncias em concentração (mg O₂/L). O dicromato de potássio é usado como oxidante devido a sua grande capacidade de oxidação e aplicabilidade a uma grande variedade de amostras e facilidade de manuseamento. Os compostos orgânicos são oxidados 95-100% do valor teórico. No presente trabalho só foram feitas análises a CQO solúvel (CQOs), isto significa que as amostras foram previamente filtradas ou centrifugadas. Foram sempre realizadas duas réplicas.

3.1.1.2 WTW OXITOP®

Para a realização da parte experimental foram usados pequenos reatores descontínuos de determinação da degradação anaeróbia e biogás, *WTW Oxitop* com controlador OC110 (modelo BA31116e03). Os reatores são selados com um septo, para que o oxigénio não entre em contacto com atmosfera interior e purgadas com azoto (N₂) antes de seladas. O volume nominal do *oxitop* é de 320 mL e foi definido um volume reacional de 150 mL e um volume de gás interior de 170 mL. Para uma otimização dos resultados o volume reacional tem de ser 50% do volume do *oxitop* [46]. Através da evolução da diferença de pressão dentro do *oxitop* é possível determinar variáveis de um determinado bioprocessos (produção de metano, consumo de oxigénio, entre outras) e relacioná-las com outras variáveis secundárias (crescimento de biomassa, consumo de substrato, entre outros). A concentração de CO₂ é diretamente proporcional às diferenças de pressão registada pelas cabeças dos *oxitops*, infelizmente a maior parte das cabeças usadas estavam danificadas e houve pouca informação útil proveniente das cabeças de *oxitop*. A aquisição dos dados a nível computacional é feita com o *software Achat OC*.

3.1.1.3 BIOGÁS

O biogás foi medido com auxílio de um cromatógrafo gasoso da marca SRI, modelo 8610 C, equipado com detetor da condutividade térmica (TCD) (figura 4). Este equipamento fornece valores de metano (CH₄), dióxido de carbono (CO₂) e outros compostos gasosos, numa só variável denominada de "Ar" (N₂, H₂, H₂S, etc.). Os valores são obtidos em percentagem (v/v). O gás de arraste é Hélio e o seu caudal é 10 mL.min⁻¹. A coluna é uma coluna capilar com 0,53 mm de diâmetro interno; o forno encontra-se a

60 ± 1 °C, durante os cinco minutos de análise. O volume de amostra foi de 2 mL e os resultados foram analisados no *software* de integração *Peak Simple* (2004), versão 3.29.



Figura 4 – Cromatógrafo gasoso usado nas análises de biogás.

O aparelho foi calibrado com um padrão gasoso de composição conhecida, constituído por 70% de CH_4 e 30% de CO_2 , sendo o output dado em área. São visíveis três picos distintos, o primeiro é a área (ou quantidade) de ar na amostra, o segundo que ocorre ao tempo de retenção aproximadamente 1,05 minutos corresponde à área de metano, e o terceiro e último ao minuto de retenção 2,05 corresponde à área de CO_2 . A passagem de área a percentagem é dada pelas equações 1 e 2:

$$\%CH_4 = 0,9896 \times \frac{A_{CH_4}}{A_{Ar}} \times 100 \quad (1)$$

$$\%CO_2 = 0,9924 \times \frac{A_{CO_2}}{A_{Ar}} \times 100 \quad (2)$$

3.1.1.4 ÁCIDOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS (AOV)

Os AOV foram analisados com recurso a um cromatógrafo gás-líquido (CGL) de marca *Perkinelmer clarus 480* (figura 5), equipado com uma coluna capilar *Chrompack* (modelo CPSIL-5CB) de dimensões 25x0.25 (mm). O gás de arraste é hélio, os gases constituintes da chama FID (*Flame Ionisation Detector*) são o H_2 e Ar. A chama FID é um instrumento científico que mede a concentração de espécies orgânicas numa corrente gasosa. As temperaturas envolvidas no processo variam, a temperatura do detetor é de 240°C, a temperatura do injetor é de 300 °C e a temperatura do forno onde se encontra a

coluna, 70 °C. O *software* de integração é o *Totalchrom Navigator*, sendo o tempo total de análise por amostra de 12,17 minutos. O volume a analisar por amostra é 0,5 µL e estas são filtradas previamente, acidificadas com ácido fórmico (1:10 (v/v)) e refrigeradas a 4 °C em *ependorfs*.



Figura 5 – Cromatógrafo gás-líquido usado nas análises de AOV.

3.1.1.5 SÓLIDOS SUSPENSOS TOTAIS E VOLÁTEIS

Os Sólidos Suspensos Totais e Voláteis são dois parâmetros de caracterização do inóculo: o teor de Sólidos Suspensos Totais (SST) corresponde à massa de água evaporada da amostra. O teor de Sólidos Suspenso Voláteis (SSV) corresponde à fração de matéria orgânica presente na amostra. Para determinação dos SST, as amostras são colocadas na estufa a 105°C durante 24 horas, de forma a garantir a evaporação de toda a fase líquida presente na amostra. Para os SSV, as amostras vão 2 horas à mufla a 550°C, para evaporar toda a matéria orgânica presente na amostra, ficando a matéria inerte. O cálculo destas duas frações foi realizado segundo os métodos descritos no *Standard Methods* da APHA (1998) (nos métodos 2540B, 2540D, 2540E e 2540G), está exemplificado nas equações 3 e 4:

$$SST \left(g \frac{SST}{L} \right) = \frac{m_{estufa}(g) - m_{cadinho+filtro}(g)}{Volume_{filtração}(L)} \quad (3)$$

$$SSV \left(g \frac{SSV}{L} \right) = \frac{m_{estufa}(g) - m_{mufla}(g)}{Volume_{filtração}(L)} \quad (4)$$

Em que:

$m_{cadinho+filtro}$ = massa do cadinho mais o filtro (g);

m_{estufa} = massa do cadinho após estufa(g);

m_{mufla} = massa do cadinho após mufla(g);

$Volume_{filtração}$ = Volume usado na filtração (L);

3.1.1.6 PH

Este parâmetro foi medido com auxílio de um aparelho da marca *Consort* modelo C-535 acoplado com um elétrodo de pH de xerolite.

3.1.1.7 ALCALINIDADE

A alcalinidade foi determinada segundo o método 2320 descrito em *Standard Methods* APHA (1998), usando o aparelho *Consort* modelo C-535 para medir o pH. O volume de ácido clorídrico (HCl) usado na titulação e o volume de amostra (mL) foram registados e a titulação foi feita até se atingir o valor de pH de 4,5. O cálculo deste parâmetro está descrito na equação 5:

$$Alcalinidade \left(\frac{mg \text{ CaCO}_3}{L} \right) = \frac{V_{HCl} \times N_{HCl} \times 50000}{V_{amostra}} \quad (5)$$

Em que:

V_{HCl} = Volume de HCl usado na titulação (mL);

N_{HCl} = Normalidade do HCl (eq/mol), neste caso a normalidade é igual à molaridade (mol/L);

$V_{amostra}$ = Volume de amostra usado na titulação (mL);

3.2 MÉTODOS

Para a realização desta experiência foram disponibilizados 16 reatores batch (*WTW Oxitop*), com um volume nominal de 320 mL e foi usado um volume reacional de

150 mL. Com agitação e uma temperatura de incubação de 37,5°C, o tempo de incubação variou consoante a etapa de análise, como é explicado na tabela 2:

Tabela 2 – Experiências realizadas, data da realização e duração das mesmas.

Etapa	Data de início	Duração (dias)	Teste
1	13/3/2013	23	Metanogénese
2	4/6/2013	15	Inóculo/Carga Orgânica
3	18/9/2013	16	Inibidores

Na primeira etapa foi testada a gama de concentrações de substrato mais favorável à metanogénese, para posteriormente se testar os inibidores escolhidos. Na tabela 3 estão apresentadas as concentrações de substrato usadas na primeira etapa e os respetivos rácios F/M.

Tabela 3 – Etapa experimental 1 com representação das concentração de substrato usada, rácio F/M e número de réplicas efetuadas.

Concentração do Substrato (g CQO/L)	Rácio F/M	Réplicas (#)
3,5	1	3
4,6	1,25	3
10,08	2,35	3
10,68	2,25	3
21,34	4,35	3
Branco	0,76	1

Na segunda etapa experimental, foram testadas dois tipos de inóculo referentes a datas distintas de recolha, um de Março de 2013 (data da primeira etapa experimental) que se nomeou Lamas Antigas, e outras recolhidas em Maio de 2013, denominadas Lamas Novas. Testaram-se cargas orgânicas baixas, entre 0,6 a 6 g CQO/L (tabela 4). Nesta fase experimental o branco foi realizado com a fração das lamas novas.

Tabela 4 – Etapa experimental 2 representação das concentrações de substrato usadas, rácio F/M e número de réplicas.

Concentração de Substrato (g CQO/L)	Rácio F/M		Réplicas (#)	
	Lamas Antigas	Lamas Novas	Lamas Antigas	Lamas Novas
0,5	0,5	0,17	1	2
2	1,25	0,58	1	2
3	1,57	0,83	1	2
4	1,83	1	1	2
6	2,3	1,4	1	2
Branco	-	0,37	-	1

Relativamente à terceira experiência foram testados os inibidores químicos BES e clorofórmio. O BES já é usado como inibidor, e neste trabalho estudou-se a sua resposta à variação da carga orgânica e da concentração de BES introduzida, tomando em consideração o substrato testado [23, 29]. Na tabela 5 estão resumidas as condições desta experiência, em que BES 1, BES 2, BES 3 e BES 4 são referentes às quatro variações; o BES 1 contém 20 mM de BES e uma carga orgânica de 8 g CQO/L, o BES 2 contém 60 mM de BES e 10 g CQO/L de carga orgânica, o BES 3 tem 20 mM de BES e 11 g CQO/L de substrato e o BES 4 contém 60 mM de BES e uma carga orgânica de 15 g CQO/L. Para o clorofórmio as três variações foram feitas nas concentrações de clorofórmio usadas, 10, 100 e 200 μM , todas com uma concentração de substrato de 5 g CQO/L. Os parâmetros dedicados ao estudo do efeito da alcalinidade, foram o A3 e A10, que contêm 2308 e 6150 mg CaCO_3/L de alcalinidade, respetivamente. Os ensaios em que foi estudada a alicina como inibidor foram adicionados 14, 200 e 312 $\text{mg}_{\text{alicina}}/\text{L}$, correspondendo aos ensaios Garlic 1, Garlic 2 e Garlic 3 respetivamente. Os ensaios térmicos foram incubados a 32°C (T1) e 20°C (Ta), com uma carga orgânica de 4,6 e 5 g CQO/L, respetivamente. Não foi aplicado qualquer inibidor ao branco.

Tabela 5 – Etapa experimental 3 representação dos inibidores e condições usadas, da concentração do substrato teórico e real e número de réplicas.

Inibidor	[Inibidor]	[S]Teórica	[S]Real (aprox.)	Réplicas (#)
BES 1	20 mM	5 g CQO/L	8 g CQO/L	1
BES 2	60 mM	5 g CQO/L	10 g CQO/L	1
BES 3	20 mM	8 g CQO/L	11 g CQO/L	1
BES 4	60 mM	8 g CQO/L	15 g CQO/L	1
CHCl ₃ 1	10 µM	5 g CQO/L	5,6 g CQO/L	1
CHCl ₃ 2	100 µM	5 g CQO/L	5 g CQO/L	1
CHCl ₃ 3	200 µM	5 g CQO/L	5 g CQO/L	1
A 3	3 g CaCO ₃ /L	5 g CQO/L	6 g CQO/L	1
A 10	10 g CaCO ₃ /L	5 g CQO/L	5,5 g CQO/L	1
Garlic 1	14 mg alicina/L	5 g CQO/L	16,8 g CQO/L	1
Garlic 2	200 mg alicina/L	5 g CQO/L	35 g CQO/L	1
Garlic 3	312 mg alicina/L	5 g CQO/L	45 g CQO/L	1
T1	32 °C	5 g CQO/	4,6 g CQO/L	1
Ta	20 °C	5 g CQO/	5 CQO/L	1
Branco	0	5 g CQO/	5 g CQO/L	1

As concentrações de clorofórmio foram variando tomando em consideração estudos prévios [23, 26]. Os ensaios térmicos e de alcalinidade tiveram como objetivo de estudar uma gama de inibição não específica pouco desenvolvida [34, 47]. O teste ao inibidor específico orgânico, a alicina, foi realizado tendo por base o estudo realizado nesta área [30-33].

3.2.1 INÓCULO

O consórcio de microrganismos foi recolhido na ETAR Norte da SIMRIA, em Aveiro. Foi obtido de um digestor anaeróbio que opera em condições mesofílicas para digerir lamas ativadas excedentárias, que depois de recolhidas são armazenadas em condições anaeróbias a 4°C.

Foram usadas e testadas lamas recolhidas em três períodos distintos. Estas lamas foram caracterizadas através dos parâmetros de sólidos suspensos totais e voláteis (SST e SSV), correspondente à quantidade de microrganismos presente. Essa caracterização encontra-se na tabela 6 e 7.

Tabela 6 – Caracterização das Lamas Antigas.

Lamas Antigas	(g SST/L) ou (g SSV/L)
Data recolha: Março 2013	
SST	22
SSV	16

Tabela 7 – Caracterização das Lamas Novas.

Lamas Novas	(g SST/L) ou (g SSV/L)
Data recolha: Maio 2013	
SST	16
SSV	11

3.2.2 SUBSTRATO

O substrato utilizado foi o soro de queijo diluído em água destilada. Foi feita uma caracterização prévia do soro, de modo a determinar que 1 grama de soro diluído em um litro de solução, contém aproximadamente 1,15 g CQO/L. De seguida foi feita uma solução mãe de concentração 20 g CQO/L para poder servir os vários reatores com a concentração desejada em cada um deles.

3.2.3 MEIO NUTRICIONAL

A composição nutricional utilizada nos ensaios realizados teve por base a referida por Aquino *et al.* (2007) [48], apresentada na tabela 8:

Tabela 8 – Composição nutricional do sistema.

Nutrientes	Concentração (mg/L)
<u>Macronutrientes</u>	
NH ₄ Cl	160
KH ₂ PO ₄	160
CaCl ₂	80
MgSO ₄	160
NaHCO ₄	800
<u>Micronutrientes</u>	
CoCl ₂	200
CuCl ₂	10
MnCl ₂	30
H ₃ BO ₃	300
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	30
NiCl ₂	20
EDTA	2
FeCl ₃ ·6H ₂ O	2
ZnCl ₂	85

3.2.4 MÉTODOS ANALÍTICOS

A informação de AOV dada pelo CGL é dada em unidade de área consoante tempo de retenção da espécie analisar. Foi usada uma reta de calibração para converter os valores para mg/L, de acordo com a tabela 9.

Tabela 9 – Reta de calibração do CGL.

AOV	m	r²
Hac	808,41	0,8885
HPr	1405,2	0,9657
<i>i</i>-HBut	1774,7	0,9717
<i>n</i>-HBut	1792	0,9621
<i>i</i>-HVal	2090,8	0,9765
<i>n</i>-HVal	1927,2	0,9742
<i>n</i>-Capr	1876	0,9728

A concentração de AOV foi convertida de mg/L para mg CQO/L com auxílio dos fatores de conversão apresentados na tabela 10, e pelo cálculo apresentado na equação 6.

Tabela 10 – Fatores de conversão dos AOV.

AOV	Fator de conversão
Hac	1,07
HPr	1,51
<i>i</i>-HBut	1,82
<i>n</i>-HBut	1,82
<i>i</i>-HVal	2,04
<i>n</i>-HVal	2,04
<i>n</i>-Capr	2,20

$$\text{Concentração}_{\text{AOV}} \left(\frac{\text{mg CQO}}{\text{L}} \right) = \text{Concentração}_{\text{AOVs}} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) \times f_c \quad (6)$$

A quantidade de AOV_T (totais produzidos - ΔAOV_T) nas experiências foi calculada pela diferença da concentração máxima de AOV e a concentração de AOV inicial, de acordo com a equação 7:

$$\Delta AOV_T = AOV_{T_{max}} - AOV_{T_{in}} \quad (7)$$

Também foram calculados graus de acidificação (GA), através da equação 8:

$$GA(\%) = \frac{AOV_{T_{max}}}{CQO_{in}} \times 100 \quad (8)$$

O rendimento de conversão de AOV (Y_{AOV}), ou seja, a quantidade de substrato consumido e convertido em AOV foi calculado pela equação 9.

$$Y_{AOV} = \frac{\Delta AOV_{T_{max}}}{[(CQO_{in} - AOV_{T_{in}}) - (CQO_{AOVs, max} - AOV_{ST, max})]} \quad (9)$$

O rendimento de conversão com base na biomassa inicial $Y_{AOV/SSV}$ foi calculado usando a equação 10:

$$Y_{AOV/SSV} = \frac{AOV_{T, max}}{SSV_0} \quad (10)$$

A remoção da CQO, ou quantidade da CQO consumida, foi dada pela equação 11:

$$Remoção\ de\ CQO = CQO_{in} - CQO_{out} \quad (11)$$

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta secção serão apresentados e discutidos os resultados dos ensaios experimentais efetuados no âmbito deste trabalho.

4.1 EFEITO DA CARGA ORGÂNICA

A primeira etapa experimental teve como objetivo principal estudar a concentração de substrato (soro de queijo) que mais favorece a população metanogénica. Este procedimento é essencial para determinar a concentração a ser usada nos testes de inibição metanogénica, para que posteriormente possam ser testados vários inibidores. Foi monitorizada a formação de metano para todas as condições estudadas.

4.1.1 PH AO LONGO DO TEMPO

Na figura 6 estão apresentados os valores de pH para as diferentes cargas estudadas neste ensaio, medidos no início do ensaio, após 14 dias e após 23 dias de incubação.

Na concentração de substrato de 3,5 g CQO/L verifica-se uma acidificação clara nas duas primeiras réplicas, atingindo-se valores de pH entre 5 e 5,5, gama favorável à *solventogenesis* que consome hidrogénio [2]. Este facto verificou-se para as réplicas um, e dois, e foi comprovado também através da análise da evolução dos AOV. Durante o ensaio ocorreu um erro técnico com a terceira réplica, tendo parte da biomassa ficado retida nas paredes do *Oxitop*, pelo que esta réplica não foi considerada na análise comparativa de resultados.

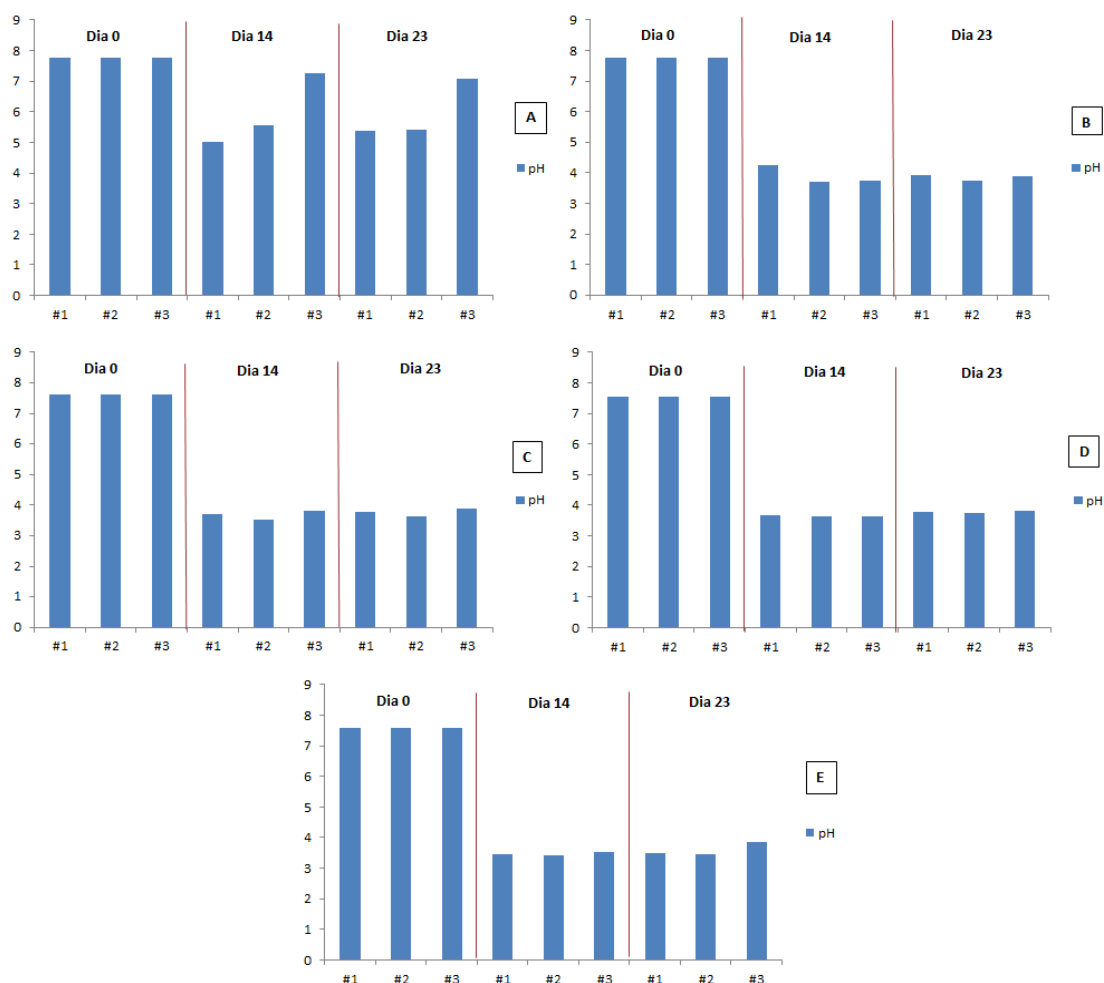


Figura 6 – Análise de pH para as três réplicas de cada concentração de substrato analisada, A- 3,5 g CQO/L; B- 4,6 g CQO/L; C- 10 g CQO/L; D- 11 g CQO/L; E- 21 g CQO/L, para o primeiro dia, o dia 14 e último dia de operação.

Na concentração de 4,6 g CQO/L a acidificação foi mais intensa que no ensaio com concentração mais baixa, tendo-se registado valores de pH compreendidos na gama de 3,7 - 3,8 nas três réplicas.

Verificou-se a mesma reação para as restantes concentrações de substrato usadas, existindo uma diminuição geral do pH, da gama inicial de 7,5 - 8 para a gama final de 3,6 - 3,8, sempre inferior a 4. A produção de metano foi inibida pelos baixos valores registados de pH (abaixo de 6) [50].

4.1.2 CQO E AOV AO LONGO DO TEMPO

Na figura 7 é apresentada a evolução temporal da CQO para as cargas orgânicas estudadas com representação da média das réplicas efetuadas e respetivo desvio padrão. É também apresentado a CQO, assim como a concentração de AOV para uma das réplicas.

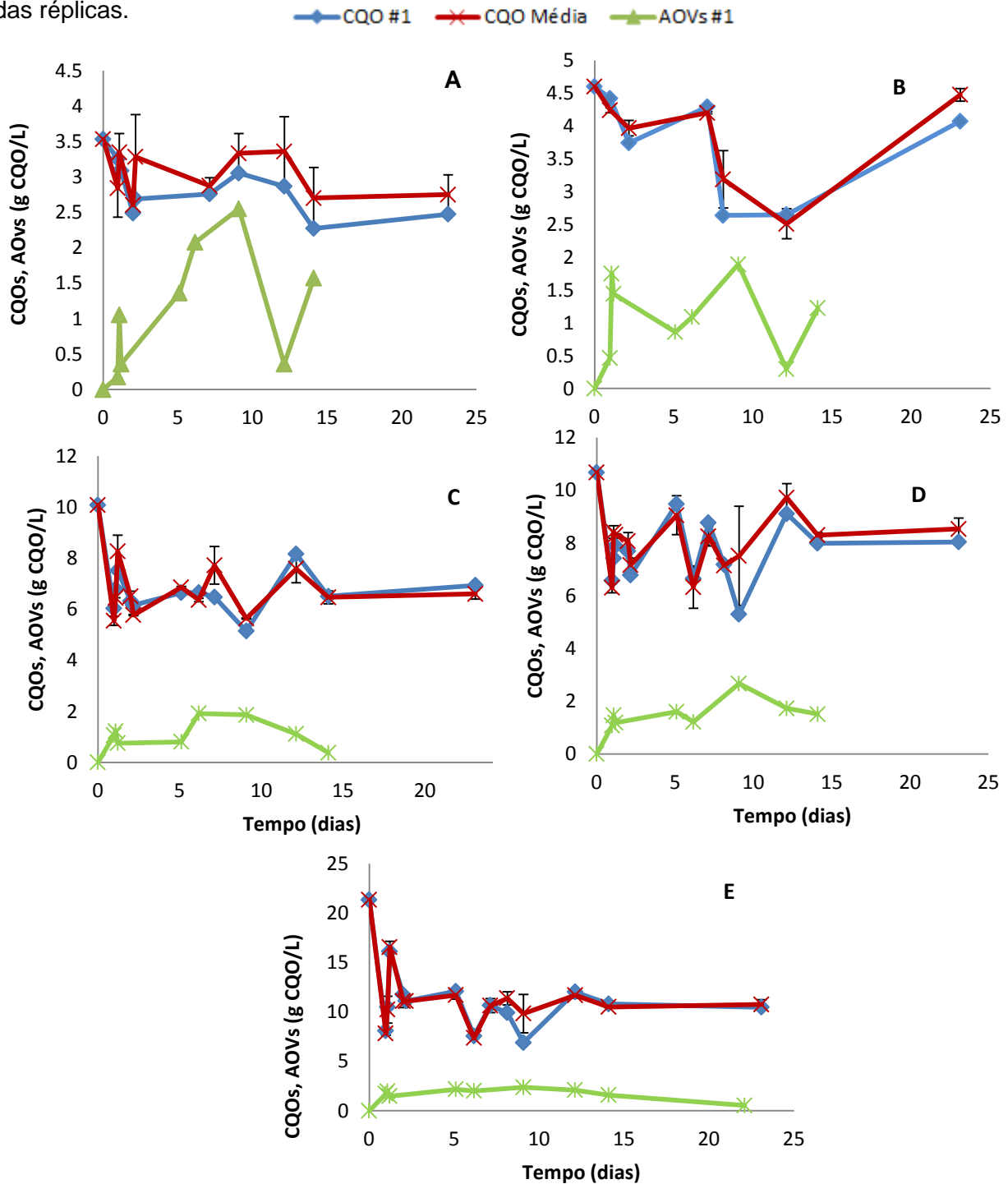


Figura 7 - CQO e concentração de AOV totais ao longo do tempo para a réplica 1 dos ensaios: a) Carga 3,5 g CQO/L; b) Carga 4,6 g CQO/L; c) Carga 10 g CQO/L; d) Carga 11 g CQO/L; e) Carga 21 g CQO/L.

Através da análise da figura 7a é possível verificar alguma variabilidade nos dados, principalmente nos primeiros dois dias de operação, podendo refletir também fenómenos de adsorção e desorção. Verifica-se uma diferença relativamente às duas réplicas válidas para esta condição, que se traduz nos valores do desvio padrão. A complexidade do substrato usado (soro de queijo) pode ter contribuído também para a variabilidade dos resultados da CQO obtidos. Globalmente verifica-se um ligeiro consumo ao longo do tempo, com exceção do período entre os dias 7 e 12 de operação em que existe uma subida na CQO, provavelmente derivado de alguma solubilização do substrato em estudo, que é complexo, dado se ter verificado um aumento crescente da produção de AOV. Verifica-se que a remoção da CQO testemunhada na figura 7 é coincidente com o aumento na produção de AOV totais, que no entanto, sofre um decréscimo abrupto a partir do nono dia, justificável pelo elevado tempo de incubação e à possível ocorrência de solventogénese, dado que não ocorreu metanogénese.

Na figura 7b é possível observar uma diminuição da CQO e, ao mesmo tempo, um aumento da quantidade total de AOV no meio, coincidindo o período de maior remoção de CQO com o período de maximização de AOV totais produzidos. Após o nono dia de operação a CQO aumenta significativamente enquanto a quantidade de AOV totais decresce, reação igualmente verificada na carga orgânica estudada anteriormente. Este aumento da CQO poderá dever-se ao fato de a população microbiana entrar em colapso, e a sua morte aumentar a quantidade de carbono oxidável, o que se reflete num aumento de CQO nos últimos dias de operação.

Na figura 7c, que corresponde à carga orgânica 10 g CQO/L, a fase inicial revela grande instabilidade possivelmente associada à fase *lag* dos microrganismos ou a fenómenos de adsorção/desorção. É notória uma maior remoção da CQO, sensivelmente 3400 mg CQO/L, existindo maior atividade dos microrganismos e degradação do substrato. Este decréscimo da CQO revela-se mais intensa nos primeiros dias de operação, e coincide com o aumento na produção de AOV totais. Mais uma vez é perceptível um ligeiro aumento na CQO do dia 14 até ao dia 23, semelhante ao ocorrido com as outras cargas, denotando o tempo elevado de análise com a morte da biomassa. O desvio padrão da média das três réplicas da CQO revela grande variabilidade dos dados para os dias 1, 7 e 12. Esta variação coincide com os máximos locais da CQO, pressupondo-se que os valores seriam menores e mais aproximados dos restantes, que apresentam desvio padrão muito menor. Aquando da maximização na produção de AOV (dia 6) existe uma estabilização até ao nono dia de operação. Isto significa que a fase

acidogénica desta réplica foi prematura relativamente à tendência verificada nas réplicas com menor carga orgânica.

Na figura 7d estão apresentados os resultados para a carga de 11 g CQO/L. A estabilização é conseguida após o dia 14 de incubação, indicando que o tempo de retenção para estas condições estudadas é demasiado elevado. O ponto de maior variabilidade das réplicas é precisamente no ponto de maior produção de AOV totais nesta condição, o nono dia de operação, sendo a réplica número um (objeto de estudo) aquela que apresenta maior variação à média das três réplicas.

Após o ponto de maximização de produção de AOV, a CQO aumentou e a concentração de AOV totais presentes no meio diminuiu.

Verifica-se que existe alguma variabilidade nas réplicas, mas é observável um consumo de substrato, existindo atividade microbiana. Este consumo de substrato é acompanhado com a crescente produção de AOV. Apesar das variações intensas de CQO, a réplica um tem o ponto de maior produção de AOV no dia 9, coincidente com o valor da CQO mais baixo registado para esta condição (6893,3 mg CQO/L).

Na figura 7e está representada a evolução de AOV e CQO durante o tempo de incubação definido, para a carga mais elevada estudada. É visível uma degradação de substrato intenso nos primeiros dias de operação, para a quantidade de substrato consumido a quantidade de AOV produzidos é bastante reduzida, o que rever-te num baixo grau de acidificação. A partir do dia 12 a CQO mantém-se sensivelmente a mesma, e a produção de AOV diminui, poderá ser devido a uma inibição acidogénica, visto que foram atingidos valores muito baixos de pH muito rapidamente, o que impede a formação de AOV.

4.1.2.1 REATOR DE CONTROLO OU BRANCO

Nesta fase do trabalho foi dedicada uma réplica ao controlo da operação ou branco, no qual não foi adicionado qualquer volume de substrato (soro de queijo). A frequência de análise não foi realizada consoante as restantes, encontrando-se apresentados na tabela 11 os resultados obtidos para CQO solúvel, SST, SSV e pH, medidos no início e final do ensaio, e o pH medido também no dia 14 de incubação.

Tabela 11 Parametros fisico-químicos obtidos para o ensaio sem adição de substrato: CQO solúvel, SST, SSV e pH.

Parâmetro	Dia 0	Dia 14	Dia 23
CQOs (mg CQO/L)	2500	-	1707
SST (g SST/L)	4,5	-	3,3
SSV (g SSV/L)	3,1	-	2
pH	7,6	6,92	7,05
AOV (mg CQO/L)	0	-	6,35

Verifica-se que no início do ensaio a CQO é significativamente elevada, sem que se tenha adicionado substrato (2500 mg CQO/L). Este valor provém unicamente do inóculo, que contém matéria a ser biodegradada pelo consórcio de microrganismos. Isto coincide com o facto de as concentrações de substrato reais para os reatores com adição de substrato serem mais elevadas do que as inicialmente pretendidas. O rácio F/M introduzido para esta condição foi assim de 0,76.

Verificou-se uma atividade microbiana residual, pois existe algum consumo da CQO entre o primeiro e o último dia de operação, o que se refletiu numa produção mínima de AOV (registada para o dia 23).

4.1.3 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO SUBSTRATO

A figura 8 ilustra a evolução de AOV totais para todos os ensaios e para todas as cargas orgânicas testadas, ao longo do tempo.

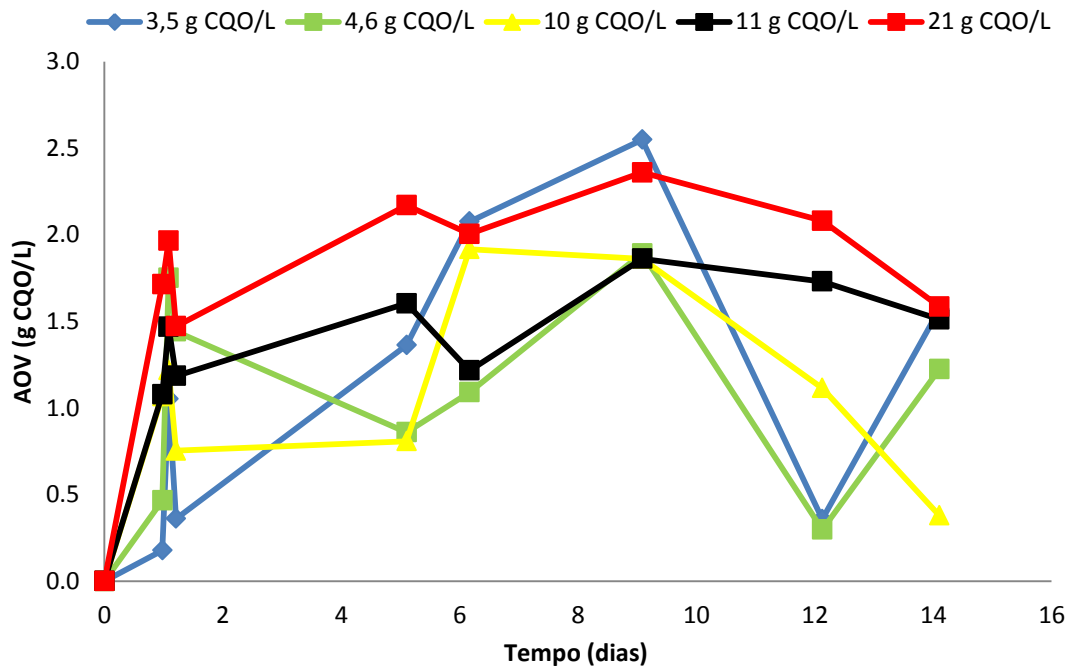


Figura 8 – Representação dos valores de AOV totais (em mg CQO/L) para as concentrações de substrato testadas ao longo do tempo (em dias).

Na figura 8 é possível visualizar uma tendência crescente para as cargas orgânicas testadas, tendo-se obtido um ponto de maximização da produção de AOV totais maioritariamente no dia 9, com exceção da carga 10 g CQO/L, que ocorre mais cedo no dia 6. A relação entre o aumento da carga orgânica e a quantidade de AOV totais produzidos no ponto de maximização da produção é linear, com exceção para a concentração mais baixa (3,5 g CQO/L) que assume a maior produção de AOV nesta etapa (2550 g CQO/L) e da carga mais elevada (21 g CQO/L) que assume um valor máximo de AOV totais inferior ao obtido com a carga orgânica de 11 g CQO/L. É possível identificar um decréscimo geral na produção de AOV a partir do dia 10, não havendo, no entanto, registo de produção de metano durante esta etapa.

Segundo o estudo desenvolvido por Rao *et al.* (1989), o processo de fermentação desempenhado por um grupo de bactérias denominado *Clostridium acetobutylicum* é caracterizado por duas fases distintas. Inicialmente ocorre uma acidificação intensa do substrato até valores de pH de 4,5 onde são produzidas grandes quantidades de ácido acético, ácido butírico e hidrogénio. De seguida, ocorre a solventogénese com o consumo e captação de hidrogénio e parcialmente dos ácidos formados anteriormente, verificando-se uma subida ligeira de pH até aos valores referidos [49]. Esta reação condiz com os

dados referentes ao pH (figura 6) e ao decréscimo na produção de AOV a partir do nono dia, para as cargas orgânicas mais baixas.

Na figura 9 estão representadas as quantidades dos tipos de ácidos produzidos maioritariamente (HAc – ácido acético; HPr – ácido propiônico; HBut – ácido butírico) ao longo do período experimental, para as diferentes concentrações de substrato estudadas.

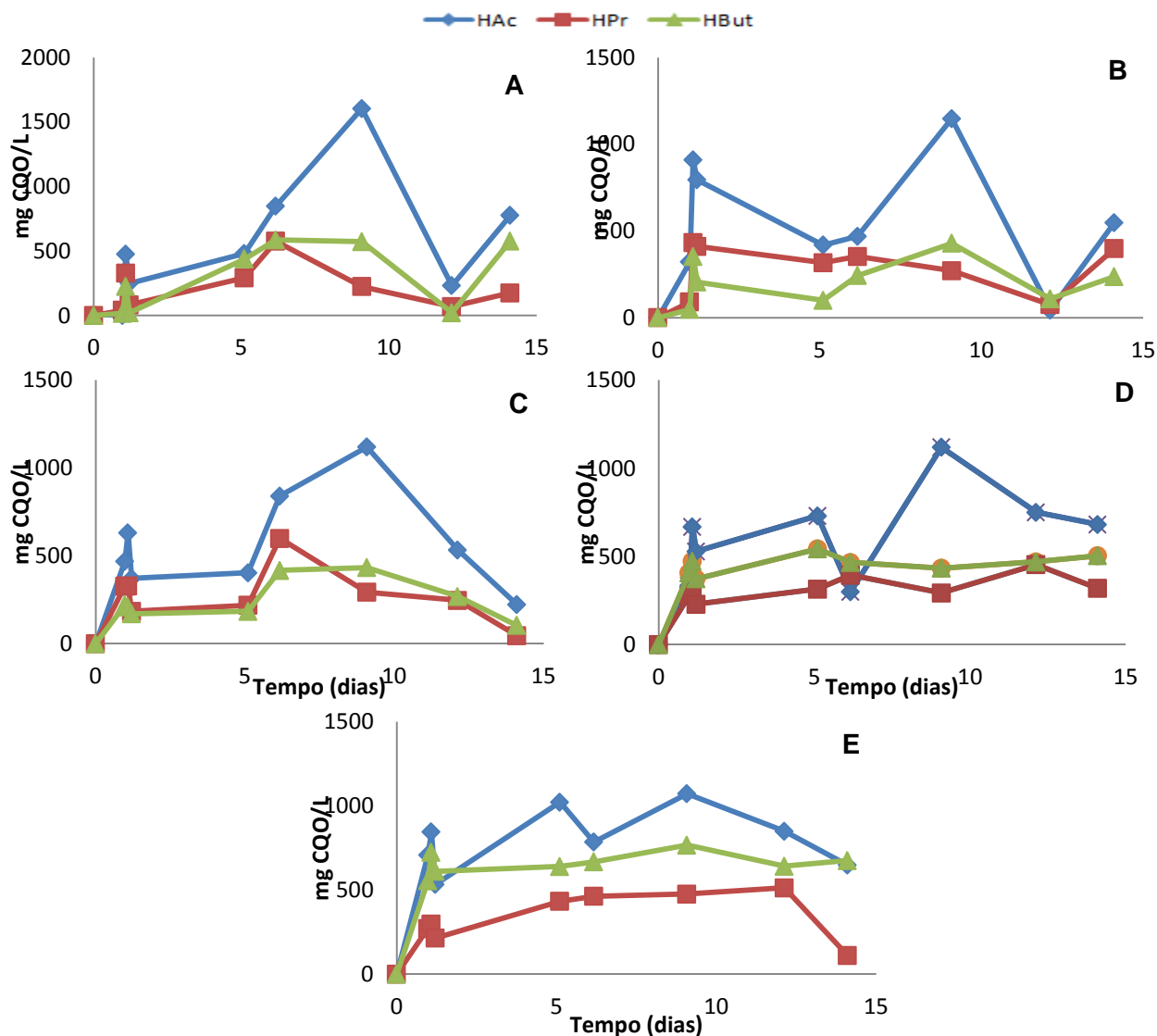


Figura 9 – Análise quantitativa e qualitativa de AOV para as diferentes concentrações de substrato estudadas, A- 3,5 g CQO/L; B- 4,6 g CQO/L; C- 10 g CQO/L; D- 11 g CQO/L; E- 21 g CQO/L.

É possível verificar que o ácido acético é a espécie mais produzida em todas as condições. Portanto o substrato das metanogénicas ficou por consumir ou degradar, o que nos indica que as bactérias metanogénicas foram total ou parcialmente inibidas em todas as condições [45]. Isto poderá dever-se à concentração aplicada nos reatores assim como a qualidade do inóculo ou as condições de armazenagem.

É de salientar que a concentração de ácido propiónico e butírico são bastante sensíveis aos tempos de digestão empregues. A carga orgânica de 3,5 g CQO/L produziu maiores quantidades de ácido acético (1600 mg CQO/L), apesar das quantidades produzidas de ácido propiónico e ácido *n*-butírico se manterem sensivelmente as mesmas entre cargas orgânicas. Outro objeto de interesse passa pela permuta constante entre ácido propiónico e ácido *n*-butírico como segunda espécie de AOV mais produzida, consoante as concentrações de substrato testadas. Esta mudança é devido a uma competição entre as bactérias fermentativas de ácido butírico (com produção essencialmente de ácidos acético e butírico) e as bactérias fermentativas de ácido propiónico (que produzem essencialmente ácidos acético e propiónico) [51].

Esta relação entre o ácido acético, propiónico e butírico é explicitada em percentagem relativa na tabela 12, onde estão representados uma série de parâmetros essenciais a uma análise completa dos dados recolhidos em laboratório para todas as concentrações de substrato estudadas.

Tabela 12 – Parâmetros analisados em cada carga orgânica testada.

Parâmetros	3,5 g CQO/L	4,6 g CQO/L	10 g CQO/L	11 g CQO/L	21 g CQO/L	
ΔAOV_T (mgCQO/L)	2549,7	1892,0	1917,5	1862,0	2360,0	
Y_{AOV} (gCQO/gCQO _{removido})	0,84	0,60	0,37	0,53	0,20	
$Y_{\text{AOV/SSV}_{\text{in}}}$ (gCQO/gSSV)	0,75	0,51	0,45	0,38	0,50	
GA (gCQO/gCQO _{in})	0,72	0,41	0,19	0,17	0,11	
Composição relativa de AOV (%)	HAc	62,9	60,6	43,8	60,1	45,5
	HPr	8,8	14,3	31,2	15,7	20,2
	<i>i</i> -HBut	1,7	2,0	2,4	0,8	1,1
	<i>n</i> -HBut	22,5	22,6	21,7	23,2	32,4
	<i>i</i> -HVal	1,0	0,0	0,3	0,0	0,0
	<i>n</i> -HVal	1,2	0,5	0,5	0,2	0,7
	<i>n</i> -HCap	2,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Na tabela 12 estão enunciados uma série de parâmetros de análise de AOV, entre eles a produção máxima de AOV totais registada, que se caracteriza pela diferença entre a quantidade máxima de AOV totais menos a inicial, de acordo com a equação 7. De seguida calcularam-se dois tipos de rendimento, o rendimento de conversão do substrato removido em AOV (Y_{AOV}) e o rendimento de conversão em AOV por unidade de biomassa introduzida ($Y_{AOV/SSVin}$), equação 9 e 10, respetivamente. Por último, foi calculado o grau de acidificação que consiste no quociente entre o ponto de produção máxima de AOV totais pela CQO inicial, ou de entrada, de acordo com equação 8.

Verifica-se um decréscimo na quantidade de AOV totais produzidos no ponto de maximização da produção com o aumento da concentração de substrato empregue. Esta tendência é igualmente visível no grau de acidificação, que também decresce com o aumento da carga orgânica (como representado na figura 10). Para a menor carga orgânica testada neste ensaio (3,5 g CQO/L), associa-se o maior grau de acidificação evidenciado, neste caso 75%. O que indica que 75% do substrato introduzido foi convertido em AOV, nomeadamente ácido acético e butírico. A concentração de substrato de 3,5 g CQO/L foi a que produziu maior quantidade de AOV.

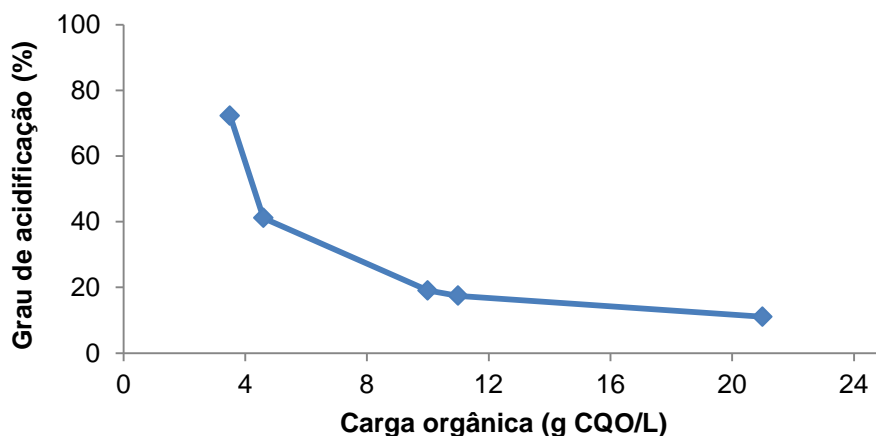


Figura 10 - Relação entre o grau de acidificação obtido e a carga orgânica aplicada em cada ensaio.

Tanto para o grau de acidificação (figura 10) como para o rendimento de conversão em AOV observa-se uma tendência decrescente com o aumento da concentração de substrato introduzida. A única exceção é relativa às cargas orgânicas de 10 e 11 g CQO/L que apesar de relativamente próximas assumem valores de Y_{AOV}

bastante diferentes. Para a carga 10 g CQO/L as bactérias acidogénicas converteram 37% da fração de substrato consumido em AOV, comparativamente aos 57% convertidos na carga 11 g CQO/L.

Através da análise das quantidades relativas dos AOV produzidos (figura 11) conclui-se, como enunciado anteriormente, que o ácido acético é a espécie predominante (44 a 63%), e como sendo a principal fonte de consumo das metanogénicas (72%) é justificável a ausência na produção de metano [45]. Dos outros ácidos verificou-se uma produção de ácido *n*-butírico de 22 a 33%, seguido de ácido propiónico, que registou maior variação de 9 a 31%. A réplica em que a concentração de substrato foi 10 g CQO/L foi a única em que se obteve maiores quantidades de ácido propiónico relativamente ao ácido *n*-butírico.

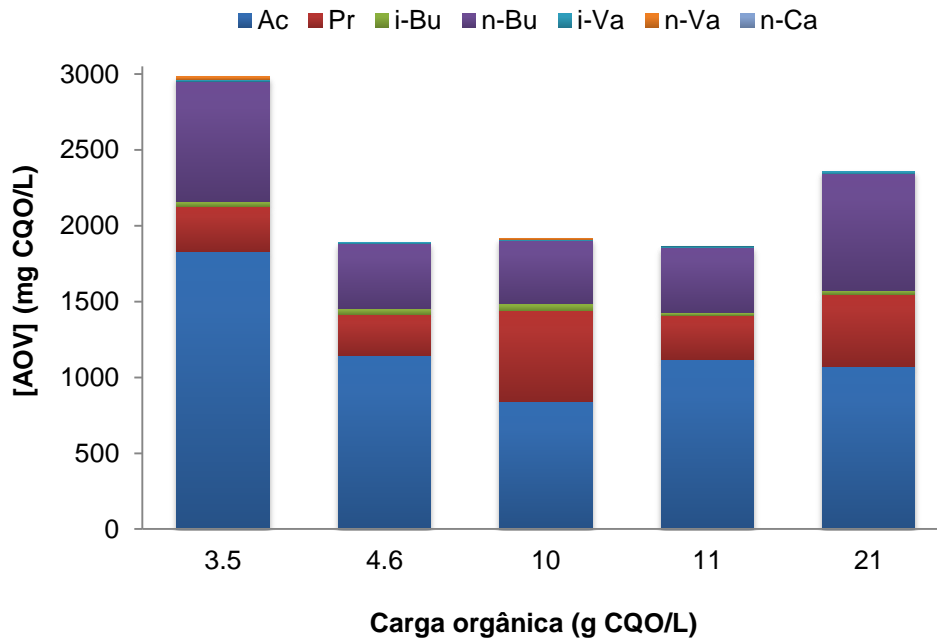


Figura 11 - Composição da mistura de AOV obtida no final de cada ensaio, com as diferentes cargas orgânicas estudadas.

Na figura 12 está apresentada a concentração do material particulado em termos de sólidos suspensos totais e voláteis, com representação da média e desvio padrão das réplicas realizadas, para as diferentes concentrações de substrato testadas.

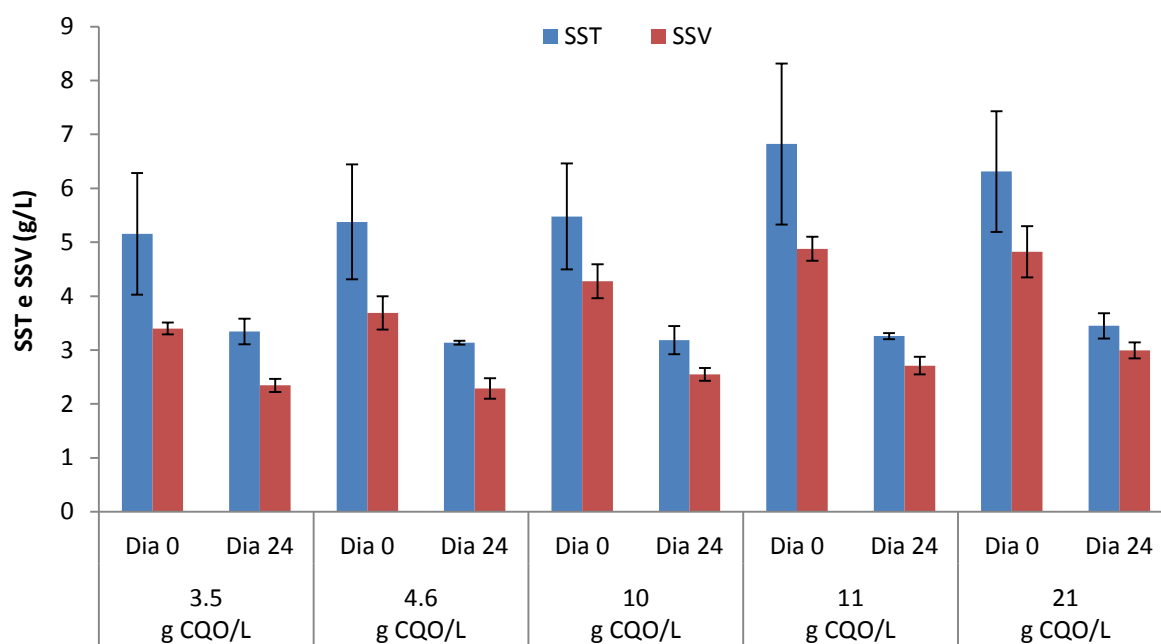


Figura 12 - Valores de SST e SSV para o primeiro dia (Dia 0) e último dia (Dia 24) para as diferentes cargas orgânicas testadas.

Relativamente às figuras 7 e 9 é visível uma queda abrupta na produção de AOV totais, coincidente com uma subida na quantidade de CQO, indicando possivelmente inatividade bacteriana. Estas tendências são apoiadas com a análise do gráfico da figura 12, em que é evidente uma redução no material particulado presente nos reatores, entre o primeiro e o último dia. Esta redução é, na maioria dos casos, metade do valor inicial. Também é visível uma redução na quantidade de sólidos particulados, visto que existe uma redução na diferença entre os SST e SSV no primeiro e último dia de operação. Estes dados referem que existe solubilização do substrato complexo (soro de queijo) e da biomassa (devido à morte dos microrganismos). Após a morte destes microrganismos a quantidade de carbono oxidável aumenta, o que reverte num aumento de CQO para os dias finais. Isto poderá ser devido a tempos de operação muito elevados para a quantidade de substrato disponível para as bactérias. Nos ensaios seguintes serão assim testados tempos de incubação inferiores, a fim de evitar também a diminuição de AOV produzidos (figura 7), como foi verificado neste ensaio.

Como o objetivo principal desta etapa experimental era comparar o efeito da carga orgânica na resposta do consórcio de microrganismos, o facto de não ter havido registo na produção de metano, como inicialmente se esperava, levou a optar-se por repetir o estudo mas para cargas orgânicas numa gama mais baixa (0,6 a 6 g CQO/L), visto que a

carga ideal à metanogénese tem um rácio F/M é compreendido entre 0,3 e 0,5 g CQO/g SSV [48].

Esta mudança foi efetuada em conjunto para dois tipos de inóculo recolhidos em alturas distintas, denominados de Lamas Antigas (LA) e Lamas Novas (LN), com o intuito de verificar também se a ausência na produção de metano é devido à qualidade do inóculo, para além da carga orgânica aplicada.

4.2 RESPOSTA DO SISTEMA A DIFERENTES INÓCULOS

Na segunda etapa variou-se a carga orgânica, usando uma gama de valores mais baixa que a usada anteriormente, e testou-se dois tipos de inóculos: Lamas Novas (LN), recolhidas em Maio de 2013 e Lamas Antigas (LA) de Março de 2013, usadas no estudo da etapa 1, do efeito da carga orgânica.

4.2.1 ANÁLISE PH

Na figura 13 estão apresentados os valores de pH para as diferentes cargas estudadas neste ensaio, medidos no início do ensaio, após 9 dias e após 15 dias de incubação, para os ensaios que usaram o novo inóculo (com duas réplicas) e o velho inóculo (apenas uma réplica).

Para a carga orgânica mais baixa testada (figura 13a), as LA apresentam um pH ligeiramente superior no dia 0 (8,1), comparativamente às réplicas das LN (7,8), apresentando esta condição um menor decréscimo de pH, comparativamente às restantes cargas estudadas, evidenciando uma fraca acidificação. Tal fato pode ter-se devido à baixa concentração de substrato passível de ser acidificado e/ou metanizado.

Na figura 13b verifica-se uma acidificação ligeiramente mais elevada, refletida na evolução do pH, comparativamente ao ensaio anteriormente referido (carga orgânica 0,6 g CQO/L, figura 13a). A intensificação da acidificação do substrato à medida que a carga orgânica aumenta é evidente em todas as condições estudadas. Na figura 13c está representada a carga orgânica de 3 g CQO/L. Nesta condição, o pH apresenta valores baixos após o dia 9, tanto para as Lamas Novas como para as Lamas Antigas.

Na figura 13d, em que está representada a carga orgânica de 4 g CQO/L, observa-se que a réplica número 2 de LN, ao nono dia, apresenta valores equivalentes aos das restantes réplicas (até valores de pH próximos de 4), mas no último dia (dia 15) esse valor aumenta para 4,83. As réplicas restantes mantêm-se constantes para o dia 9 e dia 15, em valores próximos de 3,8, revelando uma acidificação acentuada. Estes valores estão concordantes com os apresentados na secção 4.1.1, em que o aumento da carga orgânica potenciou a diminuição do pH no final do ensaio.

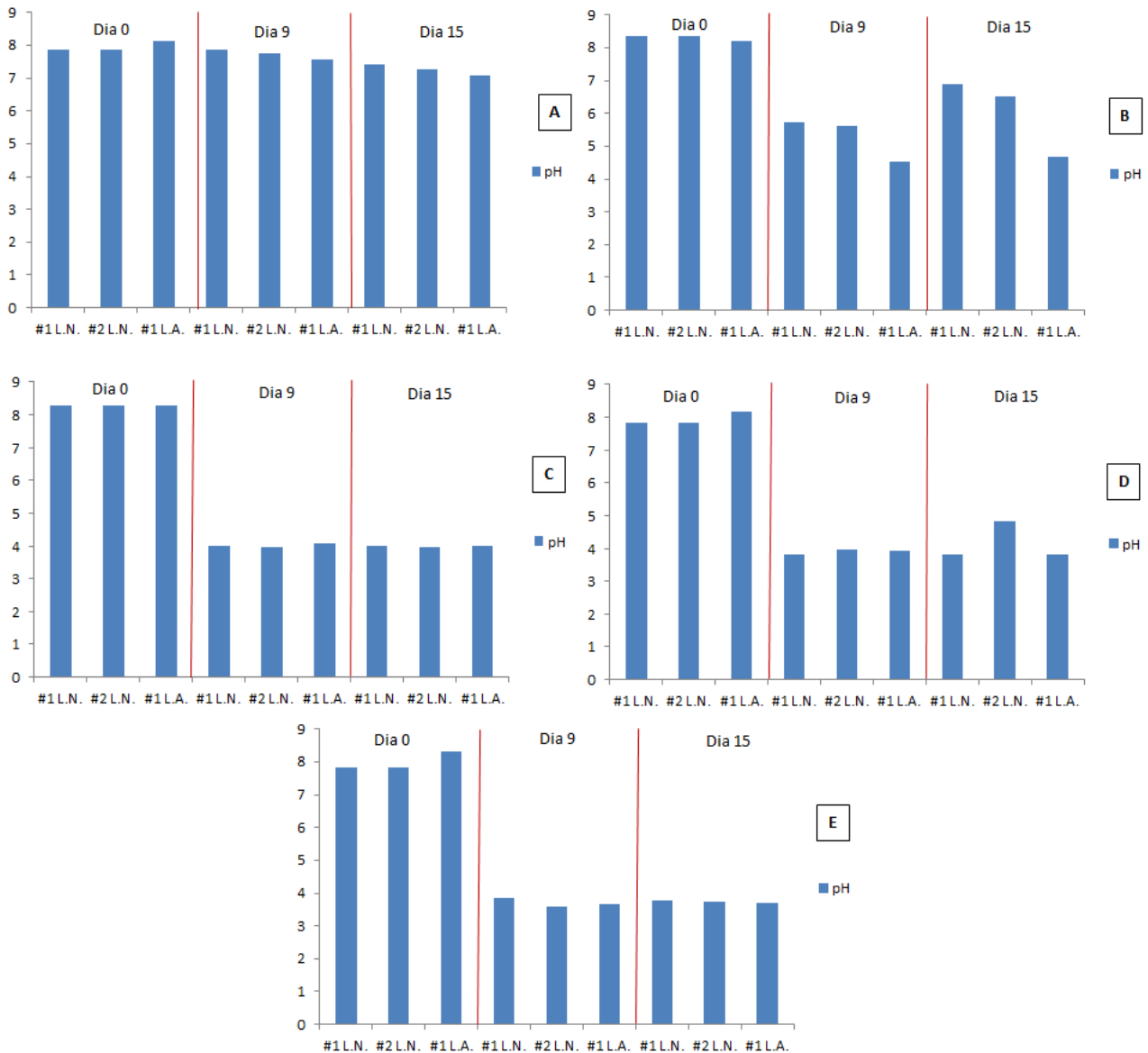


Figura 13 - Análise de pH para as duas réplicas do inóculo mais recente (LN) e uma réplica do inóculo menos recente (LA) de cada concentração de substrato analisada, A- 0,6 g CQO/L; B- 2 g CQO/L; C- 3g CQO/L; D- 4 g CQO/L; E- 6 g CQO/L, para o primeiro dia, o nono dia e último dia de operação.

Na última concentração de substrato testada nesta bateria (figura 13e) é visível a acidificação do substrato para todas as réplicas em causa, atingindo-se valores de pH abaixo de 4. A réplica do inóculo menos recente (Lamas Antigas) foi a que sofreu maior acidificação ($pH_{in}=8,3$ e $pH_{out}=3,7$).

4.2.2 CQO E AOV AO LONGO DO TEMPO

Na figura 14 está ilustrada a evolução ao longo do tempo da CQO e da concentração total de AOV determinados para esta etapa, relativas às réplicas do inóculo mais recente (LN) e à réplica do inóculo antigo (LA), com as diferentes concentrações de substrato aplicadas. O ensaio em que foi estudada a concentração de substrato mais baixa (0,6 g CQO/L), usando o inóculo mais antigo foi descartado para efeito de comparação, visto que assume valores de AOV totais superiores aos valores registados da CQO ao longo do tempo, provavelmente devido a erros experimentais e à impossibilidade de repetição das análises.

Em todos os ensaios verificou-se uma diminuição da CQO até ao dia 3. Para o inóculo mais recente (LN) esta diminuição é precedida de um aumento da CQO e de um decréscimo na quantidade de AOV totais nas cargas menores que 4 g CQO/L. A carga de 2 g CQO/L é exceção, atingindo o máximo de produção de AOV ao fim de 8 dias de incubação. No inóculo mais antigo a produção máxima é atingida após 9 dias de incubação, como já tinha sucedido na bateria de estudo da carga orgânica (secção 4.1). Este ligeiro atraso em relação às outras condições pode dever-se à solubilização do substrato ou à hidrólise da biomassa.

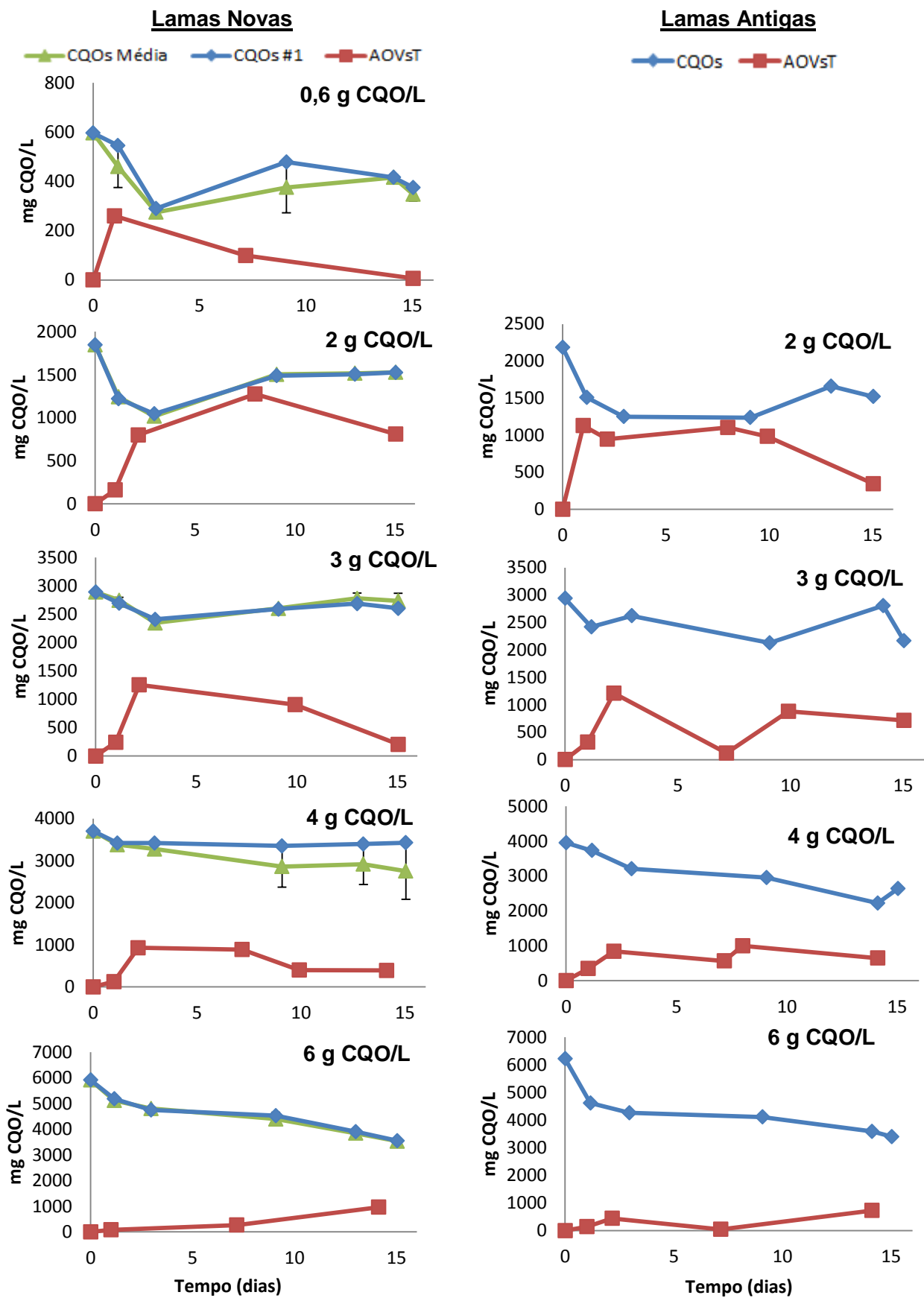


Figura 14 - CQO e concentração de AOV totais ao longo do tempo para a réplica 1 e média do inóculo mais recente (LN) e menos recente (LA).

Para as cargas superiores verifica-se um desvio aos valores médios mais intenso no caso de LN para a carga orgânica de 4 g CQO/L, apesar de aparentemente se constatar um grau de acidificação bastante inferior aos casos anteriores. A remoção da CQO para as cargas 4 g CQO/L no caso de LN não se revela muito intensa, o que pode indicar maior inatividade microbiana no meio. Na réplica em que foi utilizado o inóculo mais antigo existe maior consumo da CQO e produção de AOV totais comparando com a réplica em que foi utilizado um inóculo mais recente.

Para a carga orgânica mais elevada desta etapa experimental (6 g CQO/L), observou-se um consumo constante ao longo do tempo, e um aumento na concentração de AOV no meio, para os dois inóculos testados (LN e LA).

4.2.3 COMPARAÇÃO DO EFEITO DE DOIS INÓCULOS DIFERENTES

Na figura 15, são comparadas as produções de AOV totais para os dois tipos de inóculo testados com a variação da concentração do substrato.

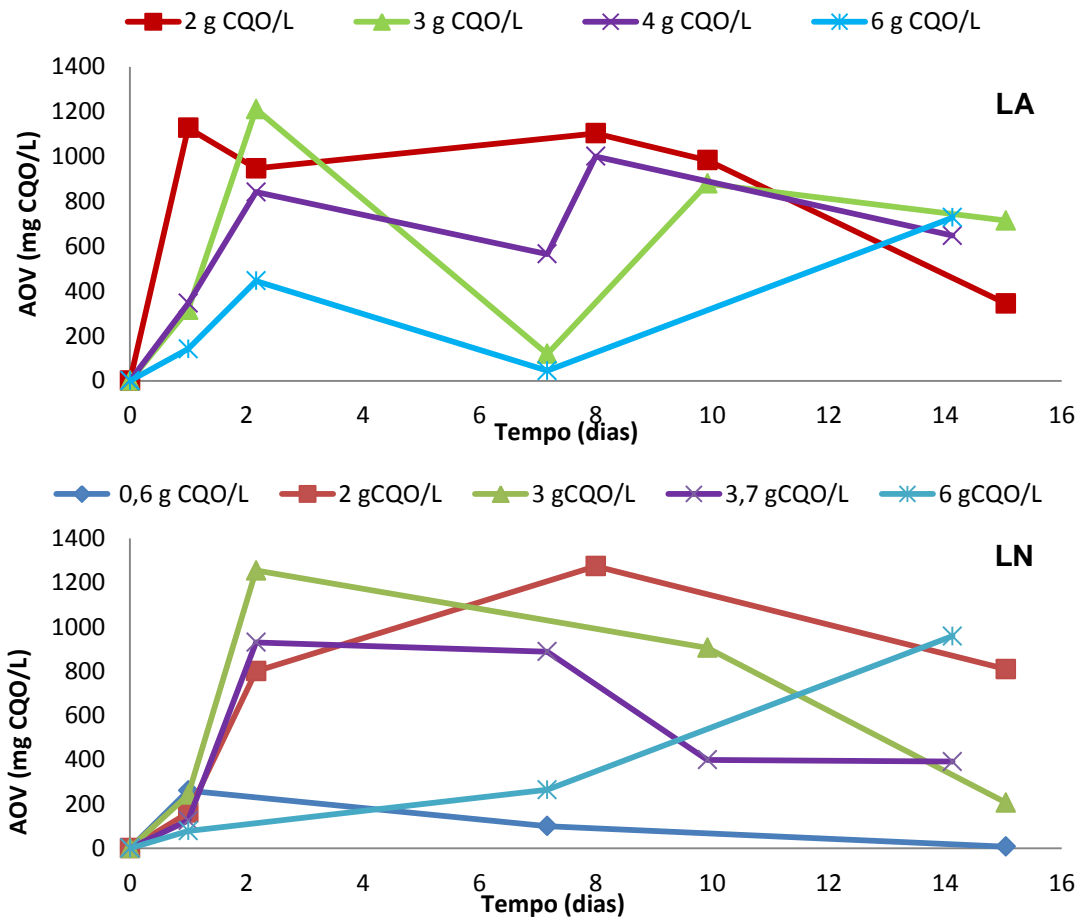


Figura 15 - Evolução da concentração total de AOV ao longo do tempo para os dois tipos de inóculo com as diferentes condições aplicada.

Ao contrário do ensaio anterior (secção 4.1) o ponto de maximização na produção de AOV totais varia independentemente do tipo de inóculo testado. Observa-se uma semelhança entre a concentração de 3 g CQO/L em que o ponto máximo é atingido no segundo dia de operação. Para a carga orgânica de 4 g CQO/L, o dia em que se registou a concentração máxima de AOV totais para LN é ao segundo dia, mantendo-se aproximadamente constante até ao dia 8. Para o inóculo com LA, o ponto máximo dá-se ao oitavo dia apresentando este ensaio grande variabilidade nos resultados.

Em termos de quantidade máxima de AOV produzidos entre os dois inóculos testados, para a carga orgânica de 2 g CQO/L das lamas novas (LN) atinge-se o valor máximo de 1274 mg CQO/L. Para o inóculo menos recente (LA) o ponto máximo de AOV totais atingido é 1211 mg CQO/L, com a concentração de 3 g CQO/L. Assim, constata-se que a diferença entre inóculos não influencia a produção máxima de AOV totais, mesmo quando a carga orgânica é aumentada em 1 g CQO/L.

Quando se aplicam cargas entre 2 e 3 g CQO/L a produção de AOV é superior comparativamente às restantes concentrações e não é influenciada pelo aumento da concentração de substrato.

A análise quantitativa e qualitativa dos AOV registados para os dois inóculos testados está apresentada na figura 16.

Para a variável LN nas cargas orgânicas de 0,6 e 3 g CQO/L é possível verificar que existe uma maior concentração de ácido propiónico do que ácido acético, podendo dever-se ao consumo parcial do ácido acético por parte das bactérias metanogénicas na produção de metano. Poderá ainda ser influenciada por uma subida ligeira no pH o que faz com que haja uma degradação do ácido acético e ácido butírico, para produção de butanol e ácido propiónico [40]. Apesar de esta relação estar relacionada com a carga 2 g CQO/L para LN, a concentração de ácido acético consegue ser superior à concentração de ácido propiónico, embora sejam relativamente próximas (aproximadamente 200 mg CQO/L de diferença). Nas restantes concentrações de substrato (4 e 6 g CQO/L) para a variável LN, observa-se uma tendência semelhante registada na secção 4.1.3, isto é, existe claramente uma maior produção de ácido acético em detrimento das espécies restantes.

Já na análise do inóculo mais antigo (LA), a carga 2 g CQO/L é a que revela menos variação nos resultados, com uma produção de ácido acético superior à produção das restantes espécies. Para as cargas orgânicas de 2, 3 e 4 g CQO/L, os dados revelam grande variabilidade e o ácido acético é a espécie predominante. Para a carga orgânica mais elevada desta etapa (6 g CQO/L) dá-se um aumento na quantidade de ácido *n*-butírico produzido, a partir do dia 7, enquanto as concentrações dos restantes AOV se mantêm aproximadamente constantes.

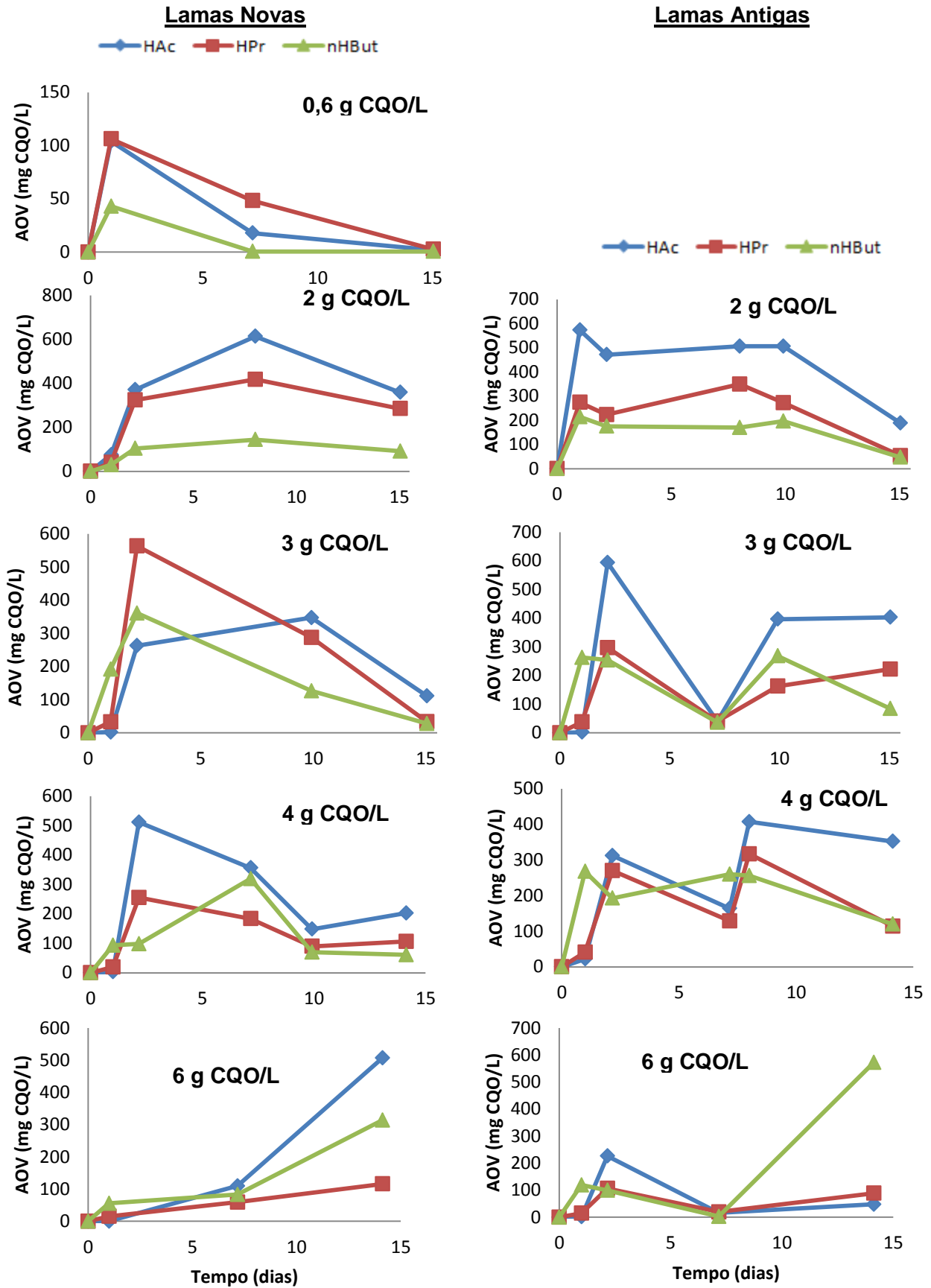


Figura 16 - Evolução da concentração de AOV individuais para cada ensaio, com LA e LN, para as diferentes concentrações de substrato estudadas.

Na tabela 13 estão apresentados os parâmetros determinados a partir dos dados recolhidos em laboratório, para todas as concentrações de substrato e os dois inóculos estudados.

Tabela 13 – Parâmetros analisados em casa carga orgânica utilizada.

Parâmetros	0,6		2		3		4		6		
	g CQO/L		g CQO/L		g CQO/L		g CQO/L		g CQO/L		
	LN	LA	LN	LA	LN	LA	LN	LA	LN	LA	
ΔAOV_T ($\text{mg}_{\text{CQO}}/\text{L}$)	260	-	1274	1128	1255	1211	930	1000	958	727,8	
Y_{AOV} ($\text{g}_{\text{CQO}}/\text{g}_{\text{CQOrem}}$)	0,84	-	0,78	0,63	0,86	0,7	0,78	0,5	0,3	0,22	
$Y_{\text{AOV/SSVin}}$ ($\text{g}_{\text{CQO}}/\text{g}_{\text{SSV}}$)	0,08	-	0,4	0,65	0,36	0,65	0,26	0,47	0,2	0,27	
GA ($\text{g}_{\text{CQO}}/\text{g}_{\text{CQOin}}$)	0,44	-	0,69	0,52	0,43	0,41	0,24	0,25	0,16	0,12	
Composição relativa de AOV (%)	HAc	40	-	48	50,8	21	49	55	40,7	53	6,5
	HPr	40,1	-	32,8	24,3	45	24,5	27,5	31,7	12	12,2
	<i>i</i> -HBut	0,86	-	1,4	0,9	1,2	0,6	0	0,1	1,5	1,6
	<i>n</i> -HBut	16,5	-	11,3	19	28,8	21	10,6	25,6	33	78,6
	<i>i</i> -HVal	0,34	-	0	0,1	0,5	0,4	0	0	0,6	0,5
	<i>n</i> -HVal	1,33	-	3,8	3,4	2,7	3,1	3,5	2	0,1	0,6
	<i>n</i> -HCap	0,87	-	2,7	1,6	1,2	1,4	3,5	0	0	0

Existe uma tendência para a diminuição da quantidade de AOV totais produzidos entre LN e LA, com exceção para a concentração de substrato de 4 g CQO/L, em que LA regista maior produção de AOV no ponto de maximização, 1000 mg CQO/L de AOV. O rendimento de conversão em AOV é aproximadamente o mesmo para os dois tipos de inóculo, não sofrendo grandes variações e apresentando valores semelhantes aos apresentados na secção anterior (secção 4.1).

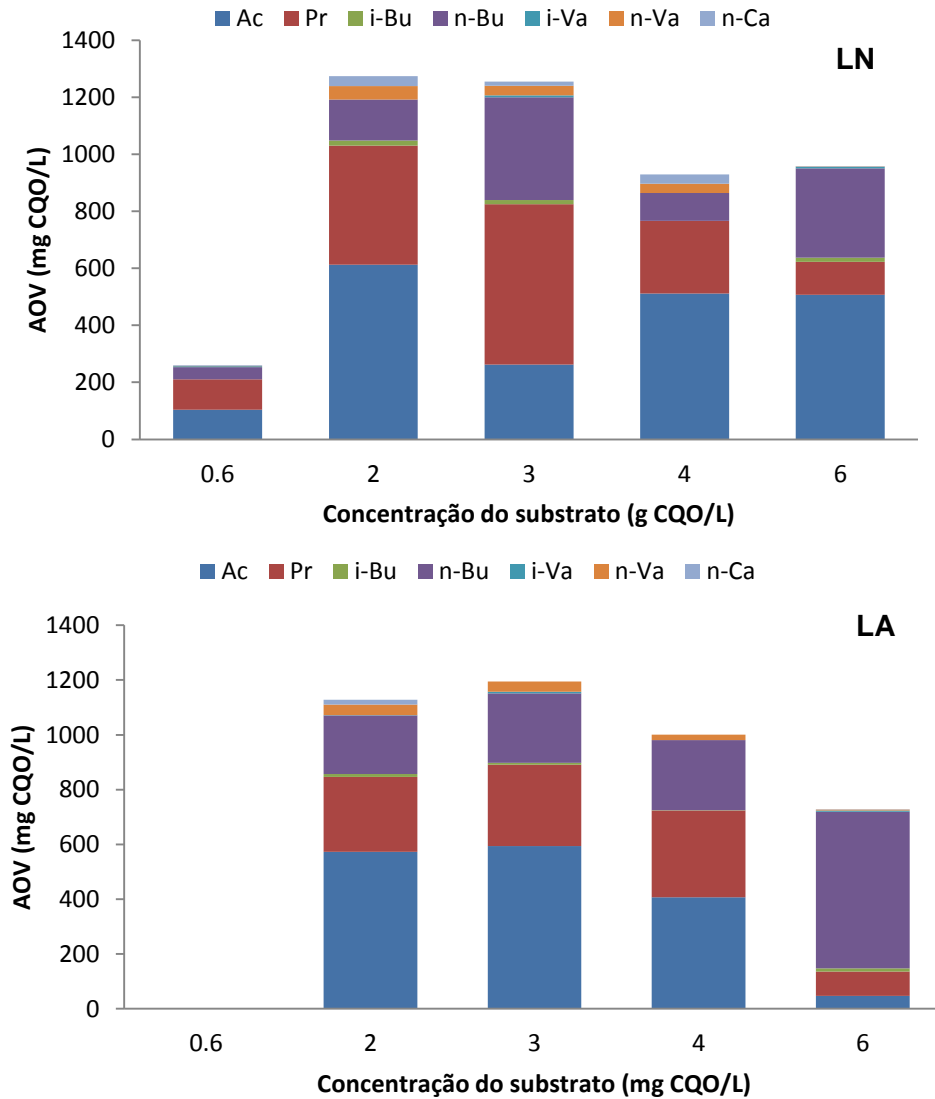


Figura 17 – Composição da mistura de AOV obtida no final de cada ensaio, com as diferentes cargas orgânicas.

Na figura 17 LN, tendo em conta a gama de concentrações de substrato anteriormente referida (2-3 g CQO/L), observam-se maiores concentrações de ácido propiónico. Com o aumento da carga orgânica observa-se uma estabilização nas quantidades produzidas de ácido acético, uma diminuição da quantidade de ácido propiónico produzido e um aumento na quantidade de ácido *n*-butírico.

Na análise da figura 17 LA é visível uma diminuição nas quantidades dos ácidos acético e propiónico e um aumento da quantidade de ácido butírico, com o aumento da carga orgânica introduzida. Para este inóculo não foi observada qualquer produção de metano.

A relação entre os graus de acidificação (GA) e as concentrações de substrato utilizadas para os dois inóculos estudados está representada na figura 18.

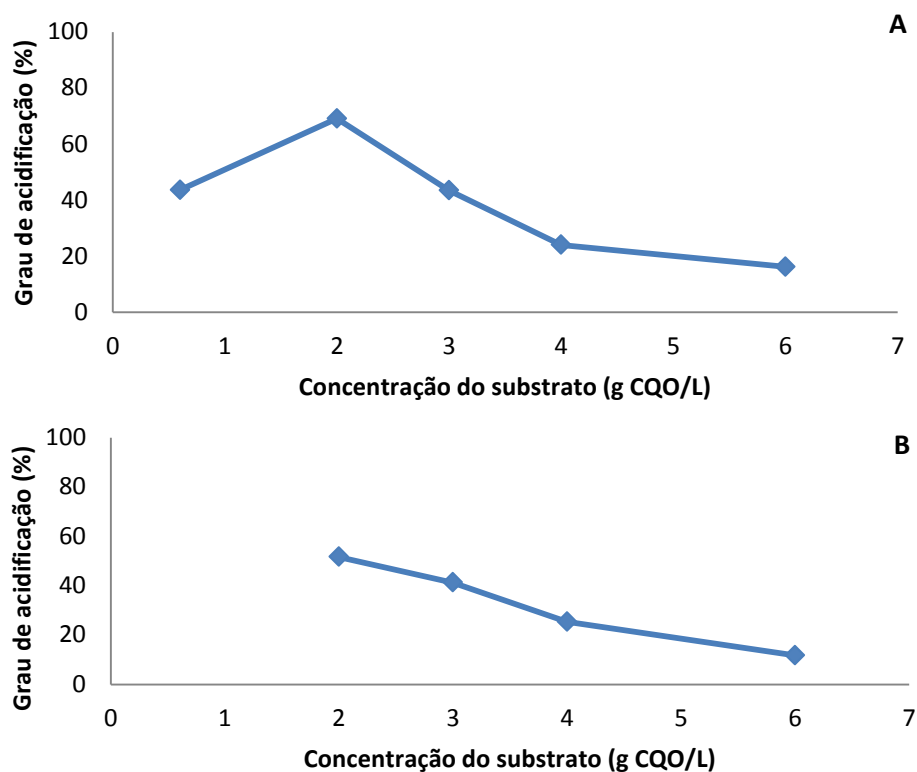


Figura 18 - Relação entre o grau de acidificação obtido e a carga orgânica aplicada em cada ensaio: A – Lamas novas; B – Lamas antigas.

Existe uma tendência decrescente do GA com o aumento da carga orgânica, como já foi constatado na secção 4.1.3. No entanto a carga mais baixa aplicada a nível global (0,6 g CQO/L) regista o maior valor na produção de metano (tabela 14) e um GA de 43% para LN. O maior grau de acidificação foi conseguido com o inóculo mais recente (LN) aplicando uma carga orgânica de 2 g CQO/L, onde se obteve 69% de acidificação. Para as mesmas condições foi obtida 32% e 20% de metanização, para as réplica 1 e 2, respetivamente.

Na tabela 14 estão apresentados os valores de produção de metano registados no dia 14 de operação.

Tabela 14 - Composição do biogás produzido em cada ensaio utilizando as lamas novas.

Carga orgânica (g CQO/L)		%CH ₄	%CO ₂
0,6	#1 LN	32	54
	#2 LN	20,8	32
2	#1 LN	25	32
	#2 LN	21	25
3	#1 LN	17	23
	#2 LN	-	-
4	#1 LN	9	20
	#2 LN	-	-

Não houve registo de metano na primeira etapa experimental (testada com a varável Lamas Antigas) porque o tipo de inóculo testado acidificou naturalmente para todas as cargas orgânicas testadas, e como tal inibiu a produção de metano.

Na escolha da carga orgânica para o teste aos inibidores metanogénicos optou-se nesta etapa por utilizar a concentração de substrato de 5 g CQO/L. Como o objetivo destas etapas iniciais era definir uma carga orgânica e rácio F/M para maximizar a produção de metano, para a inibição ser bem aplicada, procurou-se uma concentração de substrato que minimize a produção de AOV, ou que pelo menos evite uma maximização acidogénica e que provoque mudanças nas condições internas dos reatores.

Analisando as figuras 18a e 18b verifica-se que o GA diminui com aumento da carga orgânica aplicada, como tal, aquando da gama de concentrações de substrato que produz maior quantidade de AOV referida anteriormente (2 – 3 g CQO/L), as cargas compreendidas entre 4 e 6 g CQO/L com um rácio F/M entre 1 – 1,4, revela-se a melhor gama a ser aplicada, porque existe uma pequena produção de metano (9%), e o substrato não acidifica tanto como nas cargas anteriores (25 – 16%).

A análise de SST e SSV para os dois inóculos analisados (LN e LA) encontra-se representada na figura 19.

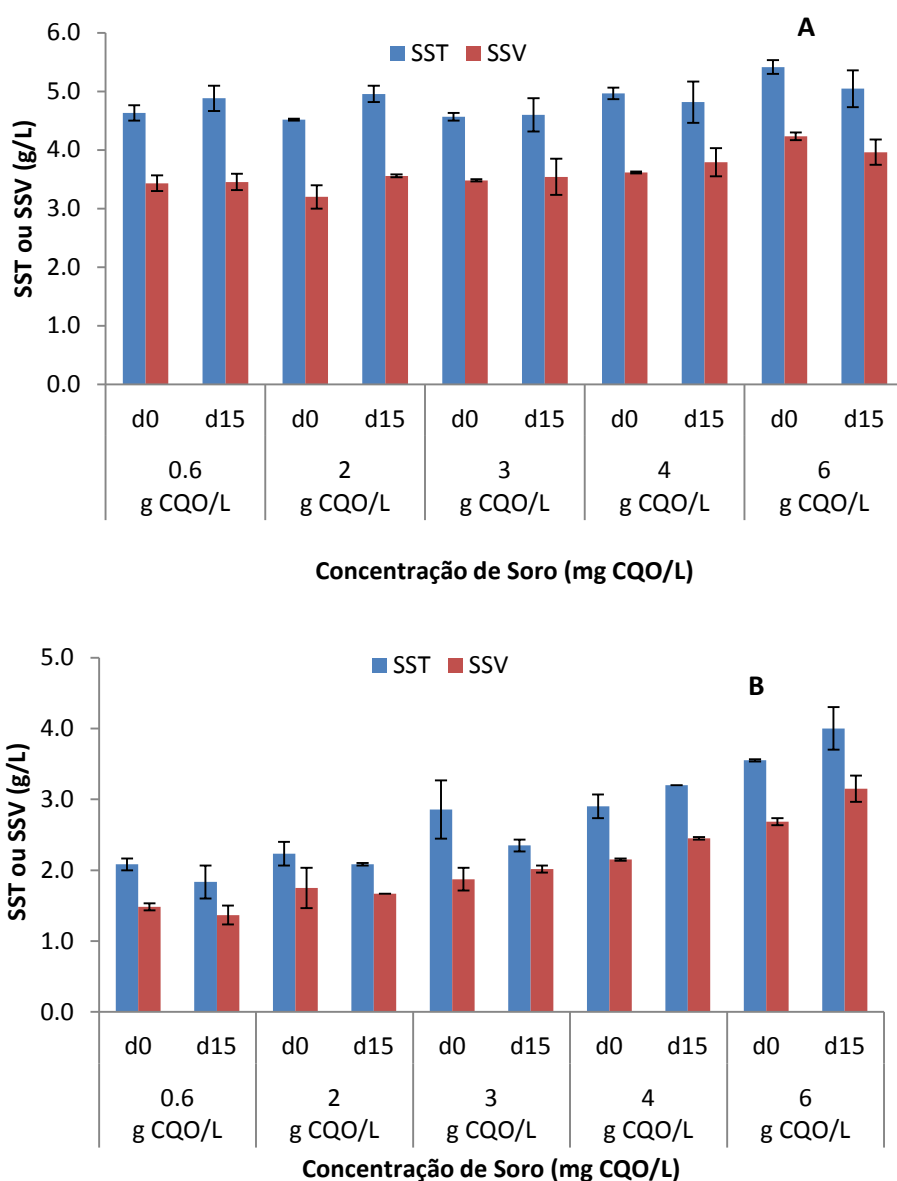


Figura 19 - SST e SSV obtidos em cada ensaio, medidos no início e no final de cada ensaio. A - Lamas novas; B - Lamas Velhas.

Na figura 19a o teor de matéria orgânica presente nos reatores mantém-se aproximadamente contante, entre 3 e 4 g SSV/L. Nesta bateria o tempo de operação foi inferior ao testado na secção 4.1, havendo a possibilidade de a atividade microbiana na produção de metano ou na produção de AOV ter sido mantida. O erro associado à medição é baixo, o que dá fiabilidade aos resultados obtidos.

Os resultados de SSV e SST para os ensaio com o inóculo antigo não foram constantes para todas as condições testadas, provavelmente por o inóculo já ter algum tempo desde a sua recolha e as condições poderão ter sido alteradas, levando à inatividade do consórcio de microrganismos. Também é notório um aumento na quantidade de matéria particulada com o aumento da concentração do substrato.

4.2.4 EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO DE CQO

Na figura 20 estão enunciados os valores de remoção da CQO em relação à concentração de substrato utilizada, registados nestas duas etapas experimentais efetuadas.

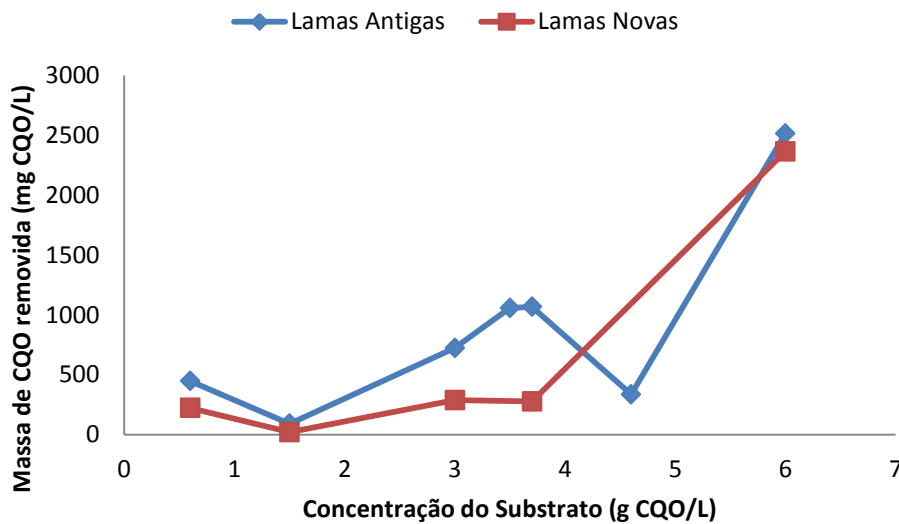


Figura 20 - Remoção de CQO nos dois ensaios efetuados com lamas diferentes.

A carga orgânica mais alta testada nestas duas etapas experimentais (21 g CQO/L) não se encontra representada na figura 20, visto que assume valores díspares comparados com os restantes e tornava-se impercetível a leitura dos dados. Nesta carga orgânica observou-se uma remoção de CQO durante o período experimental de 10590 mg CQO/L. Verifica-se que existe uma tendência crescente de remoção de CQO para cargas orgânica superiores a 7 g CQO/L. Existe uma diferença entre a remoção da CQO dos dois inóculos, comparando os valores obtidos entre a carga orgânica 3 e 6 g CQO/L, o que nos indica que o desempenho dos dois inóculos é distinto.

As eficiências de remoção de CQO para todas as cargas orgânicas estudadas, relativamente ao inóculo menos recente (Lamas Antigas), estão apresentadas na tabela 15.

Tabela 15 - Eficiência de remoção para os ensaios efetuados com as lamas antigas.

Carga Orgânica Estudada (g CQO/L)	Eficiência de Remoção de CQO (%)
0,6	75
2	6
3	25
3,5	22
4	29
5	9
6	42
10	35
11	20
21	50

Analisando a eficiência de remoção é possível observar que os resultados não variam linearmente com o aumento da carga orgânica. Para o inóculo mais recente (Lamas Novas), foram estudadas um número menor de cargas orgânicas e estas encontram-se resumidas na tabela 16.

Tabela 16 - Eficiência de remoção para os ensaios efetuados com lamas novas.

Carga Orgânica Estudada (g CQO/L)	Eficiência de Remoção de CQO (%)
0,6	37
1,5	1,3
3	10
3,7	7,5
6	40

4.3 TESTE DOS INIBIDORES

A terceira etapa experimental teve como objetivo testar um conjunto de inibidores com vista à inibição da metanogénese. Na tabela 17 encontram-se descritos os inibidores testados, bem como as condições de operação iniciais, tais como rácio F/M, CQO e alcalinidade. Os ensaios BES 1 e 3 contêm 20 mM de BES e os ensaios BES 2 e 4 contêm 60 mM. Os ensaios em que foi usado clorofórmio (CHCl_3) contêm 10, 100 e 200 μM deste inibidor. No ensaio da alcalinidade foram estudadas as concentrações de 2309 e 6150 $\text{mg CaCO}_3/\text{L}$, correspondendo aos ensaios Alcalinidade 3 e Alcalinidade 10, respetivamente. Nos ensaios identificados como Garlic 1, 2 e 3 foi adicionado 14, 200 e 312 $\text{mg}_{\text{allicina}}/\text{L}$ respetivamente. No ensaio T1 foi aplicada uma temperatura de incubação de 33°C e no ensaio Ta foi testada uma temperatura de 20°C. No ensaio do branco não foi adicionado qualquer inibidor.

Tabela 17 - Tipo de inibidores e respetivas condições experimentais iniciais testadas.

Inibidor	Rácio F/M	CQO inicial (g CQO/L)	Alcalinidade inicial (mg CaCO_3/L)
BES 1	1,2	8	675
BES 2	1,4	10	1025
BES 3	1,6	11	505
BES 4	2	15	588
CHCl_3 1	0,8	5,6	1125
CHCl_3 2	0,6	5	1000
CHCl_3 3	0,6	5	800
Alcalinidade 3	1	6	2300
Alcalinidade 10	0,8	5,5	6150
Garlic 1	1,7	16,8	1750
Garlic 2	2,7	35	1875
Garlic 3	2,5	45	1750
T1	0,5	4,6	882
Ta	0,7	5	500
Branco	0,6	5	625

Com exceção de duas das réplicas dedicadas ao alho, a gama de valores de F/M testados estão dentro da gama favorável à metanogénese. De acordo com Aquino *et al.* (2009), os valores ideais de F/M para a metanogénese encontram-se na gama entre 0,3 e 1,8 g CQO/g SSV [41].

Tentou-se aplicar a mesma carga orgânica a todas as amostras (5 g CQO/L) exceto nos ensaios BES 3 e 4, em que a concentração de substrato pretendida era 8 g CQO/L. A concentração de substrato, refletida na tabela como a CQO inicial foi conseguida nas amostras dedicadas ao teste do clorofórmio, da temperatura, alcalinidade e branco; nas restantes existem variações.

4.3.1 BES

Para este inibidor metanogénico não houve registo de produção de metano. Foram dedicados quatro *oxitops* ao estudo do efeito inibitório do BES, fazendo variar a concentração do substrato com a concentração de BES introduzida.

Na figura 21 estão representados os valores iniciais e finais de pH para todas as condições testadas com este inibidor.

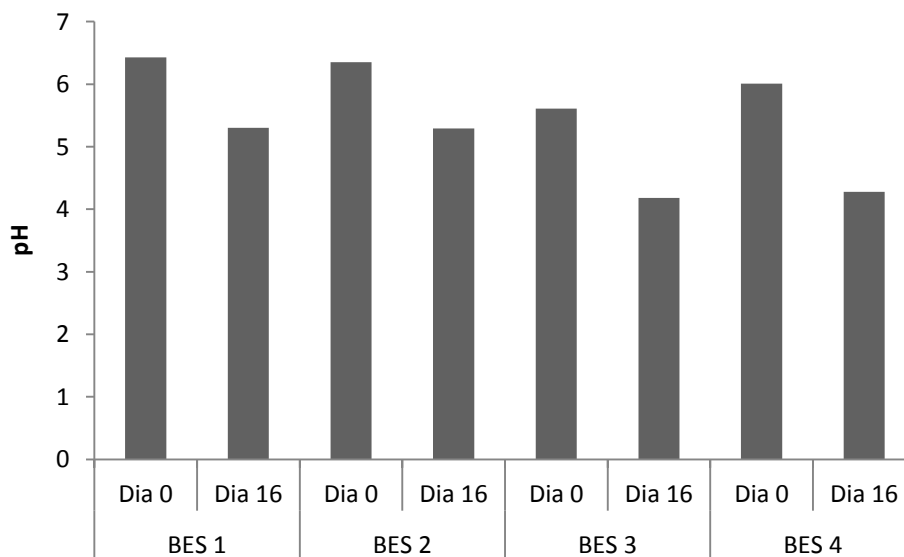


Figura 21 - pH medido no início e final do ensaio usando quatro condições estudadas de BES.

Ocorreu uma diminuição do pH de 6,4 para 5,3, para os ensaios BES 1 e 2, correspondentes a uma CQO inicial de 7,8 e 10,6 g CQO/L e rácio F/M 1,2 e 1,4, respetivamente. Registou-se um aumento da acidificação do substrato com o aumento da carga orgânica e consequente rácio F/M, como se verificou nas etapas experimentais anteriores. Essa acidificação é independente da variação da concentração de BES aplicada para a inibição. Nos ensaios BES 3 e 4 os valores de pH no final do teste estavam abaixo de 4,5.

Os valores da CQO para cada *oxitop* dedicado ao BES estão representados na figura 22. Verifica-se uma degradação e consumo de substrato nos primeiros dias de ensaio, seguindo-se uma estabilização nos dados, no BES 2, 3 e 4.

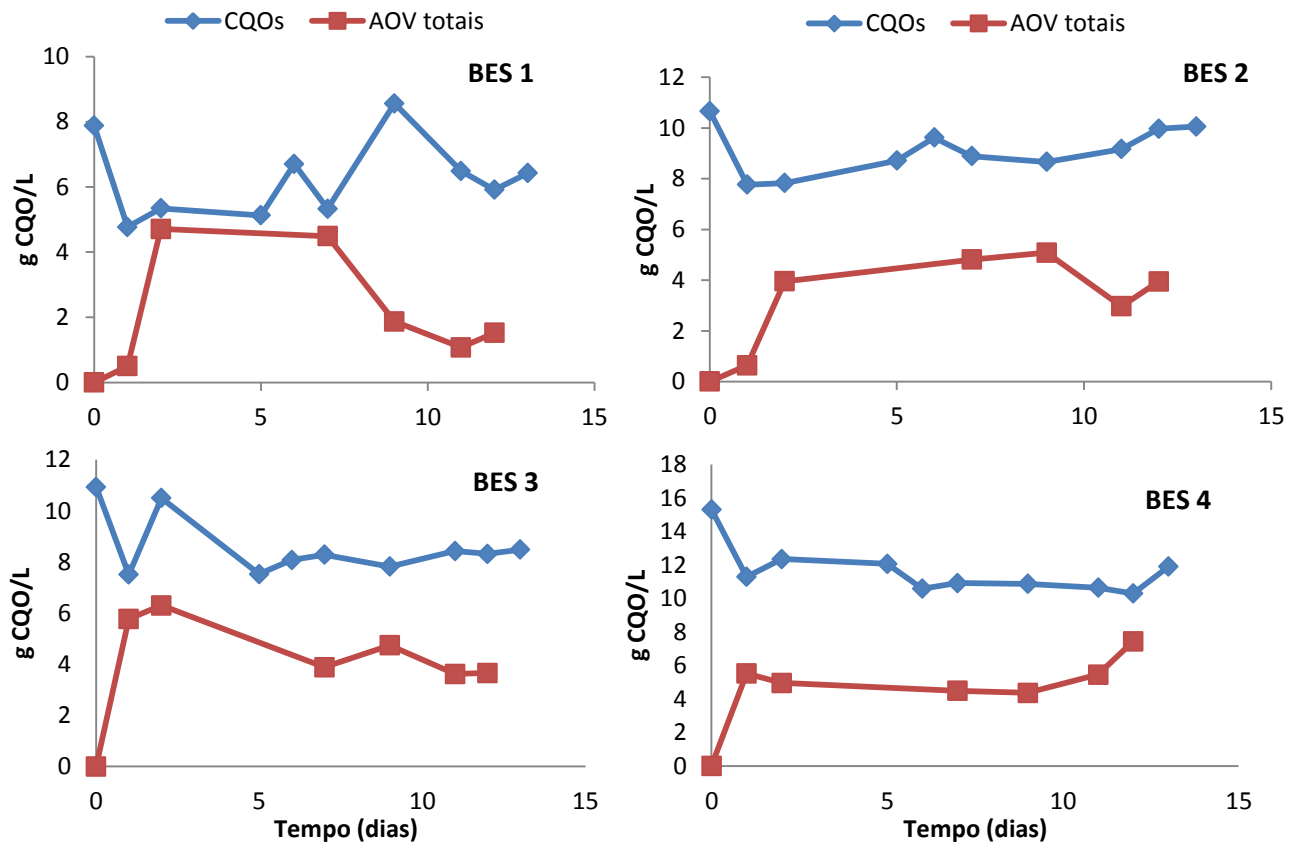


Figura 22 - Evolução de CQO e AOV nos ensaios com o inibidor BES.

A principal diferença entre o BES 1 e 3 e o BES 2 e 4 é relativa ao ponto de maximização na produção de AOV totais. Nos ensaios BES 1 e 3 a maximização dá-se nos primeiros dias de operação (dia 2). No BES 2 o ponto máximo de produção de AOV totais é ao dia 9, seguindo-se uma redução da concentração de AOV no meio. No teste do BES 4, o ponto que regista maior produção de AOV totais é o último dia de medição (dia 12), o que dá a entender que quando são aplicadas concentrações superiores de BES, o tempo de vida das bactérias é prolongado, retardando a fermentação. Esta amostra revela uma tendência crescente na produção de AOV, assim como o consumo da CQO, que apresenta uma tendência decrescente.

Na figura 23 estão representados os valores para os vários tipos de AOV no dia em que se registou a maior produção.

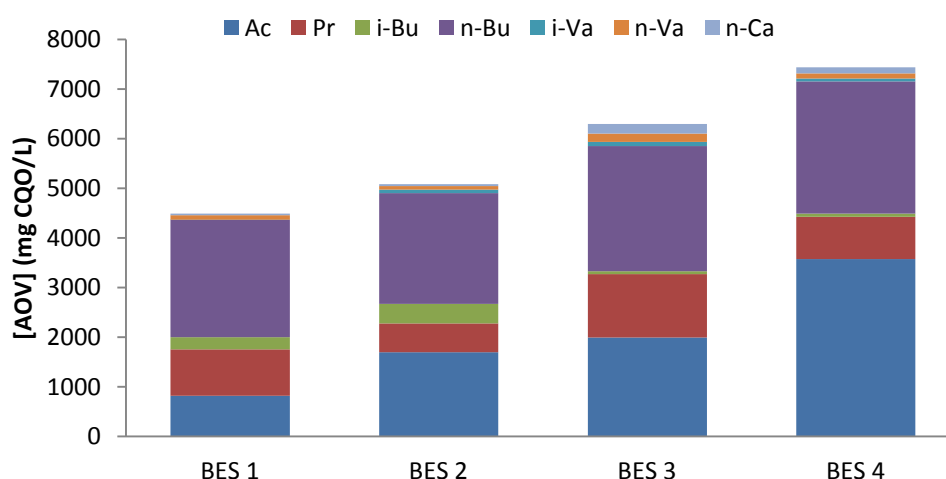


Figura 23 - Composição da mistura de AOV obtida para o dia de produção máxima, para cada amostra de BES.

No teste ao BES como inibidor metanogénico evidenciaram-se duas espécies maioritárias de AOV, ácido acético e ácido *n*-butírico. No caso do BES 1, existe uma semelhança entre os valores de ácido acético e propiónico, 819 e 936 mg CQO/L, respetivamente. Há então uma competitividade entre o ácido acético e o propiónico, em que no caso da amostra BES 1, as concentrações de propiónico chegam a ser superiores às de acético, existindo consumo ou conversão do ácido acético. No entanto, com o aumento da concentração do substrato e da concentração de BES, o ácido acético torna-se a espécie maioritariamente produzida.

O aumento da concentração de BES e da concentração de substrato levou a um aumento da quantidade de AOV produzidos. Inversamente, a quantidade relativa de

ácido propiónico decresce com o aumento da concentração de BES adicionada, no caso de BES 1 para 2 a redução é de 356 mg CQO/L, para os ensaios BES 3 e 4 a redução de ácido propiónico revela-se mais intensa, de 431 mg CQO/L de diferença. A quantidade relativa de *n*-butírico mantém-se regular para todas as amostras realizadas com este inibidor, entre 2234 a 2658 mg CQO/L.

Na figura 24 estão representados os valores do grau de acidificação correspondente ao máximo de produção de AOV, para as diferentes amostras realizadas para o BES.

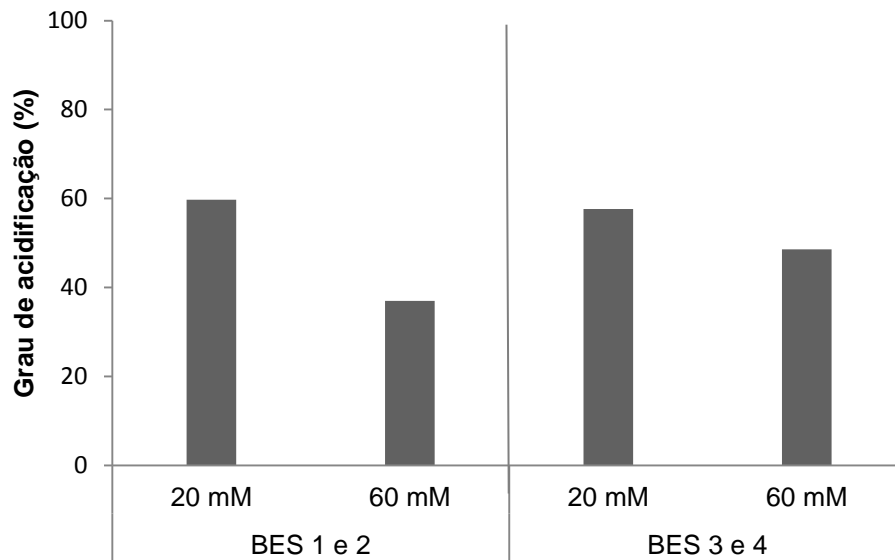


Figura 24 – Valores do grau de acidificação para as amostras de BES.

Na análise da figura 24 é possível verificar que com o aumento da concentração de BES introduzida no meio a percentagem máxima de acidificação (GA) diminui. No caso de concentrações de substrato mais baixas a variação da concentração de BES provoca diferenças entre o GA mais significativas (aproximadamente 23%). Para concentrações de substrato superiores, o decréscimo no GA entre 20 e 60 mM de BES é aproximadamente 10%. Para a mesma concentração de BES, nomeadamente 20 mM (BES 1 e 3), o grau de acidificação máximo é aproximadamente igual (59 e 57% para os ensaios BES 1 e BES 3, respetivamente).

É possível verificar, que o GA máximo é independente da concentração de substrato, pois assume o mesmo valor para BES 1 e 3 (aproximadamente 60%), apesar de em BES 2 e 4 se dar um incremento de 10%.

4.3.2 CLOROFÓRMIO – CHCl_3

Os valores de pH para as amostras de clorofórmio (CHCl_3) para o primeiro e último dia de testes estão apresentados na figura 25. Nos ensaios com clorofórmio obtiveram-se menores taxas de acidificação, exceto para a concentração mais baixa estudada ($10 \mu\text{M}$), em que o pH desce de 6,56 para 5,6, que representa a gama ideal de pH para a formação de H_2 [24].

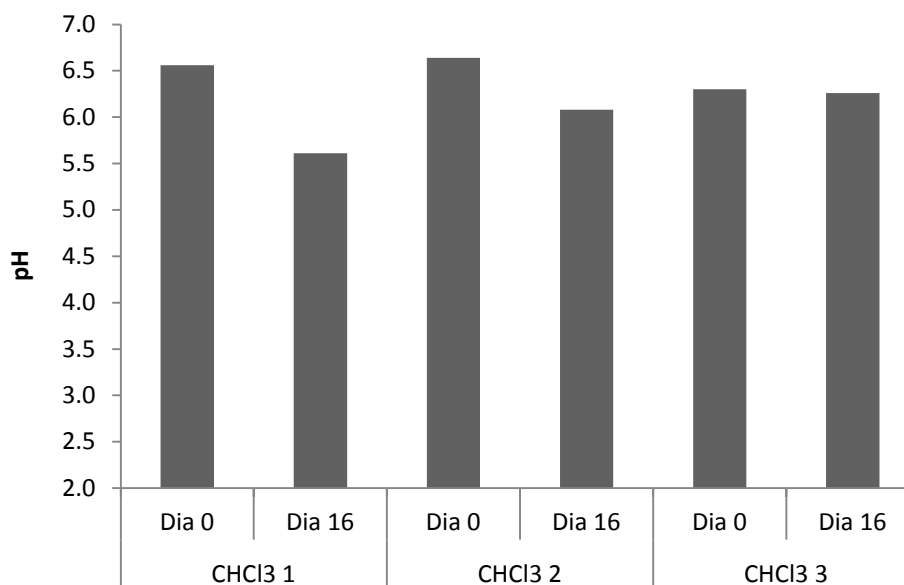


Figura 25 - pH medido no início e final do ensaio usando três concentrações de clorofórmio.

O clorofórmio pode atuar não só na inibição metanogénica, mas também pode inibir as bactérias sintróficas acetogénicas e homoacetogénicas na conversão do acetato a ácido acético o que inevitavelmente vai acabar por inibir a metanogénese, visto que esta tem o ácido acético como substrato principal.

A evolução de CQO e AOV ao longo do tempo para estas condições estão representadas na figura 26.

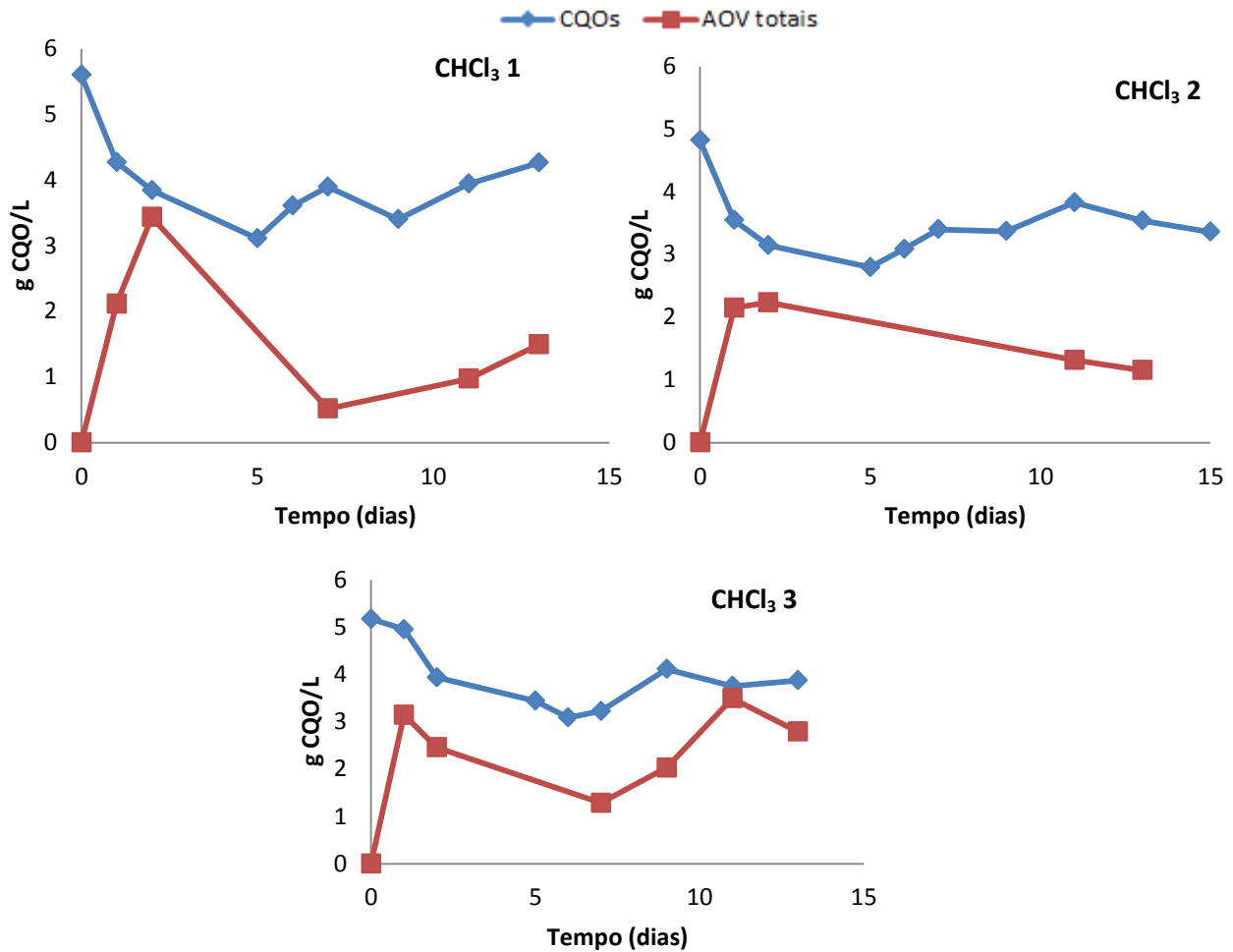


Figura 26 – Valores CQO e AOV para as amostras usando clorofórmio ao longo do tempo.

Na figura 26 é possível verificar um consumo de substrato por parte da população microbiana, principalmente nos primeiros 5 dias de incubação. As amostras CHCl_3 1 e 2 atingem o ponto de produção máxima de AOV no dia 2 de incubação. Este ponto de produção máxima de AOV totais é precoce relativamente à terceira amostra, em que o máximo de produção de AOV ocorre ao dia 11. Para o CHCl_3 1 e 2 é visível uma redução na produção de AOV após o ponto máximo, acompanhada de um aumento de CQO.

Na figura 27 estão representados os valores detalhados dos AOV produzidos no ponto de produção máxima para as três concentrações de clorofórmio utilizadas na inibição da metanogénese.

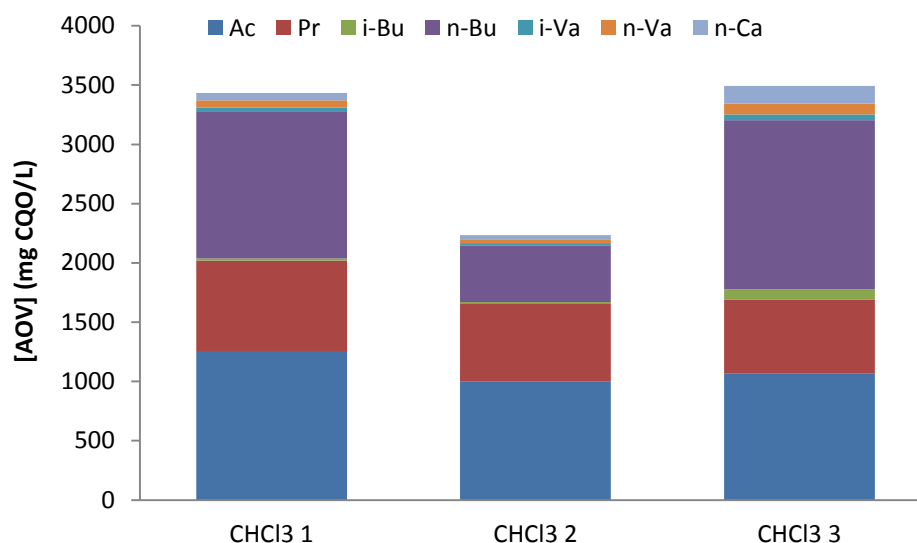


Figura 27 - Composição da mistura de AOV obtida para o dia de produção máxima, para cada amostra de clorofórmio.

Neste ensaio as quantidades de ácido acético e de ácido propiónico são independentes da concentração de clorofórmio aplicada, uma vez que se mantiveram aproximadamente iguais em todos os ensaios. As concentrações de *n*-butírico foram bastante semelhantes para o ensaio com CHCl3 1 e 3, quando aplicadas quantidades de clorofórmio de 10 e 200 μ M, respetivamente. A segunda amostra é a que revela menor produção de AOV. Globalmente não se verifica um aumento da concentração de AOV com o aumento da concentração de clorofórmio.

Na figura 28 estão representados os valores do grau de acidificação para as diferentes amostras realizadas com o clorofórmio.

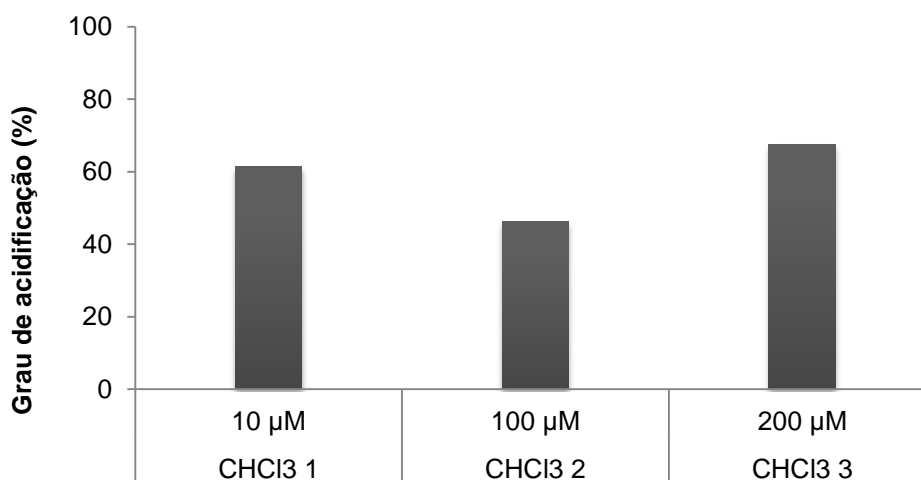


Figura 28 - Valores do grau de acidificação para as amostras com clorofórmio.

O aumento da concentração de inibidor de 10 para 200 μM provoca um aumento na percentagem máxima de acidificação de 61 para 68%. Existe, no entanto, um decréscimo do GA de aproximadamente 15% da amostra CHCl_3 1 (10 μM) para CHCl_3 2 (100 μM).

4.3.3 ALHO (ALICINA) - GARLIC

As réplicas realizadas para esta condição têm a designação de “Garlic 1, 2 e 3” com 14, 200 e 312 $\text{mg}_{\text{alicina}}/\text{L}$, respetivamente, de alho em pó. Na figura 29 estão apresentados os valores de pH para o primeiro e último dia para a avaliação do grau de supressão metanogénico da alicina (componente inibidor presente no alho).

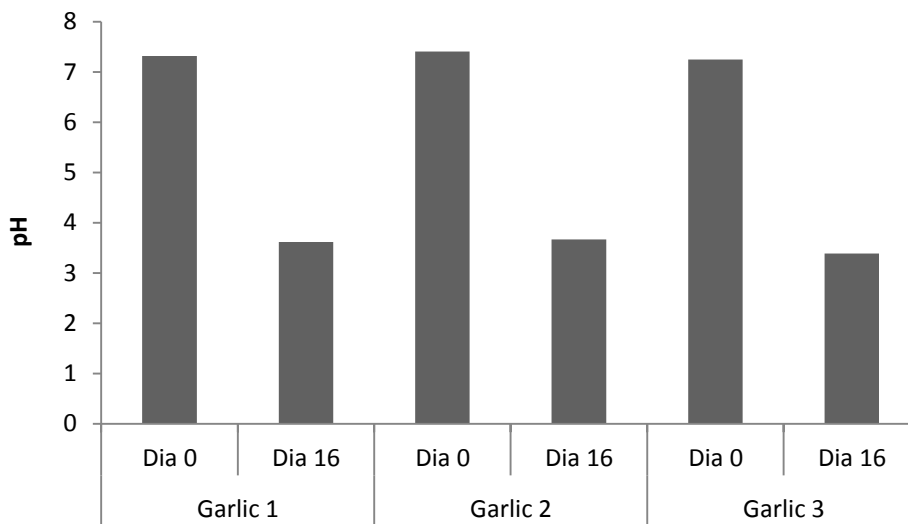


Figura 29 - pH medido no início e final do ensaio usando três concentrações de alicina.

Neste ensaio o substrato foi acidificado até valores de pH próximos de 3,5, não sendo medida alcalinidade no final do ensaio. As bactérias metanogénicas podem ter sido inibidas devido aos baixos valores de pH atingidos nas três réplicas.

A adição de alicina deveria ter sido efetuada segundo o método descrito por Busquet *et al.* (2005), em que adicionou o a alicina diluída em azeite [31]. Ao invés disso, o alho em pó foi triturado e acrescentado em peso ao reator, adicionando involuntariamente, matéria orgânica. O valor da carga orgânica foi muito superior ao pretendido, e por isso a metanogénese poderá não só ter sido inibida pela adição de alicina como também por sobrecarga orgânica.

Na figura 30 estão representadas os valores da CQO e de AOV produzidos nas condições em estudo.

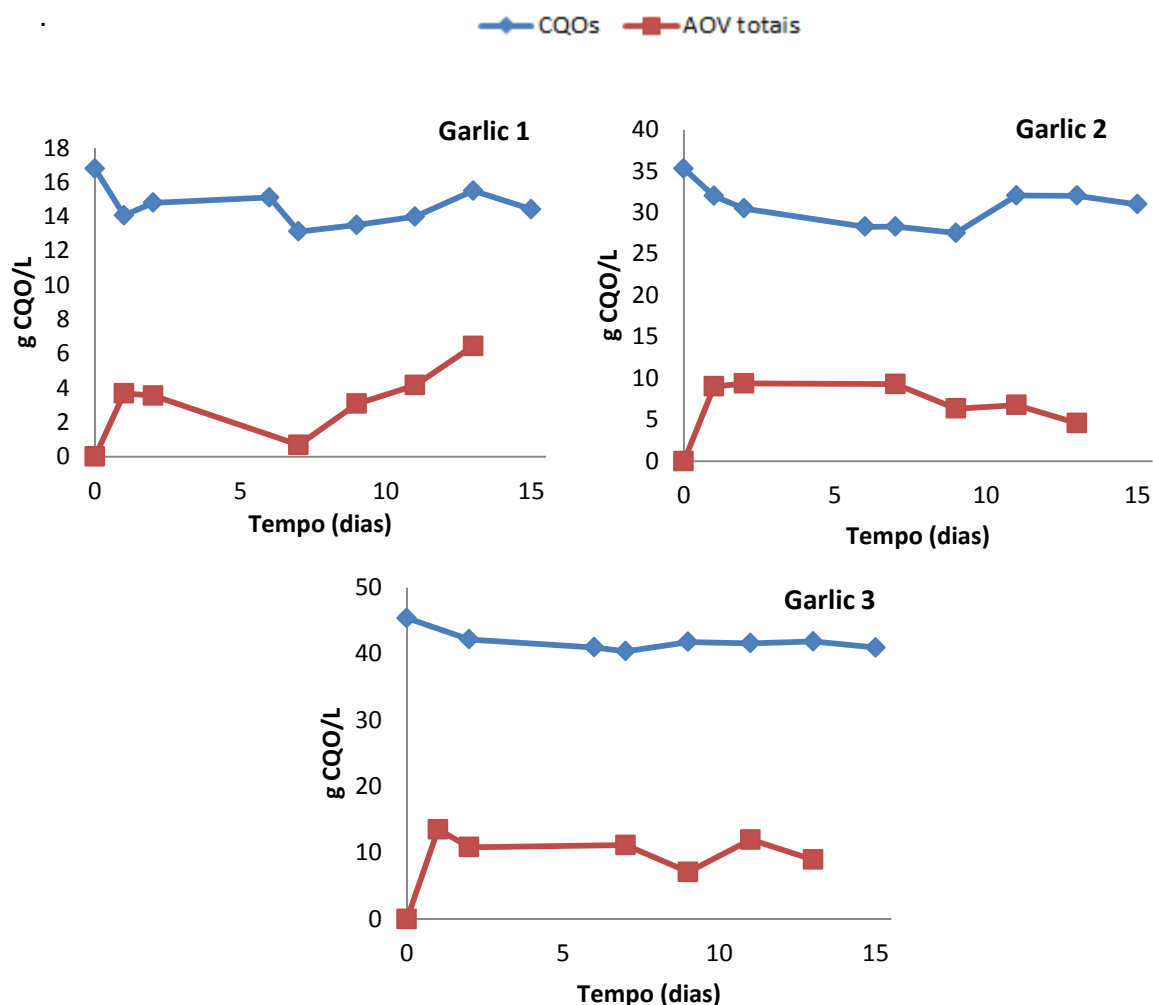


Figura 30 – Valores de CQO e AOV para as três amostras de alicina ao longo do tempo.

A figura 30 ilustra o comportamento da CQO ao longo do tempo e é possível verificar que, apesar de existir algum consumo de substrato, a atividade bacteriana é reduzida para a quantidade de substrato disponível, verificando-se pouca remoção da CQO. Isto poderá dever-se à inibição por sobrecarga orgânica enunciada anteriormente [2]. A amostra que mostra maior grau de acidificação é a que contém menor carga orgânica (aproximadamente 17 g CQO/L) e, conseqüentemente, menor concentração de alicina (14 mg alicina/L).

Na figura 31 estão representados os valores para as várias espécies de AOV produzidas, nas três amostras referentes ao estudo do efeito inibitório do alho.

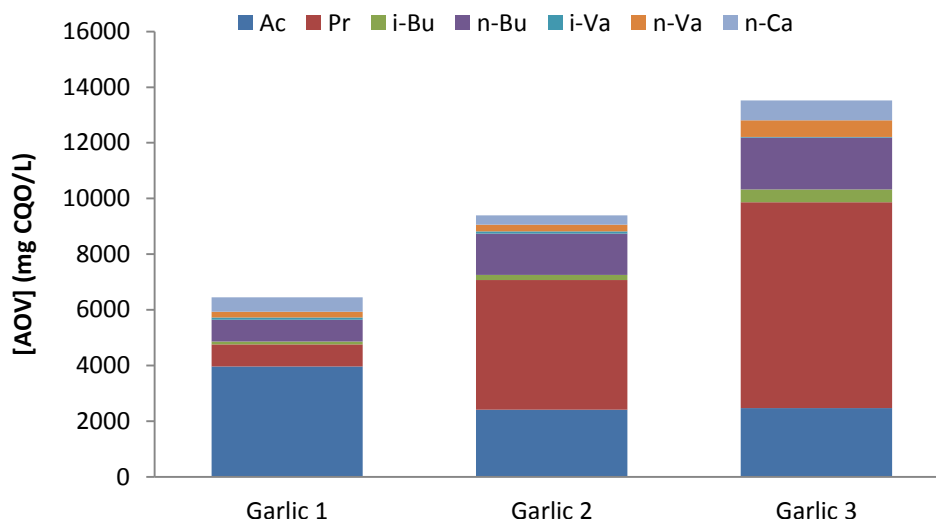


Figura 31 - Composição da mistura de AOV obtida para o dia de produção máxima, para cada amostra de alicina.

A amostra Garlic 1, possivelmente por ter a menor concentração de alicina foi a única que registou uma produção maior de ácido acético ao invés de ácido propiónico, havendo também uma menor produção de AOV. Entre as amostras Garlic 2 e 3 a composição da mistura de AOV produzida é idêntica, sendo o ácido propiónico a espécie maioritária. Salienta-se que as três amostras apresentam uma tendência crescente na produção de AOV totais com o aumento da carga orgânica.

Na figura 32 estão representados os valores do grau de acidificação para as diferentes amostras realizadas utilizando a alicina como inibidor da metanogénese.

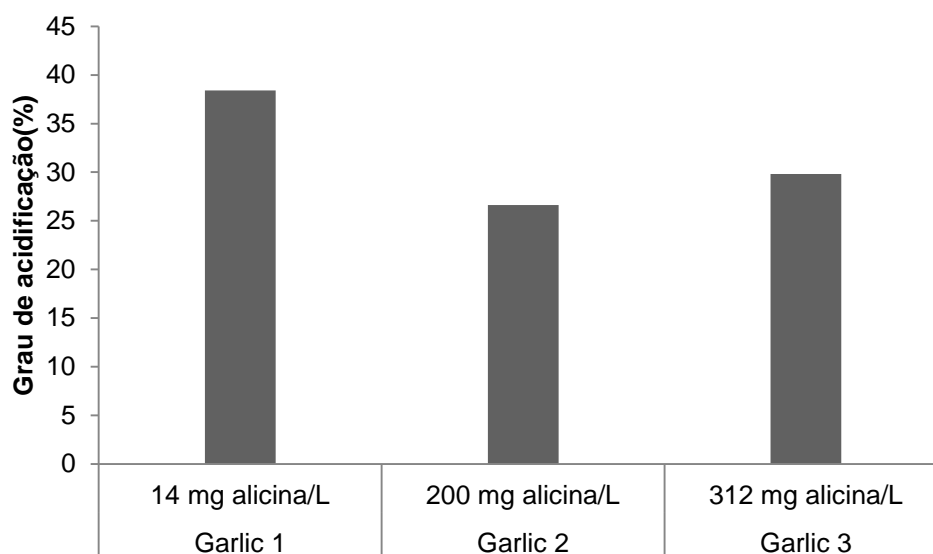


Figura 32 - Valores do grau de acidificação para as amostras da alicina.

O maior GA evidenciado é para a amostra Garlic 1, com menor teor de alicina e concentração de substrato. Apesar da quantidade de AOV produzidos ter aumentado com a carga orgânica aplicada (e aumento da concentração de alicina no meio), a tendência do grau de acidificação é a contrária, pelo que há uma menor transformação do substrato disponível por parte das bactérias.

4.3.4 TESTES TÉRMICOS (T_1 E T_a) E DE ALCALINIDADE (A_3 E A_{10})

Neste ensaio foram testadas duas temperaturas distintas T_1 e T_a , a 33 e 23°C, respetivamente. Foram ainda efetuados dois ensaios com diferentes alcalinidades iniciais A_3 e A_{10} , com 3 e 10 g CaCO_3/L , respetivamente. O branco realizado é uma réplica de controlo, visto que contém as condições inerentes às restantes amostras mas sem adição de nenhum inibidor metanogénico.

Os valores de pH para os ensaios referidos, juntamente com o branco, para o primeiro e último dia da etapa experimental do teste aos inibidores estão apresentados na figura 33.

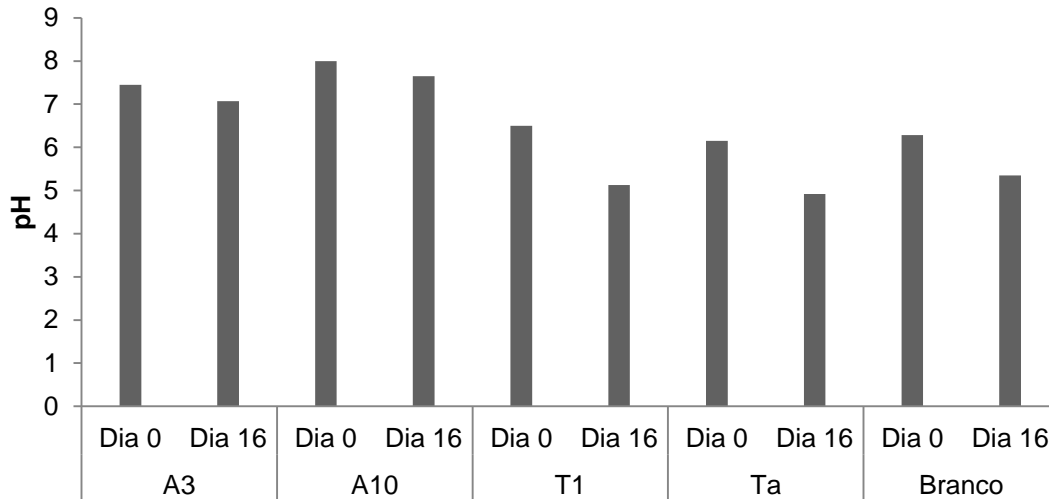


Figura 33 – pH medido no início e final do ensaio para as amostras de alcalinidade, temperatura e branco.

A maior taxa de acidificação (menor valor inicial de pH) é evidenciada nos testes térmicos. Nas amostras com adição de alcalinidade, a acidificação é mínima, registando para o último dia valores de pH que as bactérias metanogénicas toleram (6,5 – 7,5), de acordo com Poggi-Varaldo *et al.* (2008) [2].

Na figura 34, estão representados os valores de alcalinidade das amostras em causa para o primeiro e último dia do desenvolvimento experimental.

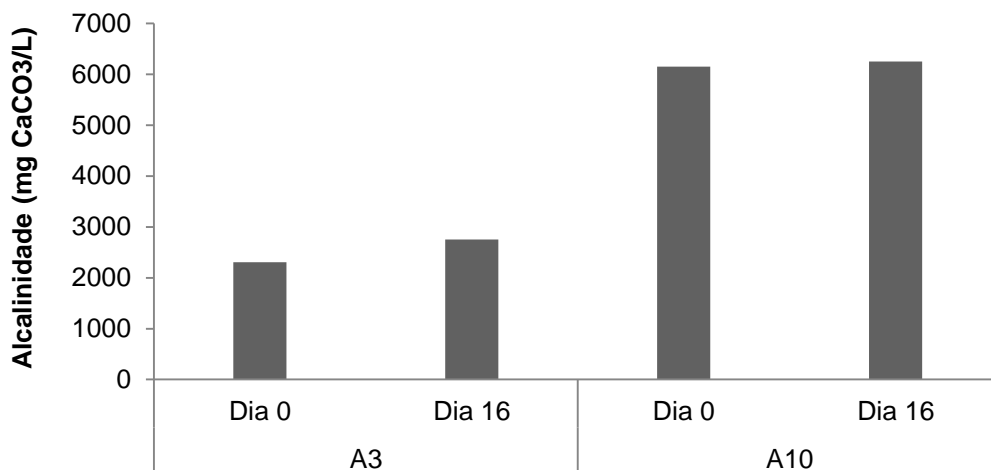


Figura 34 - Valores de alcalinidade para as amostras relativas ao teste da alcalinidade para o primeiro e último dia de operação.

Os ensaios A3 e A10 em que a alcalinidade foi o parâmetro estudado com valores iniciais de aproximadamente 2000 e 6000 mg CaCO₃/L, respetivamente, não registando

grandes alterações no valor da alcalinidade do primeiro para o último dia. Na amostra A3 é visível um aumento de alcalinidade e um decréscimo no pH (figura 33), devido às reações químicas no meio, para além de processos biológicos.

Na figura 35 estão apresentados os valores da CQO e de AOV totais produzidos para os ensaios relativos à alcalinidade (A3 e A10), à temperatura (T1 e Ta) e ao branco.

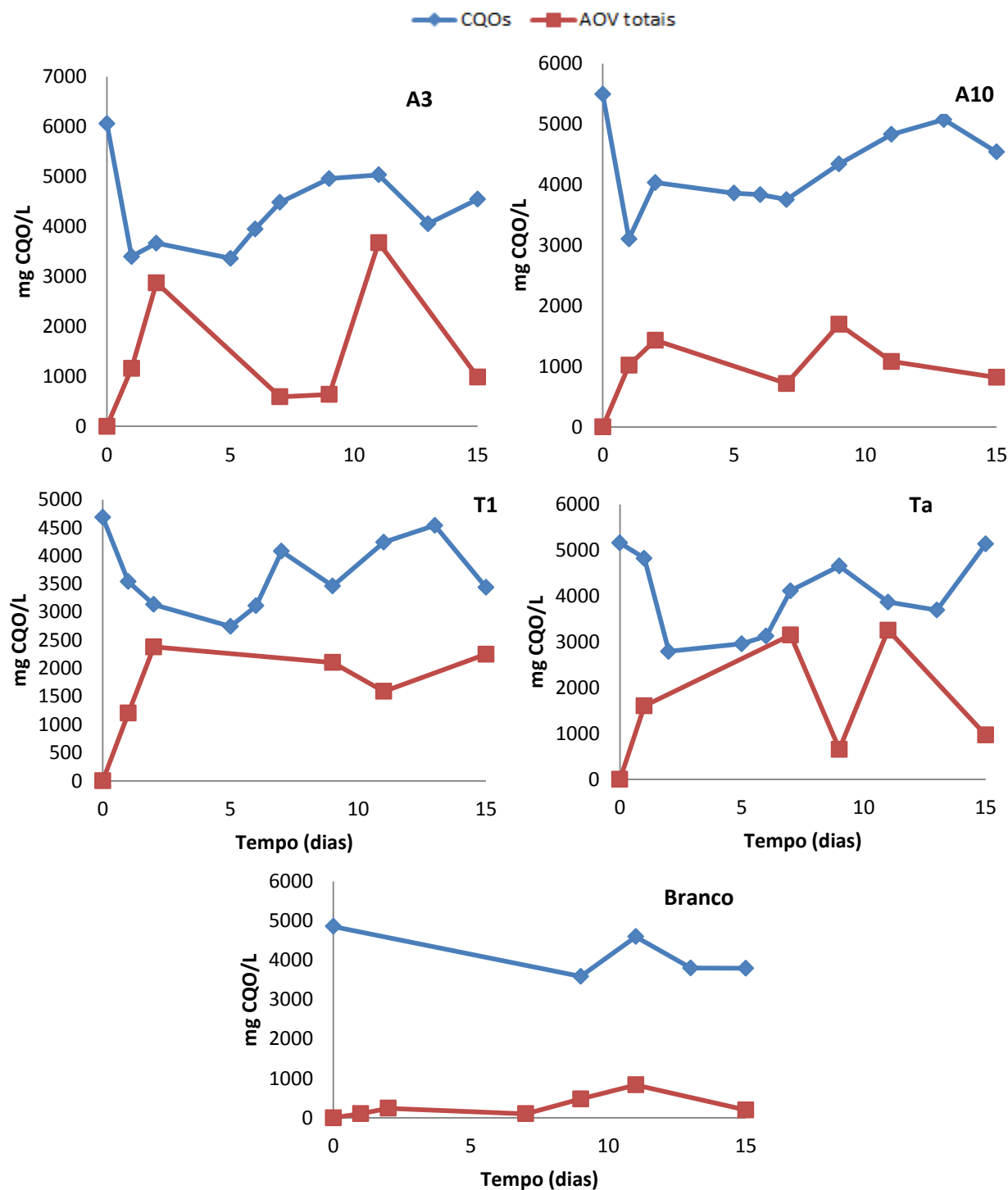


Figura 35 - Valores de CQO e AOV para as amostras relativas à alcalinidade, temperatura e branco ao longo do tempo.

Relativamente aos testes da alcalinidade, estes demonstram grande variabilidade nos dados, para A3 o máximo de produção de AOV totais é no dia 2 aproximadamente 2874 mg CQO/L, visto que o segundo máximo evidenciado no dia 11 (3678 mg COQ/L) que ocorre na sequência de um aumento da CQO, é devido a solubilização da biomassa ou de matéria presente no meio. Quanto à amostra A10 o grau de acidificação aparenta ser menor, com menor concentração de AOV no meio, o que pode evidenciar maior consumo destes por parte das bactérias metanogénicas.

Nos ensaios com diferentes temperaturas há um aumento da CQO juntamente com a diminuição da quantidade de AOV totais, não existindo no entanto uma variação de modo constante ao longo de todo o tempo do ensaio.

O branco apresenta uma ligeira acidificação ao mesmo tempo que a remoção de substrato ocorre. No ponto máximo obteve-se uma concentração de AOV de 800 mg CQO/L.

Na figura 36 são apresentados os dados relativos à produção qualitativa e quantitativa dos AOV para o ponto de maior produção nos ensaios da alcalinidade temperatura e no ensaio de controlo.

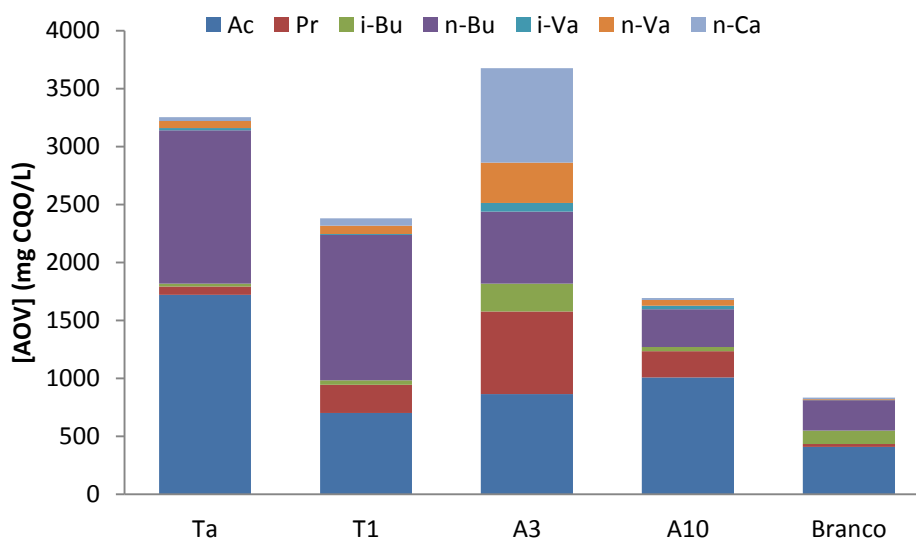


Figura 36 - Composição da mistura de AOV obtida para o dia de produção máxima, para cada amostra da alcalinidade, temperatura e branco.

No ensaio térmico é possível identificar o ácido acético como espécie maioritária para o *oxitop* testado com a temperatura ambiente (Ta), e o ácido butírico para a

temperatura de 33°C (T1). Nota-se uma diminuição na produção global de AOV com o aumento da temperatura.

No controlo da alcalinidade, para a amostra A3 registou-se uma produção elevada de AOV, sendo o ácido acético e o ácido *n*-capróico as espécies que obtiveram maior produção, 864 e 816 mg CQO/L, respetivamente. O ácido propiónico registou 715 mg CQO/L de máximo de AOV para esta condição e o ácido *n*-butírico 622 mg CQO/L. Com o aumento da alcalinidade (A10), a produção global de AOV diminuiu para menos de metade, comparativamente ao valor obtido com alcalinidade mais baixa (A3). Neste caso, o ácido acético foi a espécie mais produzida.

O branco apresenta uma produção mínima de AOV, essencialmente constituída por ácido acético e *n*-butírico.

Na figura 37 estão representados os valores do grau de acidificação obtidos nos ensaios com diferentes alcalinidades, temperaturas e para o branco.

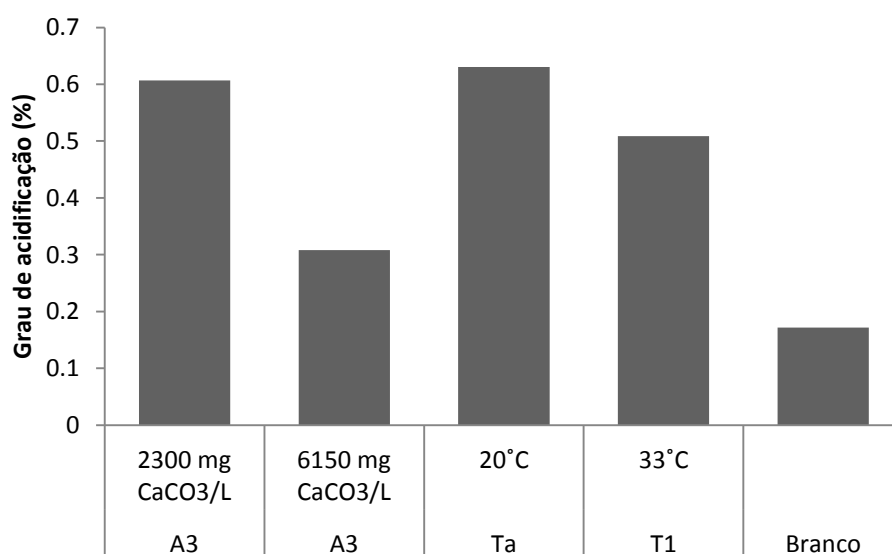


Figura 37 - Valores do grau de acidificação para as amostras de alcalinidade, temperatura e branco.

A percentagem máxima de acidificação diminuiu com o aumento de alcalinidade, uma vez que o efeito tampão evita que o pH desça e que haja as condições favoráveis para a produção de AOV. O aumento da temperatura levou a uma diminuição do grau de acidificação. Neste caso, uma diferença de 13°C provocou um incremento de aproximadamente 13% no GA.

4.3.5 COMPARAÇÃO DE RESULTADOS

Na tabela 18 estão resumidos os parâmetros calculados a partir dos resultados obtidos nos ensaios que utilizaram os diferentes inibidores testados.

Utilizando o BES como inibidor da metanogénese, é a condição BES 4, que contém uma carga orgânica de 15316 mg CQO/L e 60 mM de BES, que produz maior concentração de AOV, num total de 7437 mg CQO/L de AOV, o que representa o maior rendimento de conversão em AOV por quantidade de inóculo introduzida (0,93). No entanto, da CQO que foi removida, apenas 60% dessa foi convertida em AOV, o que representa o rendimento de AOV por CQO mais baixo, comparativamente aos restantes ensaios com BES. Nesse ensaio (BES 4), apesar da alta atividade microbiana na conversão do substrato em AOV ($Y_{AOV/SSV_{In}} = 0,93$), mais de metade do substrato adicionado inicialmente ficou por converter (GA = 51%).

A composição da mistura de AOV produzida alterou-se consoante a concentração de BES adicionada. Com o aumento da concentração de BES, de BES 1 e 3 (20 mM de BES) para BES 2 e 4 (60mM), registou-se maior produção de ácido acético e ácido *n*-butírico (BES 1 e 3) e para uma maximização de ácido acético e ácido propiónico (BES 2 e 4). Pela análise dos resultados presentes na tabela 18, a melhor condição para se usar o BES como inibidor da metanogénese é a condição BES 1, com 20mM de BES e carga orgânica de 8 g CQO/L, devido ao elevado GA e rendimento de conversão (Y_{AOV}), 60% e 0,65, respetivamente. Regista-se um total de AOV produzidos de 4709,5 mg CQO/L para o dia de maximização na produção, para esta condição.

O clorofórmio não é um inibidor específico e influencia também outros grupos bacterianos (homoacetogénicas sintróficas). De acordo com Conrad *et al.* (2000), a concentração ideal deste inibidor para inibir somente as bactérias metanogénicas seria 100 μ M [23].

Analisando qualitativamente a produção de AOV, é visível uma redução significativa na produção de ácido acético, tanto para valores de concentração de clorofórmio superiores a 100 μ M como inferiores. É possível que a adição de clorofórmio tenha inibido previamente as homoacetogénicas na produção de ácido acético, e como tal dá-se a inibição da metanogénese por inexistência da maior parte do substrato usado por estas (ácido acético). Das três concentrações de clorofórmio estudadas, a concentração de 200 μ M registou um GA de 69%, um total de AOV de 3493,6 mg CQO/L, uma conversão do substrato consumido em AOV de 0,71, e uma atividade microbiana na conversão de 0,53. Desta forma, o $CHCl_3$ 2 apresentou as condições que melhor se

adequaram ao objetivo em estudo, havendo uma inibição apenas das bactérias metanogénicas.

Tabela 18 - Resumo dos parâmetros calculados para cada inibidor testado: BES, clorofórmio, alicina, alcalinidade e temperatura.

Parâmetros	BES 1	BES 2	BES 3	BES 4	CHCl3 1	CHCl3 2	CHCl3 3	Garlic 1	Garlic 2	Garlic 3	A3	A10	Ta	T1	
ΔAOV_T ($\text{mg}_{\text{CQO}}/\text{L}$)	4709	3947	6297	7437	3434	2234	3493	6452	9395	13527	3677	1694	3253	2382	
Y_{AOV} ($\text{g}_{\text{CQO}}/\text{g}_{\text{CQOrem}}$)	0,65	0,85	0,85	0,6	0,66	0,57	0,71	0,83	0,66	0,83	0,78	0,29	0,72	0,61	
$Y_{\text{AOV/SSVin}}$ ($\text{g}_{\text{CQO}}/\text{g}_{\text{SSV}}$)	0,69	0,53	0,53	0,93	0,50	0,33	0,53	0,68	0,73	0,76	0,13	0,26	0,45	0,33	
GA (%)	60	37	58	49	61	46	69	38	27	30	61	31	63	51	
Composição relativa de AOV (%)	HAc	18,2	33,4	31,6	48,0	36,3	44,7	30,5	61,5	25,8	18,3	23,5	59,5	53,0	29,5
	HPr	20,9	11,4	20,4	11,5	22,5	29,6	18	12,3	49,6	54,7	19,4	13,5	2,2	10,2
	i-HBut	5,4	7,7	0,9	0,9	0,5	0,5	2,5	1,7	1,9	3,4	6,5	2,1	0,8	1,5
	n-HBut	52,7	43,9	4,0	35,7	36,2	21,4	40,8	12,0	15,7	13,8	16,9	19,3	40,6	52,6
	i-HVal	0,1	1,4	1,3	0,8	0,9	0,9	1,4	1,3	0,9	0,1	2,0	1,7	0,6	0,4
	n-HVal	2,0	1,3	2,7	1,3	1,8	1,5	2,6	3,1	2,5	4,4	9,5	2,9	1,9	3,0
	n-HCap	0,8	0,8	3,0	1,7	1,9	1,6	4,3	8,0	3,6	5,3	22,2	1,0	1,0	2,7

Quando usada alicina como inibidor da metanogénese, verificou-se uma maior produção de AOV no ensaio com a maior carga orgânica (e respetivamente, maior concentração de alicina). O efeito inibitório da alicina é ambíguo, visto que os menores GA evidenciados são para esta condição, compreendidos entre 27 e 38%. Embora do substrato que foi consumido foi convertido 0,83 g CQO/g CQO_{removido} em AOV para os ensaios Garlic 1 e 3, e 0,66 g CQO/g CQO_{removido} para Garlic 2. Ou seja, embora haja uma acidificação do substrato baixa relativamente à quantidade de substrato introduzida, existe uma conversão alta do que foi consumido relativamente aos ensaios para os restantes inibidores. Isto poderá ser devido ao efeito inibitório da alicina, ou à elevada carga orgânica aplicada para estas condições.

Nos ensaios em que foi alterada a alcalinidade inicial adicionada, as cargas orgânicas foram mantidas baixas, por forma a obter baixos ou rácio F/M [38]. Observa-se um decréscimo na produção total de AOV com o aumento da alcalinidade adicionada.

A inibição metanogénica foi conseguida com mais eficácia na amostra A3, visto que quando se aumentou a alcalinidade inicial, a produção total de AOV e o GA diminuíram sensivelmente para metade (de 3677 para 1694 mg CQO/L em AOV e de 61 para 31% no grau de acidificação). Este decréscimo é acompanhado com o aumento na produção de metano, conforme apresentado na figura 38.

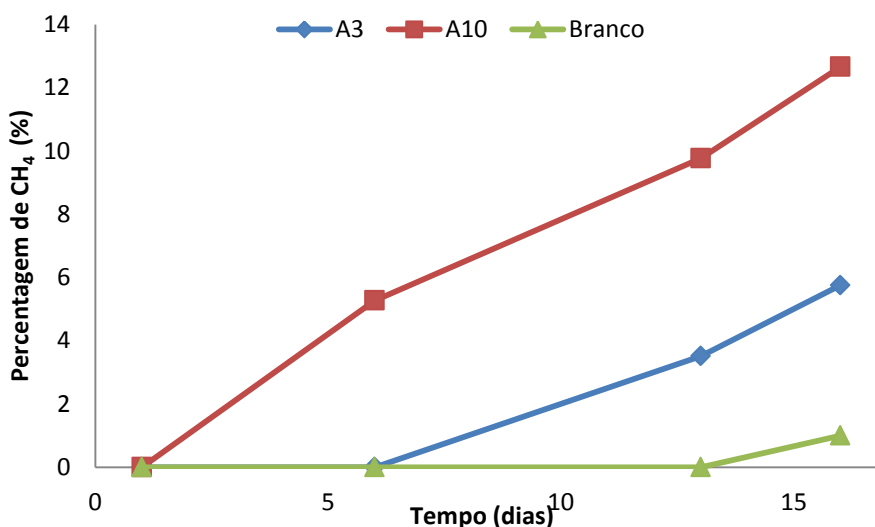


Figura 38 – Valores da produção de metano em percentagem.

A condição A10 foi a que apresentou menor acidificação (figura 33), apresentando no decorrer da experiência valores de pH que favorecem a metanogénese. A condição A3 contém uma percentagem de metano inferior e apresenta uma concentração de AOV

total superior à condição A10. O branco registou uma percentagem mínima de metano no último dia de operação (dia 16).

Nos ensaios térmicos, foram testadas duas temperaturas: T1 e Ta, 33 e 20°C, respetivamente. A acidificação revelou-se mais intensa para a temperatura ambiente (mais baixa). No ponto máximo de produção de AOV obtiveram-se 2382 mg CQO/L a 33°C e 3253,5 mg CQO/L a 20°C, assim como um GA de 51% e de 63% para as temperaturas referidas, respetivamente. As espécies de AOV produzidas maioritariamente são o ácido acético 53 e 30%, para Ta e T1, e o ácido *n*-butírico para 41 e 53%, para Ta e T1. Com a diminuição da temperatura, o rendimento de conversão do consumo da biomassa em AOV aumenta de 0,61 para 0,72, assim como o rendimento de conversão por parte do inóculo em AOV, de 0,33 para 0,45.

Assim para o caso dos ensaios com diferentes temperaturas, conclui-se que a inibição da metanogénese é mais eficaz para gama de temperaturas mais baixas, neste caso, para a temperatura ambiente, o que facilita o processo pois não exige gastos extraordinários em energia para realização dos ensaios.

Na figura 39 encontra-se representada a análise aos SSV e SST feita em todos os ensaios com os inibidores testados, para o primeiro e último dia de operação (dia 16).

Existe um decréscimo da biomassa do primeiro para o último dia em todos os ensaios efetuados, com diferentes tipos de inibidores. No caso da amostra T1 (temperatura de 33°C) este decréscimo é relevante (aproximadamente 3,4 g SSV/L, 48% de remoção), ao contrário de amostras como BES 1 (20 mM BES e carga orgânica de 8 g CQO/L), em que este decréscimo não tão acentuado (aproximadamente 1,3 g SSV/L, 19% de remoção). Esta relação está dependente da quantidade de matéria orgânica introduzida: quanto mais biomassa, maior o decréscimo (degradação) desta ao longo do tempo dos ensaios. A diminuição do teor de sólidos nos reatores denota aumento da morte de microrganismos o que contribui para o aumento da CQO no final dos ensaios.

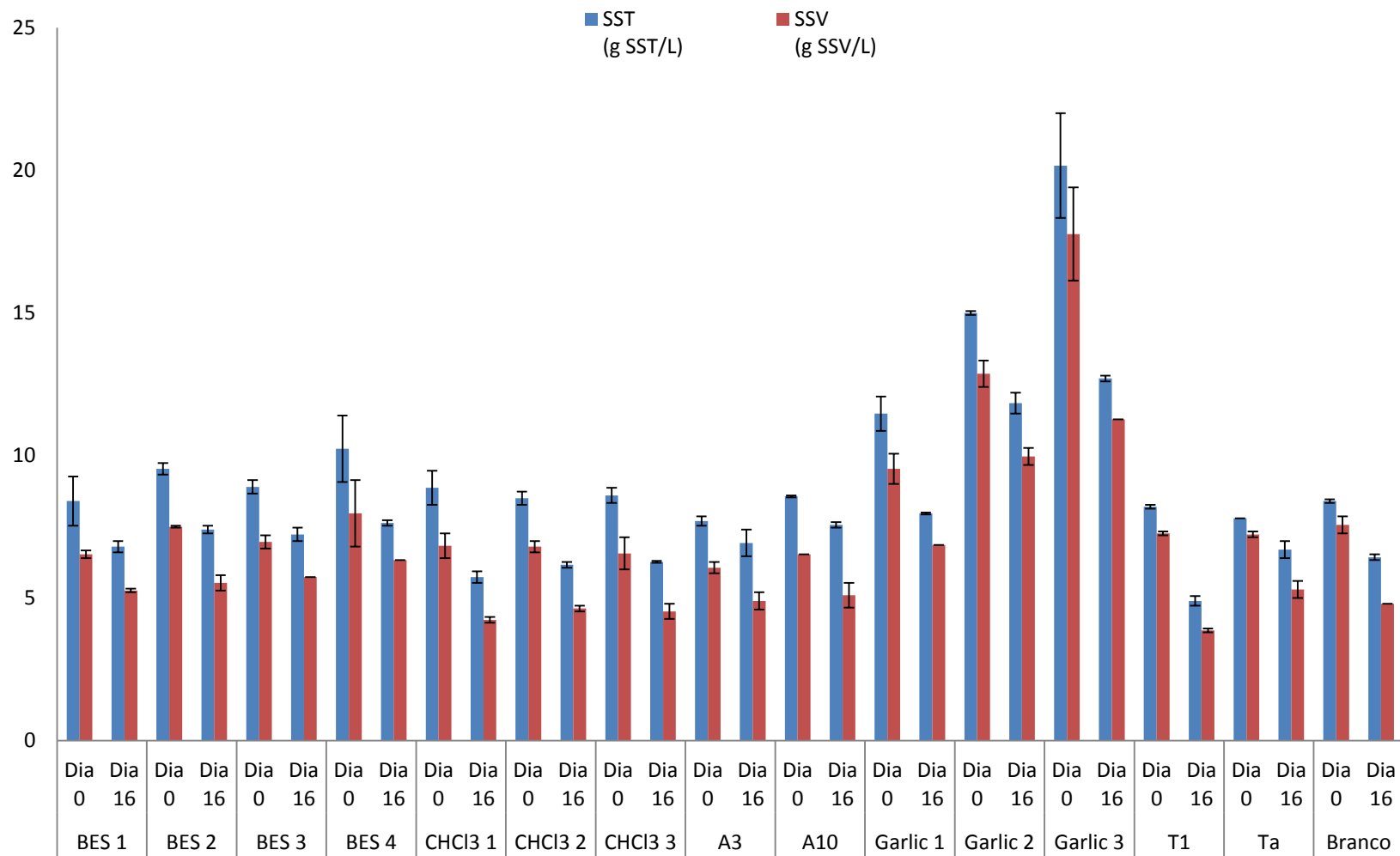


Figura 39 - SST e SSV obtidos em cada ensaio, medidos no início e no final de cada ensaio.

5 CONCLUSÃO

Este trabalho experimental teve como principais objetivos a avaliação do grau de supressão da população metanogénica e o efeito de determinados inibidores da metanogénese na produção de AOV, através da avaliação dos parâmetros cruciais para a otimização dos processos.

Após a análise dos resultados obtidos neste trabalho experimental, foi possível concluir os seguintes pontos:

➤ No primeiro ensaio realizado, relativo ao efeito da carga orgânica, determinou-se que o tempo de digestão não deveria ser superior a 15 dias, dado os tempos de incubação maiores levarem à morte dos microrganismos e ao conseqüente aumento de CQO no reator. Também se verificou que o aumento de carga orgânica potencia a acidificação, existindo uma relação direta entre a quantidade de AOV produzida e o aumento da concentração do substrato (aumento do rácio F/M). No entanto, os valores do grau de acidificação e dos rendimentos de conversão obtidos diminuem com o aumento da carga orgânica.

➤ Relativamente à resposta do sistema a diferentes inóculos, quando se aplicaram cargas orgânicas entre 2 e 3 g CQO/L, com rácios F/M entre 0,6 e 0,8 para lamas novas (LN) e 1,2 e 1,6 para lamas antigas (LA), houve uma maximização na produção de AOV totais e grau de acidificação, para os dois inóculos estudados. Verificou-se que um aumento da carga orgânica para fora desta gama provoca a diminuição da percentagem máxima de acidificação, assim como da produção de metano (fato apenas evidenciado em LN). Utilizando o inóculo antigo (LA) não se verificou produção de metano.

➤ No teste com inibidores metanogénicos a condição do ensaio BES 1, com 20 mM de BES e rácio F/M de 1,2, foi o ensaio que conduziu a melhores resultados, obtendo-se um grau de acidificação (GA) de 60% e um rendimento de conversão de 0,65 gCQO/gCQO_{removido}. O aumento da concentração de BES não mostrou melhorias significativas ao processo.

➤ A maior concentração de clorofórmio utilizada, de 200 µM (CHCl₃ 3), com um rácio F/M de 0,8 foi a que apresentou os resultados mais promissores, com um GA de 69% e um rendimento de conversão do substrato de 0,71 gCQO/gCQO_{removido}.

➤ No teste ao efeito inibitório da alicina foram obtidos os menores graus de acidificação, comparativamente aos restantes inibidores (38, 27 e 30%, correspondentes

à adição de 14, 200 e 312 mg_{alicina}/L respetivamente). No entanto, o rendimento de conversão da CQO removida varia entre 0,66 e 0,83 gCQO/gCQO_{removido}, para as concentrações estudadas. O efeito da adição do composto inibidor da metanogénese presente no alho pode ter sido dissimulado pelo aumento da carga orgânica adicionada em cada um dos reatores, ao ter sido adicionado alho em pó.

➤ No que diz respeito ao teste da alcalinidade como supressor metanogénico, o aumento da alcalinidade levou a um aumento da quantidade de metano produzida (de 6 para 13%), assim como a uma diminuição para aproximadamente metade do GA calculado, (de 61 para 31%) e a um decréscimo do rendimento de conversão de CQO de 0,78 para 0,29 gCQO/gCQO_{removido}.

➤ Com o aumento da temperatura de incubação assiste-se a uma diminuição da quantidade de AOV produzida. De 20°C para 33°C registou-se uma diminuição na percentagem máxima de acidificação de 63 para 51%. Este tipo de inibição é interessante do ponto de vista económico, pois reduz-se a energia utilizada no processo e não se recorrem a inibidores químicos da metanogénese para potenciar a acidificação.

➤ A utilização de clorofórmio na concentração de 200 µM (CHCl₃ 3) foi a condição em que se obteve resultados de acidificação mais promissores, com maior percentagem de acidificação, sendo o melhor inibidor metanogénico testado.

Por forma a completar o estudo efetuado neste trabalho experimental, alguns pontos poderiam ser completados, nomeadamente:

➤ Testar novas gamas de concentração de substrato para os diferentes inibidores testados, por forma a obter mais resultados acerca da forma de atuação de cada inibidor.

➤ A realização de mais réplicas para cada ensaio seria um ponto importante a ter em conta, para validar os resultados obtidos em cada inibidor escolhido para testar neste trabalho.

➤ Alargar os testes de inibição metanogénica a outro tipo de inibição, como a aplicação de altas pressões hidrostáticas.

➤ Através do teste à resposta do sistema a diferentes inóculos conclui-se que, futuramente, devem ser feitos uma série de ensaios ao inóculo antes de o usar em qualquer teste, nomeadamente análise de microscopia para identificação da população metanogénica e testes a atividade metanogénica específica.

Referências bibliográficas

- [1] Smith, S.A., Chen, S. (2006). “*Activity corrections for ionization constants in defined media*”, *Water Science & Technology* 54(4), 21-29;
- [2] Poggi-Varaldo, H., Reyes, A., Pineda-Cruz, J., and Méndez, S., (2008). “Energía Renovable de Tipo Biológico H₂ y CH₄ y Energía Eléctrica Directa a Partir de Residuos Orgánicos: Contribución al Desarrollo Sustentable de México”, “Avance y perspectivas de los procesos biológicos fermentativos para la obtención de H₂ de residuos sólidos municipales e industriales”. *Libros de Ciencia y Tecnología N° 1*, México México (Ecatepec). 135-163;
- [3] Chang, H. N., Kim, N., Kang, J., Jeong, C. (2010). “Biomass-derived volatile fatty acid platform for fuels and chemicals”, *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 15(1), 1-10;
- [4] Alves, M., (2007). “Reactores para tratamento Anaeróbio”, *Reactores Biológicos Fundamentos e Aplicações*. Lisboa: Lidel;
- [5] Lettinga, G. (2005). “*The anaerobic treatment approach towards a more sustainable and robust environmental protection*”, *Water Science & Technology* 152(1-2), 1-11;
- [6] Metcalf & Eddy (2003). “*Wastewater engineering. Treatment disposal and reuse*”. Civil engineering series -Third edition, McGraw-Hill International Editions;
- [7] Abbasi, Tasneem; Tauseef, S.M.; Abbasi, S.A. (2012). “Biogas Energy”. Springer Birefs. 11-22;
- [8] McCarty PL (1982). “One hundred years of anaerobic treatment”. In: Hughes DE, Stafford DA, Wheatley BI *et al.* (eds) *Anaerobic digestion, 1981: proceedings of the second international symposium on anaerobic digestion*. Elsevier Biomedical, Amsterdam, pp 3–22;
- [9] Silva, Flávio C. (2007). “Modelização dinâmica do processo de digestão anaeróbia utilizando o modelo ADM1”. 143;
- [10] World Economic Forum (2010) “The Future of Industrial Biorefineries”;
- [11] Cherubini, F. (2010). “The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals”, *Energy Conversion and Management* 51(7), 1412-1421;
- [12] Kamm, B., Kamm, M. (2004). “Principles of biorefineries”, *Applied microbiology and biotechnology* 64(2), 137-45;
- [13] Rivas, J., Prazeres, A. R., Carvalho, F., Beltrán, F. (2010). “Treatment of cheese whey wastewater: combined coagulation-flocculation and aerobic biodegradation”, *J. Agric. Food Chem.* 58(13), 7871-7877;

[14] Prazeres, A. R., Carvalho, F., Rivas, J. (2012). "Cheese whey management: a review", *Journal of environmental management* 110, 48-68;

[15] Hansen, K. H., Angelidaki, I., Ahring, B. K. (1998). "Anaerobic Digestion of Swine Manure: Inhibition by Ammonia", *Water Research* 32(1), 5-12;

[16] Sankar Ganesh, P, Sanjeevi, R., Gajalakshmi, S., Ramasamy, E. V., Abbasi, S. (2008). "Recovery of methane-rich gas from solid-feed anaerobic digestion of ipomoea (*Ipomoea carnea*)". *Bioresource technology* 99(4), 812-818;

[17] Bao, M., Su, H., Tan, T. (2012). "Biohydrogen Production by Dark Fermentation of Starch Using Mixed Bacterial Cultures of *Bacillus* sp and *Brevumdimonas* sp". *Energy & Fuels* 26(9), 5872-5878;

[18] Canilha, L., Milagre, A., Silva, S., Silva, J., and Rocha, G.J., (2010). Sacarificação da biomassa lignocelulósica através de pré-hidrólise ácida seguida por hidrólise enzimática: uma estratégia "desconstrução" da fibra vegetal. *Revista Analytica: Universidade de São Paulo- Escola de Engenharia de Lorena. Eskalab*, 48-53;

[19] Eastman, J.A., Ferguson, J.F. (1981). "Solubilization of particulate organic carbon during the acid phase of anaerobic digestion". *J. Wat. Pollut. Control Fed.*, 53:3, 352-366;

[20] Parkin, G.F., Owen, W.F. (1986). "Fundamentals of anaerobic digestion of wastewater sludges", *J. Environ. Eng. Div. ASCE*, 112:5, 867-919;

[21] Van Haandel, A.C. & G. Lettinga (1994). "Tratamento anaeróbico de esgotos". *Epgraf. Campina Grande*;

[22] Coates, J. D., Coughlanb, M. F., Colleran, E. (1996). "Simple method for the measurement of the hydrogenotrophic methanogenic activity of anaerobic sludges". *Journal of Microbiological Methods* 26, 237-246;

[23] Conrad, R., Chidthaisong, A., (2000). "Specificity of chloroform, 2-bromoethanosulfonate and fluoroacetate to inhibit methanogenesis and other anaerobic processes in anoxic rice field soil". *Soil Biology & Biochemistry* 32(7), 977-988;

[24] Valdez-Vázquez I., Ríos-Leal, E.; Esparza-García, F.; Cecchi, F.; Pavan, P.; Poggi-Varaldo, H.M. (2004). A review on hydrogen production with anaerobic mixed cultures. In:

Pierucci, S. (Ed.). Chemical Engineering Transactions Vol. 4: 123-130. AIDIC Publ., ISBN 88-900775-3-0. (Proceedings of the H₂-age Conference: When, Where, Why. 16-19 May. Pisa, Italy.);

[25] Oremland, R. S., Capone, D. G. (1988). "Use of "specific" inhibitors in biogeochemistry and microbial ecology". *Advances in Microbial Ecology* 10, 285-383;

[26] Liu, H., Wang, J., Wang, A., Chen, J. (2011). "Chemical inhibitors of methanogenesis and putative applications". *Applied Microbiology and Biotechnology* 89(5), 1333-1340;

[27] Löffler F. E., Ritalahti K. M., Tiedje J. M. (1997). "Dechlorination of chloroethenes is inhibited by 2-bromoethanesulfonate in the absence of methanogens", *Appl. Environ. Microbiol.* 63:4982–4985;

[28] Ungerfeld EM, Rust SR, Boone DR, Liu Y (2004). "Effects of several inhibitors on pure cultures of ruminal methanogens", *J Appl Microbiol* 97:520–526;

[29] Scholten, J., Conrad, R., Stams, A. (2000). "Effect of 2-bromo-ethane sulfonate, molybdate and chloroform on acetate consumption by methanogenic and sulfate-reducing populations in freshwater sediment". *FEMS microbiology ecology* 32(1), 35-42;

[30] Feldberg, R. S., Chang, S. C., Kotik, A. N., Nadler, M., Neuwirth, Z., Sundstrom, D. C., Thompson, N. H. (1988). "In vitro mechanism of inhibition of bacterial cell growth by allicin". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 32(12), 1763-1768;

[31] Busquet, M., Calsamiglia, S., Ferret, A., Cardozo, P. W., Kamel, C (2005). "Effects of cinnamaldehyde and garlic oil on rumen microbial fermentation in a dual flow continuous culture". *Journal of dairy science* 88(7), 2508-16;

[32] Mendes, P. (2008). "Estudo do Teor de Alicina em Alho" Tese mestrado;

[33] Gebhardt, R., Beck, H. (1996). "Differential inhibitory effects of garlic-derived organosulfur compounds on cholesterol biosynthesis in primary rat hepatocyte cultures". *Lipids* 31, 1269-1276;

[34] Zinder, S. H., Anguish, T., Cardwell, S. C. (1984). "Effects of Temperature Methanogenesis in a Thermophilic (58°C) Anaerobic Digester" *Applied and environmental microbiology* 47(4), 808-813;

- [35] Chen, Y., Cheng, J. J., Creamer, K. S. (2008). "Inhibition of anaerobic digestion process: a review". *Bioresource technology* 99(10), 4044-64;
- [36] Coates, J. D., Coughlanb, M. F., Colleran, E. (1996). "Simple method for the measurement of the hydrogenotrophic methanogenic activity of anaerobic sludges". *Journal of Microbiological Methods* 26, 237-246;
- [37] Feng Li, Y., Qi Ren, N., Chen, Y., Xiang Zheng, G.(2006). "Ecological mechanism of fermentative hydrogen production by bacteria". *Int. J. Hydrogen Energy*;
- [38] Arroja, L., Capela, I., Nadais, H., Serafim, L.S., Silva, F. (2012). "Acidogenic valorisation of high strength waste products from food industry", *Industrial Wastes*, (Eds.) K.-Y. Show, X. Guo, Intech, pp. 227-252;
- [39] Demirel, B., Yenig, O. (2002). "Two-phase anaerobic digestion processes: a 24 review". *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 77(7), 743-755;
- [40] Guo, X. M., Trably, E., Latrille, E., Carrère, H., Steyer, J. (2010). "Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: A review". *International Journal of Hydrogen Energy* 35(19), 10660-10673;
- [41] Nath, K., Das, D. (2003). "Hydrogen from biomass". *Review Article* 85(3), 265-271
- [42] Smith, R. L., Klug, M. J. (1981). "Electron Donors Utilized by Sulfate-Reducing Bacteria in Eutrophic Lake Sediments". *Applied and Environmental Microbiology* 42(1), 116-121;
- [43] Winfrey, R., Zeikus, J. G. (1979). "Anaerobic Metabolism of Immediate Methane Precursors in Lake Mendota". *Applied and Environmental Microbiology* 37(2), 244-253;
- [44] Lovley, D. R., Klug, M. J. (1982). "Intermediary Metabolism of Organic Matter in the Sediments of a Eutrophic Lake". *Applied and Environmental Microbiology* 43(3), 552-560
- [45] Mccarty, P. L. (1964). "Anaerobic Waste Treatment Fundamentals";
- [46] Angelidaki, I., Alves, M., Bolzonella, D., Borzacconi, L., Campos, J. L., Guwy, A. J., Kalyuzhnyi, S., Jenicek, P., van Lier, J. B. (2009). "Defining the biomethane potential

(BMP) of solid organic wastes and energy crops: a proposed protocol for batch assays". *Water Science & Technology* 59(5), 927-933;

[47] Yuan, Q., Sparling, R., Oleszkiewicz, J. (2011). "VFA generation from waste activated sludge: effect of temperature and mixing". *Chemosphere* 82(4), 603-7;

[48] Aquino, S. F., Chernicharo, C., Foresti, E., Santos, M., Monteggia, L. (2007). "Metodologias para determinação da Atividade Metanogênica Específica (AME) em Lodos Anaeróbios". *Artigo técnico Vol.12, Nº2*, 192-201;

[49] Rao, G., Mutharasan, R. (1989). "NADH levels and solventogenesis in *Clostridium acetobutylicum*: new insights through culture fluorescence". *Applied Microbiology and Biotechnology* 30, 59-66;

[50] Bengtsson, S., Hallquist, J., Werker, A., Welander, T. (2008). "Acidogenic fermentation of industrial wastewaters: Effects of chemostat retention time and pH on volatile fatty acids production", *Biochemical Engineering Journal* 40(3), 492-499;

[51] Cohen, A., van Gemert, J.M., Zoetemeyer, R.J., Breure, A.M. (1984). "Main characteristics and stoichiometric aspects of acidogenesis of soluble carbohydrate containing wastewaters", *Process Biochemistry*, 19, 228–232;

Anexo A – Inibidores específicos e não específicos, descrição e referência

Grupo	Inibidor	Descrição	Referência
Coenzima M (CoM; H ₂ SCH ₂ CH ₂ SO ₃)	BES (2-bromoetanossulfonato)	São necessários 10mM para suprimir as bactérias anaeróbias metanogénicas (Substrato solo de arroz)	Conrad et al 2000
		Digestor anaeróbico termofílico requer pelo menos 50 mM de BES e concentrações maiores que 50 mM são para a inibição das hidrogenotróficas metanogénicas	Zinder et al 1984
		5-20mM para inibições completas	Wust et al 2009
		Poderá inibir não só as archaea metanogénicas mas também as sintróficas acetanogénicas e afecta indirectamente a interação H ₂ -AOVs dependendo de várias condições	Liu, H. et al. 2011
	MES (2-mercaptoetanossulfonato)	Ação idêntica ao BES são usadas frequentemente em filme fixo	Bouwer and McCarty 1983
CES (2-cloroetanossulfonato)			
	Lumazina	0.6mM é suficiente para inibir o crescimento de várias archaea metanogénicas	Nagar-Anthal et al. 1996
HMG-CoA (Hidroximetilglutanil-S-CoA)	Ácidos gordos saturados de cadeia média e longa (MCFAs)	O ácido hexadecatrienóico inibe 97% a produção de CH ₄	Ungerfeld et al. 2005
		Inibem as Gram-positivas e bactérias metanogénicas por via de absorção e disrupção das membranas celulares	Galbraith and Miller 1973
	Compostos azotados e fosfato (nitrato, nitrito, nitroetano e 2-nitropropanol)	Aceitadores alternativos de electrões, impedem a redução do CO ₂ a CH ₄	Conrad et al. 2000
	Etileno	Gás que inibe a metanogénese em 50% com 0.07% de etileno, a inibição é, no entanto, reversível	Bernhard 1985
	Acetileno	Gás que destrói o gradiente de protões que atravessam a membrana e origina uma quebra no metabolismo	Sprott et al. 1982
	Clorofórmio (CHCl ₃)	Afecta não só as metanogénicas, mas também as homoacetogénicas	Scholten et al. 2000
	Fluoracetato (FCH ₂ COO ⁻)	O fluoracetato é convertido em fluorocitrato que inibe a actividade de aconitase no ciclo tricarbó-xílico e bloqueia o metabolismo de acetato útil para diferenciar entre acetoclástico de hydrogenotrófico metanogénese	Chidthaisong and Conrad 2000
	Fluorometano (CH ₃ F)	O CH ₄ é inibido 75% com 1000 ppmv de CH ₃ F em solo de raízes de arroz, a metanogénese é mais uma vez recuperável com adição de N ₂	Frenzel and Bosse 1996

Figura 40 – Lista de inibidores específicos para a metanogénese, sua descrição e referência.

Inibidor não específico	Descrição	Referência
Temperatura	A temperatura aumenta e as constantes de hidrólise aumentam também, aumentando a velocidade de reação	Poggi-Varaldo 2009
	Pode afetar várias formas a nível bioquímico como: a velocidade de reação, o caminho da reação e a quantidade de microrganismos e o tempo de vida	
	A escala de temperatura favorável à metanogénese está compreendida entre os 35 e os 40 °C (dentro da escala mesofílica)	Conrad et al. 2000
Carga orgânica (S)	A sobrecarga orgânica poderá inibir a metanogénese porque propicia a acumulação de AOVs	Poggi-Varaldo 2009
	Embora afete também o nível de pH, reduzindo-o e influenciando o consumo de hidrogénio por outros meios (solventogénese)	
pH	A escala de pH favorável à metanogénese está compreendida entre os 6.5 e 7.5	Poggi-Varaldo 2009
	Para inibir só a metanogénese terá de se manter o pH entre os 5.5 e 6, visto que para valores inferiores a 5.5 existe consumo de hidrogénio através da solventogénese	
APH (Alta Pressão Hidrostática)	Para inibir as bactérias Gram-negativas requer-se uma pressão de 300MPa	Sousa, F. 2011
	Para as Gram-positivas um intervalo de pressão de 400-600 MPa	
	Para os esporos de bactérias Gram-positivas o intervalo de 700-900 MPa	
	Para esporos de fungos termorresistentes 900 MPa	

Figura 41 - Lista de inibidores não específicos para a metanogénese, sua descrição e referência.

