

## TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DE DIGESTORES ANAERÓBIOS

**Maria Madalena Alves; Manuel Mota; Júlio Maggiolly Novais (\*)**

Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, 4709 Braga codex

(\*) Laboratório de Engenharia Bioquímica, Instituto Superior Técnico, 1096 Lisboa codex

## I-CONSIDERAÇÕES GERAIS

A investigação em Anaerobiose de um modo geral, tem vindo a aumentar nos últimos anos. Uma pesquisa no Biotechnology Citation Index em 91, 92, 93 e 94 refere um número crescente de publicações nesta matéria (Fig. 1).

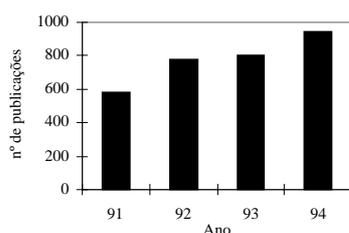


Fig. 1 - Evolução do número de publicações referentes a ANAEROB\*

Exceptuando os processos que ocorrem na natureza, o tratamento de efluentes é, por excelência, o campo em que a anaerobiose se aplica na sua vertente mais complexa. Nos últimos anos assistiu-se a enormes avanços no desenvolvimento da tecnologia em digestão anaeróbia, nomeadamente em desenho de reactores de alta carga em que a biomassa é retida por adesão a suportes, granulação ou reciclagem.

A Fig. 2 representa o número de publicações mais recentes referentes a estudos em tecnologia de digestão anaeróbia, traduzida apenas por estudos nos três tipos básicos de reactores de alta carga - UASB, Filtros e Fluidizados.

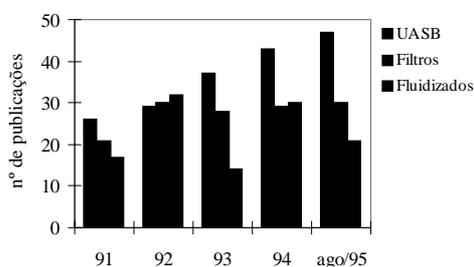


Fig. 2 - Evolução do número de publicações referentes a "UASB", "ANAEROB\* AND FILTER", e "ANAEROB\* AND FLUIDI\*\*"

Desde o final dos anos sessenta, com o aparecimento do Filtro Anaeróbio de Fluxo Ascendente (Young e McCarty, 1967), até à actualidade, surgiram novas configurações de digestores

nomeadamente Filtros anaeróbios de Fluxo Descendente (van den Berg e Lentz, 1979), Reactores Anaeróbios de Leito Fluidizado (Switzenbaum e Jewel, 1980), Reactores de Fluxo Ascendente de Manto de Lamas (UASB) (Lettinga *et al.*, 1980), fusões tipo Reactor Híbrido (UASB + Filtro) (Guiot e van den Berg, 1985) e EGSB (UASB com leito expandido) (De Man *et al.*, 1988) e ainda reactores de vários andares (Guiot *et al.* 1995).

Se se compararem os dados das figuras 1 e 2 repara-se que o total de publicações em tecnologia variou nos últimos anos apenas entre 9 e 12 % do total de publicações referentes a "ANAEROB\*". Da análise da Figura 2 pode ainda avaliar-se que a investigação relativamente a UASB tem vindo a aumentar constantemente, o mesmo não se verificando com as outras configurações de reactores. Pensa-se actualmente que é necessário realizar estudos fundamentais em tecnologia "in situ", no sentido de melhor entender e controlar as bases operatórias, microbiológicas, cinéticas e hidrodinâmicas subjacentes ao processo.

No entanto, a investigação em tecnologia da digestão anaeróbia, nomeadamente o estudo de desenvolvimento de reactores, requer uma dedicação laboratorial constante onde prevalece o trabalho de rotina durante longos períodos de tempo (vários anos) para ser possível a análise coerente de resultados. De entre as várias abordagens possíveis da investigação em digestão anaeróbia esta será talvez das mais penosas e menos compensatórias em termos de resultados práticos (publicações).

O acentuado desenvolvimento tecnológico sustentado pela evolução do conhecimento das bases teóricas do processo tem conduzido a um largo espectro de aplicação da digestão anaeróbia ao tratamento de efluentes industriais (Iza *et al.*, 1991), contrariando a ideia anteriormente estabelecida da sua susceptibilidade a tóxicos, baixa eficiência, lentidão e limitada aplicabilidade.

Contudo, actualmente, a maior parte dos efluentes industriais tratados anaerobiamente provêm fundamentalmente de indústrias alimentares; a extensão a efluentes industriais com compostos recalcitrantes ou tóxicos para os grupos bacterianos envolvidos, parece ser a tendência actual da investigação em digestão anaeróbia (Colleran *et al.*, 1995). O avanço no conhecimento do processo sustentou-se pelo desenvolvimento paralelo e aplicação de métodos e técnicas específicas, sem os quais se teria continuado a considerar os digestores anaeróbios como uma "caixa negra" em que apenas as correntes de entrada e saída eram importantes. É objectivo deste artigo referir brevemente os aspectos essenciais do processo, revendo alguns métodos desenvolvidos recentemente e/ou adaptados de outros já existentes para estudo do processo e apresentando alguns resultados que se considerem relevantes.

## II - O PROCESSO DE DEGRADAÇÃO ANAERÓBIA

Qualquer digestor anaeróbio é um reactor trifásico em que interactivam as diferentes fases havendo trocas recíprocas de substratos e produtos (Fig. 3). O consórcio de microorganismos anaeróbios presente na fase sólida, produz metabolitos que se distribuem entre as fases líquida e gasosa, sendo estes produtos reutilizados numa série de reacções em cadeia até obtenção dos produtos finais, predominantemente metano e dióxido de carbono (Fig. 4).

Num digestor com retenção de biomassa em suportes, este funciona como um elemento adicional a

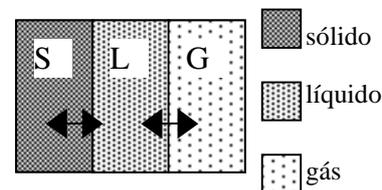


Fig 3 - Representação esquemática das interações observadas entre as várias fases num digestor anaeróbio.

considerar no estudo e caracterização do processo, uma vez que se sabe que a quantidade de biomassa retida e a sua actividade são muitas vezes função do tipo de suporte utilizado (Reynolds, 1986; Yee, 1992).

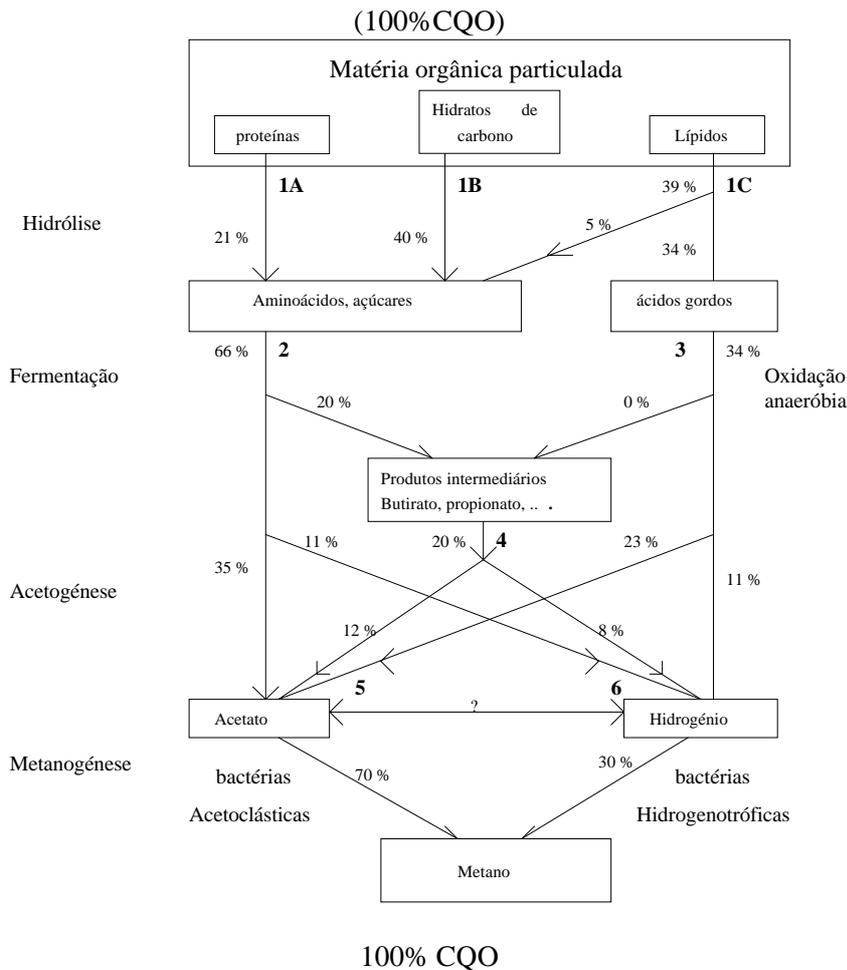


Fig. 4 - Esquema do processo de digestão anaeróbia (Gujer e Zehnder, 1983), adaptado de Kaspar e Wuhrmann, (1978); os valores expressos em %, indicam fluxo de substrato na forma de CQO ou equivalente em metano.

Estequiometricamente, o processo anaeróbio pode ser transcrito simplificada através da equação proposta por Buswell, (1930):

onde  $C_nH_aO_bN_c$  representa um composto orgânico genérico, que é completamente reduzido a  $CH_4$ ,  $CO_2$  e  $NH_3$ .

As etapas de hidrólise e acidogénese consistem de um modo simplificado na hidrólise dos hidratos de carbono, proteínas e lípidos nos correspondentes monómeros que são posteriormente transformados em ácidos gordos voláteis, alcoóis, dióxido de carbono, hidrogénio e amoníaco. Estas transformações são asseguradas por um grupo variado de bactérias mesófilas ou termófilas,

anaeróbias estritas ou facultativas de crescimento relativamente rápido.

A etapa da acetogénese consiste na transformação dos ácidos gordos voláteis em acetato dióxido de carbono e hidrogénio sob a acção de dois grupos de bactérias: homoacetogénicas e as chamadas sintróficas. As bactérias homoacetogénicas produzem acetato a partir de hidrogénio e dióxido de carbono ou de compostos multicarbonados como por exemplo açúcares. O papel destas bactérias no processo da degradação anaeróbia não está actualmente completamente esclarecido (Katinka, 1994). As bactérias sintróficas também chamadas produtoras obrigatórias de hidrogénio (OHPA - obligate hydrogen producing acetogens), necessitam da presença de bactérias consumidoras de hidrogénio para efectuar as transformações que doutro modo são termodinamicamente desfavoráveis ( $\Delta G > 0$ ); normalmente tal é assegurado pelas bactérias metanogénicas hidrogenotróficas (Bryant, 1976) ou, no caso de existir

sulfato no meio, pelas bactérias sulfato-redutoras (Colleran *et al.*, 1995). A existência desta sintrofia tem limitado os estudos destas bactérias em cultura pura; conhecem-se contudo algumas espécies de que são exemplos *Syntrophobacter wolinii* que degrada propionato (Boone e Bryant, 1980), e *Syntrophomonas Wolfei* que degrada butirato (McInerney *et al.*, 1981).

A metanogénese é a etapa final do processo e é responsável directa pela produção de metano. As bactérias metanogénicas pertencem ao reino das arqueobactérias, sendo agrupadas actualmente em três ordens, 7 famílias e 21 géneros. Mais de 65 espécies foram identificadas (Woese *et al.*, 1990). Estas bactérias são anaeróbias estritas, requerendo para o seu desenvolvimento um potencial redox entre -250 e -300 mv. Possuem coenzimas e cofactores específicos (coenzima F420, F430, coenzima M, Metanopterina e Metanofurano) e degradam apenas um número limitado de substratos com baixo número de carbonos de que se salientam o acetato, metanol, metilaminas, formato, e hidrogénio e dióxido de carbono.

Morfológicamente estas bactérias são muito variadas apresentando-se em forma de cocos filamentosos ou bastonetes (Zehnder, 1981). Na Fig. 4 pode observar-se que no processo de degradação anaeróbia a maior parte do metano (70%) provém do acetato (Jeris e McCarty, 1965). Esta conversão reveste-se assim de interesse particular e o estudo das bactérias acetoclásticas tem sido intensificado nos últimos anos. No entanto, até à data apenas dois géneros foram identificados como sendo acetoclásticos: *Methanotrix* e *Methanosarcina*. Estas bactérias além de possuírem morfologias muito distintas (*Methanotrix* surge em filamentosos mais ou menos longos e *Methanosarcina* cresce em agregados de cocos), são muito diferentes em termos cinéticos; *Methanotrix* apresenta maior afinidade para o acetato mas cresce mais lentamente que *Methanosarcina* (Gujer e Zehnder, 1980).

### III - TÉCNICAS DE ESTUDO E CARACTERIZAÇÃO DE DIGESTORES ANAERÓBIOS

Apresentados sumariamente os fundamentos teóricos do processo, coloca-se a questão fundamental de como abordar o estudo da digestão anaeróbia, que técnicas utilizar, que

informação é possível obter e que informação ainda não é possível obter.

Quando se inicia o estudo dos processos de digestão anaeróbia há tendência para pensar que se trata de um simples processo de fermentação e que se podem controlar as variáveis do processo. No entanto, após a percepção da complexidade dos fenómenos envolvidos e avaliado o estado actual dos conhecimentos conclui-se que, apesar dos avanços verificados, existem ainda muitas variáveis que é difícil quantificar com rigor.

Será seguidamente feita uma abordagem na perspectiva da aplicação a estudos em digestores, de alguns métodos existentes para caracterização essencialmente da fase sólida, referindo-se ainda algumas técnicas de monitorização das fases líquida e gasosa, e uma breve referência a aspectos hidrodinâmicos:

• **Fase sólida**

- A. Avaliação da quantidade e qualidade da biomassa, actividades metanogénicas, microscopia de epifluorescência, análise de coenzimas específicos, ATP e aplicação de técnicas imunológicas; estimação de variáveis de estado nomeadamente concentração de biomassa por sensores por programação (“Software sensors”);
- B. caracterização de agregados microbianos, granulação e floculação;
- C. selecção de suportes para imobilização de biomassa.

• **Fase Líquida e Gasosa**

- A. Técnicas tradicionais de análise;
- B. potencialidades da aplicação da espectrometria de massa.

• **Hidrodinâmica em digestores anaeróbios.**

**III.1 - CARACTERIZAÇÃO DA FASE SÓLIDA**

**A. Análise da Biomassa**

Durante muito tempo o arranque dos digestores anaeróbios era feito empiricamente sendo a carga orgânica de projecto baseada no volume do reactor, sem referência à quantidade e qualidade do inóculo nem da biomassa presente no reactor durante a operação (Reynolds, 1986). A quantificação da biomassa, quando existente era

predominantemente medida em termos de sólidos suspensos voláteis (VSS), que apesar de ser uma medida simples e que dá uma ideia da quantidade global de biomassa presente, não distingue entre biomassa e outra matéria orgânica particulada, nem fornece informação sobre a actividade metanogénica potencial. Ao contrário dos processos aeróbios em que um único parâmetro global (consumo de oxigénio) pode ser usado como indicador da actividade dos microorganismos, em anaerobiose, embora o metano constitua um dos principais produtos finais, a actividade dos diferentes grupos tróficos deve ser caracterizada (Iza *et al.*, 1991). Os presentes métodos podem ser classificados do seguinte modo:

- ⇒ Testes de actividade em reactor fechado.
- ⇒ Análise directa da população microbiana: número mais provável (MNP); testes imunológicos especialmente para identificação de bactérias metanogénicas (Kobayashi *et al.*, 1988); utilização de sondas de hibridização de RNA ribossómico (Raskin, *et al.*, 1994); microscopia de contraste de fase, de fluorescência e electrónica.
- ⇒ Análise de substâncias intracelulares: F420, ATP.
- ⇒ Estimação de variáveis de estado nomeadamente concentração de biomassa usando sensores por programação

A maior parte dos métodos de análise microbiana directa estão em fase de investigação, apresentando vantagens e desvantagens. O lento crescimento das bactérias anaeróbias compromete a exequibilidade de métodos como a contagem celular. As técnicas usando

parecem fornecer um elevado poder de resolução na identificação de várias espécies de bactérias metanogénicas que normalmente não se consegue com as técnicas habituais de microscopia; o seu potencial de aplicação nesse aspecto parece ser elevado. A utilidade da microscopia óptica de fluorescência baseia-se na existência de uma substância de nome trivial factor F420, isolada pela primeira vez em *Methanobacterium* M.o.H, (Cheeseman *et al.*, 1972) que absorve fortemente a 420nm na forma oxidada, emitindo uma fluorescência de cor azul esverdeada após excitação a esse comprimento de onda. Esta característica é, segundo o estado actual de conhecimentos, exclusiva das bactérias metanogénicas (Vogels *et al.*, 1988), permite diferenciá-las das não metanogénicas, e dá uma ideia da sua concentração global, mas a identificação de diferentes espécies não é de todo evidente (Mink e Dugan, 1977; Doddema e Vogels, 1978). Além disso, uma das bactérias metanogénicas dominante em digestores anaeróbios, a acetoclástica *Methanothrix*, possui níveis de F420 muito baixos (Gorris, 1988), não sendo praticamente detectada microscopicamente por este método.

A quantificação do F420 intracelular foi sugerida por Delafontaine *et al.* (1989), como medida da actividade metanogénica global parecendo ser um método potencialmente atractivo. No entanto tem a desvantagem de apresentar teores muito variáveis de espécie para espécie (Tabela I). Além disso, os teores de F420 numa dada espécie variam com as condições ambientais, o que obviamente complica a interpretação dos dados obtidos (Colleran *et al.*, 1992). Acresce que, e tal como já referido,

Tabela I - Teores de F420 em diversas espécies de bactérias metanogénicas (Reynolds, 1986; Dolfing e Mulder, 1985)

	Espécie	F420 (nmol/gVSS)
Hidrogenotróficas	<i>Methanobacterium formicicum</i>	1200
	<i>Methanobacterium bryantii</i>	1400
	<i>Methanobrevibacter ruminantium</i>	40
	<i>Methanobacterium arboriphilus</i>	1800
	<i>Methanogenium marisnigri</i>	700
	<i>methanospirillum hungatei</i>	1900
Acetoclásticas	<i>Methanosarcina acetivorans</i>	27
	<i>Methanothrix soehngenii</i>	330

sondas imunológicas, aplicadas à identificação de bactérias metanogénicas por Macário *et al.*, (1985) e por Prensier *et al.*, (1987),

um dos géneros normalmente dominante nos digestores anaeróbios, *Methanothrix*, apresenta um valor de F420 relativamente baixo

apresentando-se um exemplo na Tabela I para *Methanothrix soehngenii*. Outra desvantagem é que, do ponto de vista prático, as técnicas de análise são complexas para análises de rotina, sendo o valor obtido após análise um indicador relativamente pouco significativo da actividade global.

A medida de ATP poderia ser também um indicador da actividade global e alguns trabalhos referem a sua aplicação como medida da actividade global em digestores anaeróbios (Chung e Neethling, 1988). No entanto, dado que a biomassa anaeróbia se apresenta predominantemente formando agregados mais ou menos compactos sendo além disso uma cultura altamente heterogénea, a fase de ruptura celular será um passo crítico a otimizar e além disso os problemas colocados a nível da interpretação dos resultados serão provavelmente semelhantes aos já referidos para o F420. A comparação de valores dos parâmetros atrás citados com dados da literatura torna-se difícil, dado que em muitos casos são utilizados métodos analíticos diversos, sendo os valores expressos em unidades também diversas tornando-se por vezes ambígua a sua inter-conversão (Reynolds, 1986).

O desenvolvimento de sensores por programação (*Software sensors*) para estimação de variáveis de estado e de parâmetros em processos biotecnológicos constitui uma alternativa à falta de meios técnicos de análise (Ferreira, 1995). A aplicação destas metodologias à digestão anaeróbia tem sido abordada por diversas equipas, salientando-se os trabalhos desenvolvidos na Universidade Católica de Louvain sob orientação de Bastin e Dochain e com a colaboração da equipa de Nyns e Naveau da Unidade de Engenharia Biológica da mesma Universidade. Destes trabalhos alguns resultados práticos foram obtidos (Renard *et al.*, 1991; Bellouti, 1994), para aplicações em reactor perfeitamente agitado e na perspectiva do controlo de determinados parâmetros. Com estes métodos é possível estimar, em linha, a quantidade de biomassa presente num digestor anaeróbio por medição de outras variáveis e recorrendo a modelos do processo. A aplicação a sistemas com retenção de biomassa apresenta limitações devido aos inúmeros factores a considerar (hidrodinâmica, cinética, transferência de massa).

Finalmente, referir-se-ão os métodos mais largamente utilizados na caracterização da biomassa em digestores anaeróbios normalmente referidos como **testes de actividade metanogénica específica**. Realizam-se em reactor fechado, em que se monitoriza ao longo do tempo uma variável indicadora da actividade. Na maior parte dos métodos desenvolvidos o indicador de actividade que se utiliza é a produção de metano e não o consumo de substrato, variando de uns para os outros fundamentalmente a técnica utilizada para medição do metano produzido. Os primeiros métodos baseiam-se na medição do metano por deslocamento de líquido (Valcke e Verstraete, 1983), sendo ainda actualmente utilizados (Soto *et al.*, 1993), ou por deslocamento de êmbolos de seringas de vidro cujas agulhas eram directamente colocadas no frasco através da rolha de borracha (Owen *et al.*, 1979). O respirómetro de Warburg também é utilizado para medição de metano (James *et al.*, 1990) e Dolfing e Bloemen (1985) desenvolveram um método em que a produção de metano era seguida por análise cromatográfica do gás produzido em frascos selados. Para tal, o gás deve ser amostrado por seringas especiais que possibilitem a amostragem, independentemente da pressão existente no frasco. Estes autores aplicam o método para obter informação sobre os diferentes grupos tróficos, usando substratos específicos, nomeadamente  $H_2/CO_2$  para avaliar actividade das bactérias hidrogenotróficas. Do ponto de vista prático este método não é muito atractivo por envolver inúmeras análises cromatográficas além de que as velocidades iniciais (quando a  $\%CH_4$  é baixa) são afectadas de um erro considerável (Colleran *et al.*, 1992). Shelton e Tiedje (1984) usaram pela primeira vez transdutores de pressão aplicados a ensaios de biodegradabilidade. Este método foi adaptado por Reynolds (1986) e Concannon *et al.* (1988 a e b) da Universidade de Galway na Irlanda para aplicação a testes de actividade metanogénica usando substratos não gasosos (acetato, butirato, propionato, etc.). Os transdutores usados para medir electronicamente a pressão foram especialmente desenhados de acordo com as condições operatórias dos testes (volume, concentração de biomassa e substrato, etc), de modo a garantirem o máximo rigor nas leituras de pressão. Concannon *et al.* (1988 a) desenvolveu também um sistema

computorizado permitindo a medição simultânea em vários frascos. A medição do conteúdo em metano no final do ensaio permite a correlação da pressão desenvolvida com o metano produzido. Posteriormente, o método foi estendido à medição da actividade metanogénica usando substratos gasosos (Coates, 1991), permitindo avaliar a actividade das bactérias hidrogenotróficas.

Para elevadas actividades das bactérias hidrogenotróficas, verificou-se que a transferência de  $H_2$  para a fase líquida era o passo limitante, tendo sido desenvolvido um rigoroso protocolo definindo as condições de mistura, pressão inicial, fracção de volume de gás *versus* líquido etc, sendo agora considerado um método preciso de medição da actividade hidrogenotrófica. Na Fig. 5 pode ver-se o tipo de dados obtidos com este método aplicado para determinação da actividade acetoclástica (a) e hidrogenotrófica (b) de uma amostra de biomassa retirada dum filtro anaeróbio laboratorial.

O tipo de resultados obtidos com este método estão de acordo com valores

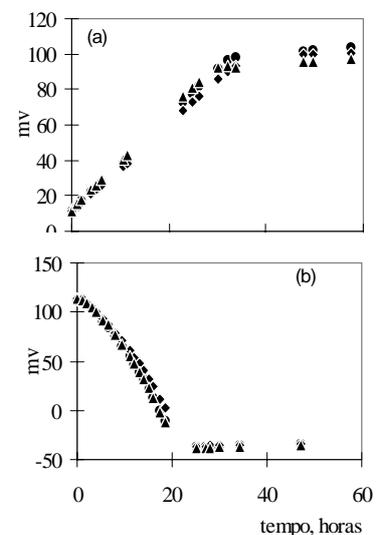


Fig. 5 - Exemplo do tipo de dados obtidos na determinação de actividades metanogénicas usando transdutores de pressão. (a) actividade acetoclástica; (b) actividade hidrogenotrófica. (Alves *et al.*, dados não publicados)

referidos por Dolfing e Bloemen (1985). No entanto, mais uma vez se refere que é urgente definir e padronizar métodos de medição de actividades metanogénicas para que os valores possam ser comparados.

Considera-se ainda que, entre os vários métodos existentes actualmente, o desenvolvido na equipa de Emer

Colleran da Universidade de Galway parece ser atractivo não só pelo tipo de resultados que permite a nível da medição de actividades e toxicidades para os diferentes grupos tróficos, mas também porque do ponto de vista prático é bastante fácil de executar.

**B. Caracterização de agregados microbianos.**

Com o desenvolvimento no início dos anos oitenta do reactor UASB (Lettinga *et al.*, 1980), e tal como referido na nota introdutória, imensos trabalhos de investigação versaram o estudo e caracterização deste sistema bem como dos agregados de biomassa que é suposto existirem neste tipo de reactor. O UASB baseia-se na retenção de biomassa sem qualquer suporte, apenas pela formação de agregados microbianos altamente densos (grânulos). Com base no estado actual de conhecimentos e apesar da extensa lista de trabalhos publicada neste domínio, as bases teóricas que sustentam a formação destes agregados não estão completamente definidas; Hulshoff Pol e Lettinga (1986) referem que realmente a fase de arranque deste tipo de reactores é delicada, lenta e um elevado número de factores é apontado por estes autores como sendo importantes, à data da publicação, no arranque deste tipo de reactores. Salientam-se os seguintes: utilização de inóculo com elevado teor de sólidos (>60 g de sólidos suspensos totais/l); aplicação da recirculação do efluente se a concentração do substrato expressa em CQO for superior a 5000 mgO<sub>2</sub>/l; concentração de acetato abaixo de 1000 mg/l. O fenómeno de desgranulação com flutuação da biomassa compromete o funcionamento destes digestores, e é frequentemente referido como sendo a principal desvantagem deste sistema de tratamento (Weiland e Rozzi, 1991; Hawkes, *et al.*, 1995).

Actualmente a questão da diferenciação entre biomassa granular e não granular reveste-se de particular importância dado que muitos autores se referem a agregados microbianos pelo nome genérico “grânulos” sendo que em muitos casos se trata de biomassa floculenta que não possui as características mais importantes de sedimentação, densidade e resistência mecânica atribuídas aos “verdadeiros” grânulos (Hulshoff Pol *et al.*, 1986). Vários tipos de grânulos são referidos na literatura com características de cor, forma e actividade muito distintas (Kosaric *et al.*, 1990). A biomassa

anaeróbia não granular (entendida como aquela que não possui as características importantes dos grânulos), é mais difícil de caracterizar, provavelmente devido à sua natureza deformável e consequente dificuldade de manuseamento.

Recentemente, a análise de imagem, acoplada à determinação da dimensão fractal da superfície das partículas foi sugerida no sentido de fornecer um novo parâmetro de diferenciação flocos e grânulos (Bellouti *et al.*, 1995). A teoria fractal desenvolvida por Mandelbrot (1982), permite descrever sistemas ou objectos com formas irregulares ou indefinidas. A dimensão fractal é o parâmetro numérico que traduz essa definição. Basicamente, enquanto as dimensões no espaço euclideano se resumem a números inteiros 0, 1, 2 ou 3 para pontos, linhas, superfícies ou volumes respectivamente, a teoria fractal assume que as dimensões, podendo ser fraccionárias, descrevem melhor as formas dos sistemas, objectos e Universo em geral. Os campos de aplicação da teoria fractal são inúmeros e muito variados, por exemplo na estrutura do solo e sistemas de raízes (Crawford *et al.*, 1989, Berntson, 1994), natureza do citoplasma (Aon, 1994) e aplicações na imunologia (Sadana e Ram, 1994). Surgem também na literatura aplicações a agregados microbianos presentes em sistemas de tratamento de efluentes (Li e Ganczarczyk, 1989). Na Fig. 6 apresentam-se imagens digitalizadas, a título de exemplo, de um grânulo (obtido dum digestor de tratamento de efluentes da pasta de papel) e de um floculo (obtido dum

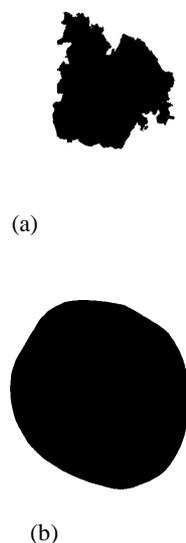


Fig. 6 - Imagens digitalizadas de um floculo (a) e de um granulo (b)

filtro anaeróbio laboratorial alimentado com efluente lácteo sintético), podendo apreciar-se as diferenças morfológicas na irregularidade de sua superfície. A determinação da dimensão fractal de duas populações deste tipo de agregados com diferentes tamanhos, conduziu ao resultado geral apresentado na Fig. 7.

Enquanto que para os flocos a dimensão fractal variou aleatoriamente com o tamanho das partículas, no caso dos grânulos, a partir de determinado tamanho de partícula, não houve variação significativa. No entanto, a

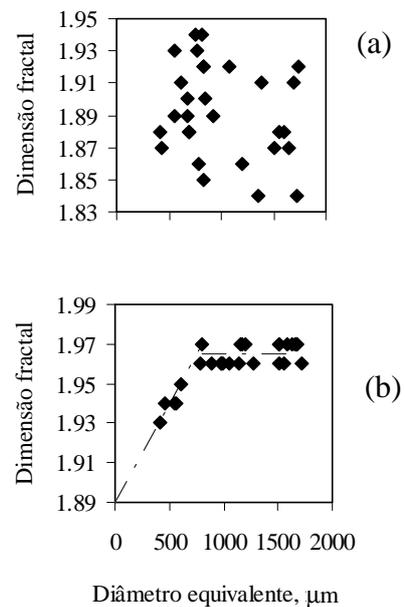


Fig 7 - Dimensão fractal de flocos (a) e grânulos (b)

tendência mostrou ser linear para diâmetros pequenos e, curiosamente, o valor extrapolado para diâmetro equivalente nulo foi igual à média da dimensão fractal obtida para a população de flocos (1.89). Será que isto significa que o início da formação dum grânulo é em termos morfológicos semelhante a um floculo? Este é um problema que se encontra em fase de estudo.

**C Seleccção de suportes para imobilização de biomassa**

O recurso a suportes para imobilização de biomassa é necessário nalguns tipos de digestores, nomeadamente nos filtros anaeróbios e nos leitos fluidizados. A seleccção do suporte é das primeiras decisões a tomar aquando do arranque deste tipo de

digestores tendendo normalmente a ser minimizada a sua importância ao nível de eficiência dos reatores. Na verdade a resposta sobre qual o melhor suporte a utilizar em determinado caso não é, obviamente, simples.

Será feita uma revisão relativa à selecção de suportes para filtros anaeróbios e para leitos fluidizados separadamente, por se considerar que envolvem fenómenos distintos.

⇒ **Seleção de suportes para filtros anaeróbios de fluxo ascendente**

O filtro anaeróbio de fluxo ascendente (Young e McCarty, 1967) consiste numa coluna contendo um material de suporte, no interior do qual é possível reter elevadas quantidades de biomassa, aderida na sua superfície, e dispersa pelos espaços vazios da matriz, encontrando-se esta normalmente na forma de agregados floculentos (Young, 1991).

Os meios de suportes utilizados em filtros anaeróbios têm sido em geral, de características muito variadas, quer em termos dos materiais utilizados (pedras, tubos de PVC, esponja de poliuretano, argila expandida, etc) (Young e McCarty, 1967; Wilkie e Colleran, 1984), quer em termos da sua disposição no leito-ordenado ou aleatório. Anderson *et al.*, (1994) compararam meios porosos e não porosos como suporte para imobilização de biomassa num filtro anaeróbio e concluíram que o reactor com suporte poroso era mais eficiente que o reactor com suporte não poroso.

Num filtro anaeróbio de fluxo ascendente, normalmente a maior parte da biomassa (cerca de 60 a 90% da biomassa total) não está aderida na superfície do suporte, mas sim aprisionada nos espaços intersticiais da matriz (Young, 1983; Reynolds, 1986). A proporção relativa das duas formas de biomassa dependem do tipo de suporte e condições operatórias. Talvez por esse motivo, Song e Young (1986) constataram que o desempenho do filtro anaeróbio não é muito afectado pela superfície específica do leito, sabendo-se que, por exemplo, um aumento de 60% na superfície, apenas produziu um aumento de 2% na eficiência do processo. Verificou-se ainda, em estudos realizados com vários tipos de suporte em filtros anaeróbios, que o meio que retinha mais sólidos biológicos, aderidos e em suspensão não era o que conduzia à melhor eficiência do sistema (Young e Dahab, 1983), o que parece estar de

acordo com a constatação de que o desempenho destes sistemas também não é directamente relacionado com a porosidade do meio (Dahab e Young, 1982). A conclusão geral é que parece não haver um parâmetro definido que seja claramente dominante relativamente a outros, em termos da sua influência sobre a eficiência dos filtros anaeróbios. Pensa-se que o mais importante será provavelmente a capacidade do meio redistribuir o fluxo dentro da matriz, permitindo um eficiente contacto entre o substrato e a biomassa contida no reactor (Song e Young, 1986).

Apesar de, num filtro anaeróbio de fluxo ascendente, a biomassa se encontrar preferencialmente oclusa na matriz e não aderida na superfície do suporte, não significa que o fenómeno da adesão deva ser ignorado neste tipo de reactor. A actividade específica da biomassa em suspensão e aderida pode não ser semelhante; por exemplo Pan Veira (1991), concluiu que a actividade metanogénica da biomassa aderida era superior à da biomassa em suspensão num filtro anaeróbio alimentado com efluente lácteo. No entanto estudos deste tipo são escassos dado que um dos problemas associados ao estudo laboratorial deste tipo de sistema, é a impossibilidade ou dificuldade em retirar meio de enchimento para analisar a biomassa aderida, sem comprometer o funcionamento do sistema.

Até à data todos os estudos referentes à comparação de suportes para filtros anaeróbios foram realizados em reactores separados. Apenas desse modo é possível uma comparação real do efeito de diferentes suportes no desempenho dos reactores quer em termos de eficiência quer em termos de produtividade em metano. No entanto, sabe-se que muitas vezes cada reactor tem a sua própria história e comportamento; além disso se se pretendem comparar vários tipos de suportes simultaneamente a carga laboratorial é imensa, podendo constituir um factor limitativo.

Recentemente foi desenvolvida uma metodologia nova com vista ao estudo comparativo de suportes para filtros anaeróbios (Alves *et al.*, 1995). O conceito a que se chama genericamente "Suppotec" baseia-se na comparação de vários suportes no mesmo biorreactor (Fig. 8). O sistema foi inicialmente testado tendo-se comparado três tamanhos e três materiais com a forma de anéis de raschig e quatro repetições, num total de 36 tubos (mini-reactores).

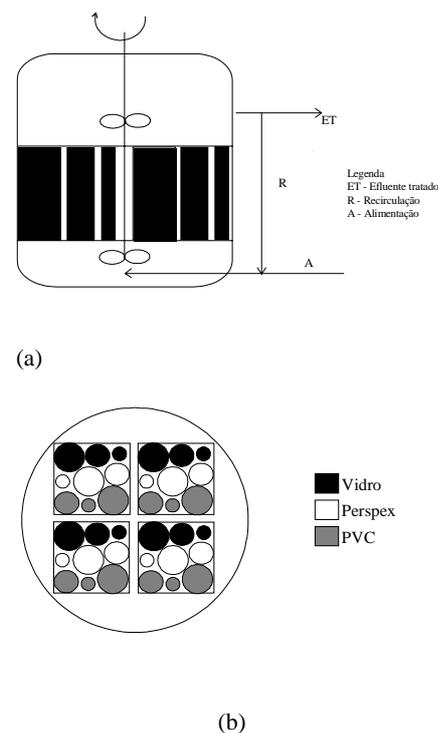


Fig. 8 - Esquema experimental do Suppotec. (a) vista de frente; (b) vista de topo

Os diferentes suportes foram colocados em tubos paralelos com tamanho proporcional ao tamanho do suporte tal como indicado na Figura 8. Este aspecto revelou-se importante para manter aproximadamente a mesma porosidade e velocidade intersticial em cada mini-reactor. O reactor funcionou em contínuo e ao fim de 115 dias de operação foi quantificada a biomassa total e as fracções correspondentes ao biofilme e à biomassa suspensa. Analisou-se por microscopia electrónica de varrimento o tipo de população presente nas diferentes superfícies e, usando análise estatística, avaliou-se a importância relativa dos efeitos tamanho, superfície e posição dentro do reactor nas várias formas de biomassa. Com esta experiência obtiveram-se alguns resultados salientando-se a conclusão de que a posição dentro do reactor não afectava nenhuma das formas de biomassa quantificada e que o efeito do tamanho do suporte era muito mais significativo que o efeito da superfície, na quantidade biomassa retida na forma floculenta, sendo esta superior para os menores tamanhos.

A quantidade de biomassa aderida pareceu ser afectada por pequenas variações na velocidade intersticial em cada tubo, tendo esse efeito sido avaliado. A diferente rugosidade de cada superfície parece também ter afectado os resultados relativos à

biomassa aderida, tendo a biomassa aderida na superfície mais rugosa, (PVC) sido menos susceptível aos efeitos da tensão de corte. A presença de bactérias metanogénicas na superfície do suporte foi confirmada por microscopia electrónica de varrimento de que se apresenta um exemplo na Fig. 9 do biofilme formado na superfície do vidro. Da análise da figura constata-se que existe uma elevada densidade celular, nomeadamente formas semelhantes a *Methanospirillum* que, segundo Verrier *et al.* (1988) é uma espécie que adere preferencialmente a superfícies hidrofílicas.

anaeróbios, sabe-se que o desempenho dos reactores de leito fluidizado é fortemente dependente do tipo de suporte utilizado para imobilização da biomassa (Fox *et al.*, 1990).

O material mais amplamente utilizado é a areia (Heijnen *et al.*, 1986), provavelmente por razões de disponibilidade e custo, sendo, no entanto, entendida como uma escolha longe do óptimo no que respeita à capacidade de retenção de biomassa. Na verdade, outros materiais têm sido testados, nomeadamente vidro poroso (Jördening, 1992), carvão activado (Fox *et al.*, 1990), sepiolite (Balaguer *et al.*, 1992), com obtenção de

tamanho de poros do suporte (Yee, 1990; Messing e Oppermann, 1979). Wang e Wang (1988), baseados num modelo matemático simples, concluem que num suporte poroso, a capacidade máxima de fixação de microorganismos ocorre quando a relação entre o tamanho dos poros e das células se situa entre 2 e 5. Convém referir que a imobilização em suportes porosos pode ser problemática devido a efeitos difusionais internos. No entanto alguns autores referem que a utilização de suportes porosos permite reduzir o tempo necessário ao arranque dum RALF em mais de 50 % (Yee *et al.* 1992) e que este tipo de suporte permite aplicar cargas orgânicas muito mais elevadas do que utilizando areia (Jördening, 1992).

A utilização de alguns suportes não inertes tais como a argila pode ter um efeito estimulatório ou inibitório na actividade metanogénica devido a interações químicas entre o material e o meio de cultura (Murray e van den Berg, 1981; Bonastre e Paris, 1988).

Pensa-se que, em materiais não porosos, a existência de pequenas cavidades com tamanho semelhante ao das células favorece a fixação dos microorganismos, protegendo-os dos efeitos da tensão de corte (Huysman *et al.*, 1983).

Baseando-se no mesmo princípio já referido da comparação simultânea de suportes no mesmo reactor, desenvolveu-se no Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho uma instalação experimental que permite comparar a capacidade de retenção de biomassa de diferentes suportes utilizados para imobilização de biomassa em reactores anaeróbios de leito fluidizado (Fig. 10).

O reactor funciona em contínuo, tendo já sido testado na comparação de diferentes suportes em modo descontínuo (Alves *et al.*, 1994). Os diferentes suportes são colocados em tubos dispostos paralelamente na zona "S" num máximo de 28 tubos. Dado que não é fácil fluidizar suportes diferentes com a mesma velocidade superficial do fluido por possuírem normalmente densidades variáveis, optou-se por colocar os suportes formando um leito fixo. No entanto as velocidades superficiais aplicadas são da mesma ordem de grandeza das que seria necessário aplicar em reactores para fluidizar as partículas estudadas em cada caso particular. O diâmetro das partículas a estudar deve ser semelhante para todos os materiais o que constitui uma limitação.

Fig. 9 - Aspecto do biofilme desenvolvido na superfície do vidro

Convém referir que apesar deste método ser útil para estudar comparativamente aspectos relativos a suportes em filtros anaeróbios, os resultados obtidos não devem ser extrapolados para previsão de eficiências em filtros anaeróbios.

Pensa-se, no entanto, que esta técnica tem potencialidades não só a nível da comparação de características de suportes, como também com objectivos de estudar o crescimento microbiano durante longos períodos de operação, sendo possível remover tubos aleatoriamente do interior do sistema para analisar a evolução da biomassa desenvolvida.

#### ⇒ **Seleção de suportes para reactores anaeróbios de leito fluidizado**

Num reactor anaeróbio de leito fluidizado (RALF), a biomassa encontra-se imobilizada num suporte sólido estando o conjunto fluidizado.

Ao contrário dos filtros anaeróbios a biomassa deve constituir apenas um filme, mas tal como para os filtros

melhores resultados.

O melhor suporte a utilizar num RALF será aquele que, empiricamente, permite obter melhores eficiências de remoção de substrato para a mesma carga orgânica aplicada, para o mesmo tipo de substrato e nas mesmas condições de operação; assim, a comparação efectiva de diferentes materiais só deve ser efectuada operando reactores de leito fluidizado. No entanto, e tal como referido para os filtros anaeróbios, se se quiserem comparar vários tipos de suportes e atendendo aos tempos elevados que são normalmente necessários para o arranque deste tipo de sistemas conclui-se que, do ponto de vista experimental, se torna pouco prático optar por essa metodologia.

O melhor desempenho dum material relativamente a outro tem a ver, fundamentalmente, com a maior capacidade de retenção de biomassa que está relacionada com as características da superfície, nomeadamente rugosidade, hidrofobicidade, interações electrostáticas e com a porosidade e

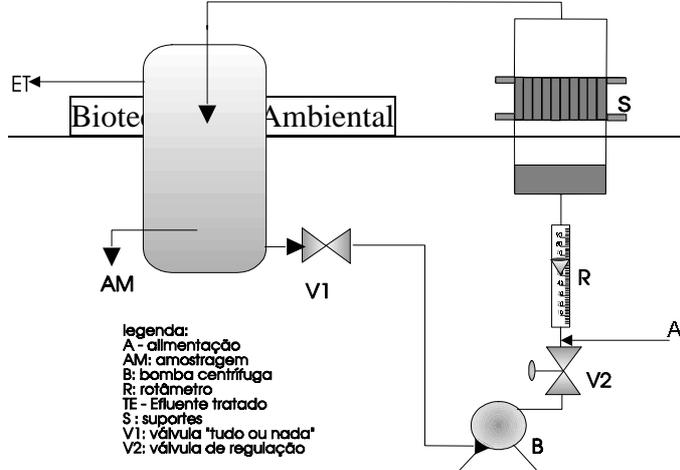


Fig.10 - Esquema da instalação experimental para estudo da capacidade de retenção de biomassa de suportes para reactores de leito fluidizado

Tabela II - Valores médios dos teores de sólidos voláteis aderidos nos diferentes suportes

Suporte	biomassa aderida, (mg SSV/mlsup)	biomassa aderida (mgSSV/gsup.)
argila	1.64±0.18	4.86±0.52
vidro poroso	1.54±0.07	10.50±0.3'
vidro rugoso	0.28±0.02	0.21±0.02
vidro liso	0.12±0.02	0.10±0.01
poli-carbonato	0.06±0.01	0.09±0.02

Normalmente convém fazer repetições ou seja colocar o mesmo suporte em vários tubos. Se se colocarem 4 tubos com cada suporte, o sistema pode testar simultaneamente 7 suportes diferentes quanto à capacidade de retenção de biomassa nas mesmas condições de substrato, biomassa e hidrodinâmicas. Na Tabela II apresentam-se os resultados preliminares obtidos no teste inicial da instalação que operou em modo descontinuo durante apenas 4 semanas.

Os suportes testados foram: argila, vidro poroso, vidro rugoso, vidro liso e polycarbonato. A conclusão geral obtida foi que os suportes porosos apresentaram muito maior capacidade de retenção de biomassa que os não porosos e o vidro rugoso reteve mais do dobro da quantidade de biomassa que o vidro liso.

Actualmente o sistema encontra-se a funcionar em contínuo por um período de tempo longo, a fim de se obterem resultados mais realistas.

### III.2 - ANÁLISE DAS FASES LÍQUIDA E GASOSA

#### A. Técnicas tradicionais de monitorização

As técnicas tradicionais de monitorização da fase líquida e gasosa em digestores anaeróbios, nomeadamente a análise da carência química de oxigénio, pH, ácidos voláteis, alcalinidade, metano etc, são sobejamente conhecidas não sendo objectivo do presente trabalho fazer uma revisão dos métodos disponíveis para as efectuar. Usualmente utilizam--se os métodos constantes no "Standard Methods".

Relativamente aos ácidos voláteis, contudo, convém referir que a utilização de HPLC na substituição da tradicional análise por cromatografia gasosa permite a análise do formato, um intermediário importante em condições de alta carga (Grobicki e Stuckey, 1991). A análise por GC não permite a análise do formato, uma vez que este é utilizado para saturar o gás de arraste ou é misturado com as amostras antes da injecção (Zabranska, 1987).

O hidrogénio dissolvido na fase líquida é um importante intermediário no processo, normalmente difícil de quantificar. O facto da sua concentração na fase gasosa ser geralmente muito baixa (10-500 ppm) acrescido da sua baixa solubilidade na

água (75 nmol/l para uma concentração no gás de 100 ppm a 35°C), justificam essa dificuldade. No entanto alguns trabalhos referem a utilização de sensores para medição de hidrogénio na fase líquida. Paus *et al.* (1988) aplicaram um sensor de hidrogénio usualmente utilizado na indústria química e em reactores nucleares e referem que responde rápida e eficientemente a variações na concentração de hidrogénio dissolvido e que não sofre interferência de outros metabolitos excepto do H<sub>2</sub>S que tem tendência a envenenar progressivamente o sensor.

O efeito do hidrogénio é também considerado no trabalho de Harper e Pohland (1987), que estudam o efeito da remoção contínua de hidrogénio

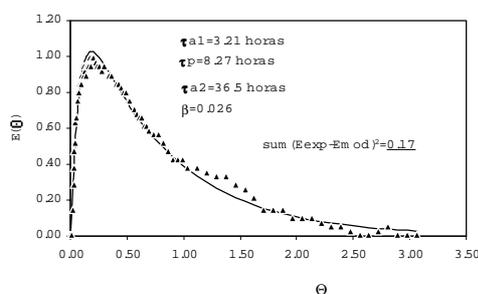
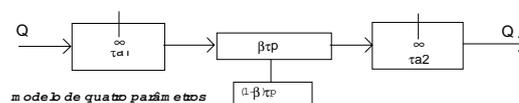


Fig. 11 - Aplicação do modelo de Young e Young (1988) à modelização do escoamento de um filtro anaeróbio em funcionamento à carga orgânica volumétrica de 1.5 Kg CQO/m<sup>3</sup>.dia (Alves et al, 1995).

sob a forma de produto gasoso num reactor de vários andares, concluindo que a melhoria na estabilidade e eficiência do processo era devida a esse facto; verificaram ainda que o facto de remover o gás formado em cada andar provocava um aumento da eficiência nos andares posteriores.

Hickey e Switzenbaum, (1988) referem também a importância da medição de produtos gasosos intermediários, nomeadamente monóxido de carbono (um intermediário na formação de metano a partir do acetato) e hidrogénio, como indicadores do estado metabólico da população microbiana presente. Estes autores referem que a medida em linha destes componentes no gás permite avaliar rapidamente o estado do digestor, permitindo a actuação rápida em caso de sobrecargas orgânicas ou hidráulicas. A detecção destes compostos neste caso foi feita por infravermelhos (CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub>) e por cromatografia gasosa (H<sub>2</sub> e CO).

**B.Potencialidades da aplicação da espectrometria de massa**

Apesar da espectrometria de massa ser uma das mais antigas técnicas instrumentais de análise, apenas recentemente se tem avaliado as suas elevadas potencialidades em aplicações biológicas e biotecnológicas (Heinzle, 1992).

A aplicação da espectrometria de massa em bioprocessos é actualmente praticamente restrita à medição da fase gasosa e as aplicações desta técnica na digestão anaeróbia são escassas.

Scott *et al.* (1983), referem a utilização da medição em linha de compostos voláteis presentes na fase líquida (CH<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub>) por espectrometria de massa usando membranas de voláteis. Whitmore e Loyd (1986) referem a mesma metodologia mas com aplicação ao controlo dum digestor termófilo, baseado no teor de hidrogénio dissolvido. A aplicação da espectrometria de massa para análise em linha de voláteis presentes nas fases líquida e gasosa parece apresentar grandes potencialidades. No entanto, esta técnica é dispendiosa e os espectrómetros de massa actualmente existentes no mercado são mais apropriados para medição de gases e líquidos em fermentadores aeróbios de mistura completa, pois os aparelhos funcionam com aspiração de um certo caudal de gás que é em geral muito elevado. A tentativa de fazer adaptações para reduzir o caudal de aspiração colocando válvulas nos circuitos revela-se satisfatória em parte, mas, para caudais de gás muito baixos verificam-se interferências principalmente devido a entradas de ar. No caso dos digestores anaeróbios, os caudais de gás dependem das condições operatórias e do volume do reactor e em muitos casos o gás produzido não é suficiente para a análise. De um modo geral considera-se a espectrometria de massa uma técnica potencialmente atractiva, após a resolução de alguns problemas práticos.

**III.4 - HIDRODINÂMICA EM DIGESTORES ANAERÓBIOS**

O conhecimento do padrão de escoamento em digestores anaeróbios é um factor chave no seu estudo e

caracterização. Na verdade, um dos problemas associados à instabilidade do processo, a acumulação de ácidos voláteis, pode ser, em parte, devida a problemas de ineficiente homogenização no sistema (Dalla Torre e Stephanopoulos, 1986).

Por exemplo, no caso dum filtro anaeróbio, a tendência geral é para considerar que, sem biomassa apresenta um comportamento do tipo pistão, e que com a acumulação dos sólidos biológicos e com a produção de gás, o efeito de mistura prevalece (Young, 1983).

Pensa-se que, modelos simples de um só parâmetro tais como o 'modelo de dispersão' (Levenspiel e Smith, 1957), ou o 'modelo dos tanques agitados em série' são suficientes para modelizar um reactor deste tipo no estado inicial de operação (sem biomassa).

No entanto, a hidrodinâmica dum reactor anaeróbio em operação pode não ser adequadamente descrita por

Uma das substâncias mais usadas como traçador em digestores anaeróbios, o cloreto de lítio, revelou-se inibidor da actividade metanogénica para concentrações superiores a 2 g Li<sup>+</sup>/l, mesmo com exposições temporárias a esta substância (Anderson *et al.*, 1991). No entanto se se usarem métodos sensíveis de análise do lítio (por exemplo fotometria de chama ou absorção atómica), não é necessária a injeção de grandes quantidades de lítio e parece não haver problemas de inibição.

Esta técnica envolve um trabalho experimental intenso dado que é necessária a análise contínua da corrente de saída do reactor durante um tempo igual a cerca de 3 vezes o tempo de retenção hidráulico.

Como nota final convém referir que apesar de se ter tentado referir alguns dos aspectos essenciais relativos à

Tabela III - Tipos de traçadores utilizados em digestores anaeróbios

Tipo de reactor	Traçador	Referência
filtro anaeróbio ascendente	Cloreto de lítio e corante	Mueller e Mancini, 1975
UASB	Cloreto de lítio	Heertjes e Kuijvenhoven, 1982
filtro anaeróbio ascendente	Trítio	Hall, 1982
filtro anaeróbio descendente	Trítio	Samson <i>et al.</i> , 1985
UASB	Cloreto de lítio	Bolle <i>et al.</i> , 1986
reactor híbrido	rodamina B	Oleszkiewicz e Thandani, 1988
reactor híbrido	Azul de metileno	Oleszkiewicz e Thandani, 1988
filtro anaeróbio ascendente	Cloro 36	Young e Young, 1988
digestor de mistura completa	Cloreto de lítio	Theoleyre e Mlaouhi, 1988
filtro anaeróbio descendente	Cloreto de lítio	Pan Veira, 1991

esses modelos, devendo então usar-se modelos multiparamétricos. Na Fig. 11 está representado o resultado de uma experiência de distribuição de tempos de residência num filtro anaeróbio laboratorial de 14 litros, em operação a carga orgânica de 1.5 Kg CQO/m<sup>3</sup>.dia; a curva representada é relativa à aplicação do modelo de Young e Young (1988) que, como se pode observar é bem ajustado aos pontos experimentais.

Normalmente as técnicas utilizadas para realizar estes estudos são as tradicionais técnicas estímulo-resposta usando traçadores com posterior análise e tratamento matemático da curva obtida na tentativa de modelizar o padrão de escoamento.

Na Tabela III estão referidos alguns trabalhos em que foram realizados estudos deste tipo em digestores anaeróbios, bem como o tipo de traçadores utilizados.

caracterização de digestores anaeróbios, outros muito importantes não foram abordados como seja por exemplo os que se referem a problemas de transferência de massa nos vários tipos de digestores, análise de polímeros extracelulares que se julga serem importantes na granulação etc.

No entanto, o conjunto das técnicas referidas, que foram desenvolvidas essencialmente nos últimos dez anos, permite o estudo dos digestores anaeróbios em vários aspectos, contribuindo para que a digestão anaeróbia possa, gradualmente, deixar de ser uma "arte" para passar a ser uma tecnologia.

**Bibliografia**

Alves, M.M. Comparison of two Configuration of Upflow Anaerobic Filters: Hydrodynamic Studies, HCM workshop, Braga, 1995.  
 Alves, M.M., Bellouti, M., Novais, J.M., Mota, M. Supptec: A new

- Technology to Study Supports for Anaerobic Filters, *Biotechnol. Techniques*. (submetido), 1995.
- Alves, M.M., Mota, M., Novais, J.M. Estudo Comparativo de Suportes para Reactores Anaeróbios de Leito Fluidizado, *Actas da 4ª Conferência Nacional sobre a Qualidade do Ambiente*, Lisboa, Portugal, 47-56, 1994.
- Anderson, G.K., Campos, C.M.M., Chernicharo, C.A.L., Smith, L.C. Evaluation of the Inhibitory Effects of Lithium when Used as a Tracer For Anaerobic Digesters, *Water Res.*, 25:7, 755-760, 1991.
- Anderson, G.K., Kasapgil, B., Ince, O. Comparison of Porous and Non-Porous Media in Upflow Anaerobic Filters when Treating Dairy Wastewater. *Water Res.*, 28, 7, 1619-1624, 1994.
- Aon M. A., and Cortassa S. On fractal nature of cytoplasm. *FEBS Letters*, 3344, 1-4, 1994.
- Balaguer, M.D., Vicent, M.T., Paris, J.M. Anaerobic Fluidized Bed Reactor with Sepiolite as Support for Anaerobic Treatment of Vinasse, *Biotechnology Letters*, 14:5, 433-438, 1992.
- Bellouti, M. Commande Adaptative et Estimation d'Etat de la Methanogenese en Bioreacteur, Thèse de Doctorat, Université Catholique de Louvain, Louvain La Neuve, 1994.
- Bellouti, M., Alves, M.M., Novais, J.M., Mota, M. Flocculation versus Ganules: Differentiation by Fractal Dimension, *Wat. Res.* (submetido), 1995.
- Berntson G. M. Root systems and fractals: How reliable are calculations of fractal dimensions?. *Ann. of Botany* 73, 281-284, 1994.
- Bolle, W.L., Van Breugel, J., Van Eybergen, G.C., Kossen, N.W.F., Zoetemeyer, R.J. Modeling the Liquid Flow in Up-Flow Anaerobic Sludge Blanket Reactors, *Biotechnol. Bioeng.*, 28, 1615-1620, 1986.
- Bonastre, N., Paris, J.M. Colonisation and Stimulation/Inhibition Properties of Different Supports Used in Anaerobic Fixed-Film Reactors, *Environmental Technology Letters*, 9, 763-768, 1988.
- Boone, D.R., Bryant, M.P. Propionate Degrading Bacterium, *Syntrophobacter wolinii* sp. nov. gen. nov., from Methanogenic Ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol.*, 40, 626-632, 1980.
- Bryant, M.P. The Microbiology of Anaerobic Degradation and Methanogenesis with Special Reference to Sewage. In Seminar on Microbial Energy Conservation. H.G. Schlegel (Ed.) E. Goltze KG, Göttingen, Germany, 107-117, 1976.
- Buswell, A.M., Production of Fuel Gas by Anaerobic Fermentations, *Ind. Eng. Chem.*, 22, 1168-1172, 1930
- Cheeseman, P., Toms-Wood, A., Wolfe, R.S. Isolation and Properties of a Fluorescent Compound, Factor 420, from Methanobacterium Strain M.o.H. *J. Bacteriol.*, 112, 1, 527-531, 1972.
- Chung, Y.C., Neethling, J.B. ATP as a Measure of Sludge Digester Activity, *J. Wat. Pollut. Cont. Fed.*, 60, 108-112, 1988.
- Coates, J.D. Development, Characterisation and Stabilisation of Granular Methanogenic Sludge. Ph.D. Thesis, National University of Ireland, Galway, 1991.
- Colleran, E., Concannon, F., Goldem, T., Geoghegan, F., Crumlish, B., Killilea, E., Henry, M., Coates, J. Use of Methanogenic Activity Tests to Characterize Anaerobic Sludges, Screen for Anaerobic Biodegradability and Determine Toxicity Thresholds Against Individual Anaerobic Trophic Groups and Species. *Wat. Sci. Technol.*, 25, 31-40, 1992.
- Colleran, E., Finnegan, S., Lens, P.N.L. Anaerobic Treatment of Sulphate-Containing Waste Streams. *Anthony van Leeuwenhoek*, 67, 29-46, 1995.
- Concannon, F., Reynolds, P.J., Hennigan, A., Colleran, E. Development of a Computerized Continuous Assay for Specific Methanogenic Activity Measurement. in Poster-Papers 5th Int. Symp. Anaerobic Bigestion, A.Tilche e A. Rozzi (eds), Bolonha, Italy, 177-181, May 1988 b.
- Concannon, F., Quinn, M., O'Flaherty, S., Colleran, E. Automated Measurement of the Specific Methanogenic Activity of Anaerobic Digestion Biomass, *Biochem. Soc. Transact*, 17, 425, 1988 a.
- Crawford J.W., Sleeman B. D. and Young I. M. On the relation between number-size distribution and the fractal dimension of aggregates. *J. Soil Sci.*, 44, 444-565, 1993.
- Dahab, M., Young, J.C. Retention and Distribution of Biological Solids in Fixed-Bed Anaerobic Filters, in *Proc. 1st Int. Conf. on Fixed-Film Biological Processes*, Kings Island, Ohio, 1337-1351, 1982.
- Dalla Torre, A., Stephanopoulos, G. Simulation Study of Anaerobic Digestion Control, *Biotechnol. Bioeng.*, 28, 1138-1153, 1986.
- de Man, A.W.A., van der Last, A.R.M., Lettinga, G., The Use of EGSB and UASB Anaerobic Systems for Low Strength Soluble and Complex Wastewaters at Temperatures Ranging from 8 to 30 °C, *Proc. of 5th International Symposium on Anaerobic Digestion*, (E.R. Hall, P.N.Hobson, Eds.) Bologna, Italy, 197-209, 1988.
- Delafontaine, M.J., Naveau, H.P., Nyns, E.J. Fluorimetric Monitoring of Methanogenesis in Anaerobic Digesters, *Biotechnol. Lett.*, 1, 71-73, 1979.
- Doddema, H.J., Vogels, G.D. Improved Identification of Methanogenic Bacteria by Fluorescence Microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.*, 36, 5, 752-754, 1978.
- Dolfing, J., Mulder, J.-W. Comparison of Methane Production Rate and Coenzyme F420 Content of Methanogenic Consortia in Anaerobic Granular Sludge, *Appl. Environ. Microbiol.*, 49, 1142-1145, 1985.
- Dolfing, J., Bloemen, W.G.B.M. Activity Measurements as a tool to Characterize the Microbial Composition of Methanogenic Environments. *J. Microbiol. Methods*, 4, 1-12, 1985.
- Ferreira, E.C. Identificação e Controlo Adaptativo de Processos Biotecnológicos, Tese de doutoramento, FEUP, 1995.
- Fox, P., Suidan, M.T., Bandy, J.T. A comparison of Media Types in Acetate Fed Expanded-Bed Anaerobic Reactors, *Water Research*, 24:7, 827-835, 1990.
- Gorris, L. Analysis of Methanogenic Populations in Anaerobic Digesters: Development and Application of Cofactor Assays. Ph.D. Thesis, University of Nijmegen, The Netherlands, 1987.
- Grobicki, A., Stuckey, D.C. Performance of the Anaerobic Baffled Reactor Under Steady-State and Shock Loading Conditions. *Biotechnol. Bioeng.*, 37, 344-355, 1991.
- Guiot, S.R., Safi, B., Frigon, J.C., Mercier, P., Mulligan, C., Tremblay, R., Samson, R. Performances of a Full-Scale Novel Multiplate Anaerobic Reactor Treating Cheese Whey Effluent. *Biotechnol. Bioeng.*, 45, 398-405, 1995.
- Guiot, S.R., van den Berg, L. Performance of an Upflow Reactor Combining a Sludge Blanket and a Filter Treating Sugar Waste, *Biotechnol. Bioeng.*, 27, 800-806, 1985.
- Gujer, W., Zehnder, A.J.B. Conversion Processes in Anaerobic Digestion, *Water Sci. Technol.*, 15, 127, 1983.
- Hall, E.R., Biomass Retention and Mixing Characteristics in Fixed-Film and Suspended Growth Anaerobic Reactors, in *Proc. IAWPR Specialized Seminar on Anaerobic Treatment*, 371-396 Copenhagen, Denmark, 1982.
- Harper, S.R., Pohland, F.G. Enhancement of Anaerobic Treatment Efficiency Through Process Modification. *J. Water Pollut. Control Fed.*, 59, 3, 152-161, 1987.
- Hawkes, F.R., Donnelly, T., Anderson, G.K. Comparative Performance of Anaerobic Digesters Operating on Ice-Cream Wastewater. *Water Res.*, 29, 2, 525-533, 1995.
- Heertjes, P.M., Kuijvenhoven, L.J. Fluid Flow Pattern in Up-Flow Reactors For Anaerobic Treatment of Beet Sugar Factory Wastewater, *Biotechnol. Bioeng.*, 24, 443-459, 1982.

- Heijnen, J.J., Mulder, A., Enger, W., Hoeks, F. Review on the Application of Anaerobic Fluidized Bed Reactors in Waste-Water Treatment, in Conference Papers of "Anaerobic Treatment a Grown-up Technology", AQUATEC'86, Industrial Presentations B.V. Schiedam, 159-174, 1986.
- Heinzle, E. Present and Potential Applications of Mass Spectrometry for Bioprocess Research and Control. *J. Biotechnol.*, 25, -, 81-114, 1992.
- Hickey, R.F., Switzenbaum, S.M. The Role of Intermediate and Product Gases as a Regulators and Indicators of Anaerobic Digestion. in Poster-Papers 5th Int. Symp. Anaerobic Digestion, A.Tilche e A. Rozzi (eds), Bolonha, Italy, 43-47, 1988.
- Hulshoff Pol L.W., van de Worp J.J.M., Lettinga G. and Beverlo W.A. Physical characterisation of anaerobic sludge. In: Conference papers of anaerobic treatment, a grown-up technology, AQUATEC'86, Industrial presentation B.V., Schiedam, 89-101, 1986.
- Hulshoff Pol, L., Lettinga, G. New Technologies for Anaerobic Wastewater Treatment. *Water Sci. Technol.*, 18, 12, 41-53, 1986.
- Huysman, P., Van Meenen, P., Van Assche, P., Verstraete, W. Factors affecting Colonization of non Porous and Porous Packing Materials in Model Upflow Methane Reactors, *Biotechnology, Letters*, 5, 643-648, 1983.
- Iza, J., Colleran, E, Paris, J.M., Wu, W.-M., International Workshop on Anaerobic Treatment Technology for Municipal and Industrial Wastewaters: Summary Paper, *Water Science and Technology*, 24:8, 1-16, 1991.
- James, A., Chernicharo, C.A.L., Campos, C.M.M. The Development of a New Methodology for the Assessment of Specific Methanogenic Activity. *Water Res.*, 24, 7, 813-825, 1990.
- Jeris, J., McCarty, P.L. The Biochemistry of Methane Fermentation Using C14 Tracers, *J. Wat. Poll. Control Fed.*, 37:2, 143-148, 1965.
- Jördening, H.J. Anaerobic Biofilms in Fluidized Bed Reactors, in *Biofilms - Science and Technology*, L.F. Melo, T.R. Bott, M. Fletcher and B. Capdeville (Eds.) Nato ASI Series, Kluwer Academic Pub., Dordrecht, 1992.
- Kaspar, H.F., Wuhrmann, K. Kinetic Parameters and Relative Turnover of Some Important Catabolic Reactions in Digesting Sludge, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1-7, 36:1, 1978.
- Katinka, T.S., The Role of Ho,aoacetogenic Bacteria in Anaerobic Digestion, HCM Report, National University of Ireland, Galway, 1994.
- Kobayashi, H.A., Macario, E.C., Williams, R.G., Macario, A.J.L. Direct Characterization of Methanogens in Two High-Rate Anaerobic Biological Reactors. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 3, 693-698, 1988.
- Kosaric N., Blaszczyk R., Orphan L. and Valladares J. The characteristics of granules from upflow anaerobic sludge blanket reactor. *Wat. Res.* 24(12), 1473-1477, 1990.
- Lettinga G., van velsen A. F. M., Hobma S. W., De Zeeuw W. and Klapwijk A. Use of Upflow Sludge Blanket (USB) Reactor for Biological Wastewater Treatment, Especially for Anaerobic Treatment. *Biotechnol. Bioeng.* 22, 699-734, 1980.
- Levenspiel, O., Smith, W.K., Notes on the Diffusion Type Model for the Longitudinal Mixing of Fluids in Flow, *Chem. Eng. Sci.*, 6, 227-233, 1957.
- Li D.H. and Ganczarczyk J.J. Fractal geometry of particle aggregates generated in water and wastewater treatment processes. *Environ. Sci. Technol.* 23, 1385-1389, 1989.
- Macário, A.J.L., Macario, E.C., Antibodies for Methanogenic Biotechnology, *Trends Biotechnol.*, 3-204-208, 1985.
- Mandelbrot B.B. The fractal geometry of nature. W.H. Freeman and company, New York, 1982.
- McInerney, M.J., Bryant, M.P., Hespell, R.B., Costerton, J.W. Syntrophomonas wolfei gen. nov. sp., an Anaerobic, Syntrophic, Fatty Acid Oxidizing Bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.*, 41, 4, 1029-1039, 1981.
- Messing, R.A., Oppermann, R.A. Pore Dimensions for Accumulating Biomass. I. Microbes that Reproduce by Fission or by Budding, *Biotechnology and Bioengineering*, 21, 49-58, 1979.
- Mink, R.W., Dugan, P.R. Tentative Identification of Methanogenic Bacteria by Fluorescence Microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.*, 33, 3, 713-717, 1977.
- Mueller, J.A., Mancini, J.L. Anaerobic Filter - Kinetics and Applications, in *Proc 30th Purdue Industrial Waste Conference*, Ann. Arbor Science Publ. Inc., Ann. Arbor, Michigan, USA, 423-447, 1975.
- Murray, W.D., van den Berg, L. Effect of Support Material on the Development of Microbial Fixed Films Converting Acetic Acid to Methane, *Journal of Applied Bacteriology*, 51, 257-265, 1981.
- Oleszkiewicz, J.A., Thandani, V.J. Effects of Biofilter Media on the Performance of Anaerobic Hybrid Reactors, *Environ. Technol. Lett.*, 9, 89-100, 1988.
- Owen, W.F., Stuckey, D.C., Healy, J.B., Young, L.Y., McCarty, P.L. Bioassay for Monitoring Biochemical Methane Potential and Anaerobic Toxicity. *Wat. Res.*, 13, 485-492, 1979.
- Pan Veira, L.M. Tratamiento de Efluentes de Industrias Lacteas en Reactores Anaerobios de Alta Carga: Influencia de la Relacion C/N/P y del Equipo, Tese de Doutoramento, Universidad de Santiago de Compostela, Departamento de Ingenieria Quimica, 1991.
- Pauss, A., Guiot, S., Samson, R. Sensors for Anaerobic Digestion Management. in *Poster-Papers 5th Int. Symp. Anaerobic Bigestion*, A.Tilche e A. Rozzi (eds), Bolonha, Italy, 223-226, 1988.
- Prensier, G., Dubourguier, H.C., Thomas, I., Albagnac, G., Buisson, M.N. Specific Immunological Probes for Studying the Bacterial Associations in Granules and Biofilms, *Proc. of Granular Anaerobic Sludge, Microbiology and Technology (GASMAT)*, Lunteren, Netherlands, 55-61, 1987.
- Raskin, L., Poulsen, L.K., Noguera, D.R., Rittmann, B.E., Stahl, D.A. Quantification of Methanogenic Groups in Anaerobic Biological Reactors by Oligonucleotide Probe Hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 4, 1241-1248, 1994.
- Renard, P., Van Breusegem, V., Nguyen, M.-T., Naveau, H., Nyns, E.-J. Implementation of an Adaptive Controller for the Startup and Steady-State Running of a Biomethanation Process Operated in the CSTR Mode. *Biotechnol. Bioeng.*, 38, 8, 805-812, 1991.
- Reynolds, P.J. Support Matrix and Feed Flow Effects in Anaerobic Fixed Bed Reactors, PhD Thesis, University College of Galway, Ireland, 1986.
- Sadana, A., Ram, A.B. Fractal Analysis of Antigen-Antibody Binding Kinetics: Biosensor Applications. *Biotechnol. Prog.*, 10, 291-298, 1994.
- Samson, R., van den Berg, L., Kennedy, K.J. Mixing Characteristics and Start-up of Anaerobic Downflow Stationary Fixed Film (DSSF) Reactors, *Biotechnol. Bioeng.*, 27, 10-19, 1985.
- Scott, R.I., Williams, T.N., Whitmore, T.N., Lloyd, D. Direct Measurement of Methanogenesis in Anaerobic Digestors by Membrane Inlet Mass Spectrometry. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 18, 236-241, 1983.
- Shelton, D.R., Tiedje, J.M. General Method for Determining Anaerobic Biodegradation Potential. *Appl. Environ. Microbiol.*, 47, 4, 850-857, 1984.
- Song, K.-H., Young, J.C. Media Design Factors for Fixed-Bed Filters, *J. Water Pollut. Control Fed.*, 58:2, 115-121, 1986.
- Soto, M., Mendez, R., Lema, J.M. Methanogenic and Non-Methanogenic Activity Tests. Theoretical Basis and Experimental Set Up. *Water Res.*, 27, 8, 1361-1376, 1993.

- Switzenbaum, M.S., Jewell, W.J. Anaerobic Attached-Film Expanded bed Reactor Treatment, *J. Water Pollut. Control Fed.*, 52:7, 1953-1965, 1980.
- Theoleyre, M.A., Mlaouhi, A. Using a Chemical Tracer to Determine the Real Retention Time of a Digester, *in* Poster-Papers 5th Int. Symp. Anaerobic Digestion, A. Tilche e A. Rozzi (Eds), Bolonha, Italy, 243-246, 1988.
- Valcke, D., Verstraete, W. A practical Method to Estimate the Acetoclastic Methanogenic Biomass in Anaerobic Sludges. *J. Wat. Pollut. Control. Fed.*, 55, 1191-1195, 1983.
- van den Berg, L., Lentz, C.P. Comparison between up and downflow Anaerobic Fixed-film Reactor of Various Surface-to-Volume Ratios for the Treatment of Bean Blanching Waste, *in* Proc. of 34th Purdue Industrial Waste Conference, pp 319-325, Ann Arbor Science Publishers Inc., 1979
- Verrier, D., Mortier, B., Dubourguier, H.C., Albagnac, G. Adhesion of Anaerobic Bacteria to Inert Supports and Development of Anaerobic Biofilms, *Proc. of 5th International Symposium on Anaerobic Digestion*, (E.R. Hall, P.N.Hobson, Eds.) Bologna, Italy, 61-69, 1988.
- Vogels, G.D., Keltjens, J.T., van der Drift, C. Biochemistry of Methane Production, *in* Biology of Anaerobic Microorganisms, Alexander J.B. Zehnder (Ed.) John Wiley & Sons, New York, 707-770, 1988.
- Wang, S.-D., Wang, D.I.C., Pore Dimension Effects in the Cell Loading of a Porous Carrier, *Biotechnology and Bioengineering*, 33, 915-917, 1988.
- Weiland, P., Rozzi, A. Start-up, Operation, Monitoring and Control of High-rate Anaerobic Treatment Systems: Discussor's Report. *Water Sci. Technol.*, 24, 8, 257-277, 1991.
- Wilkie, A., Collieran, E. Start-up of Anaerobic Filters Containing Different Supports Materials Using Pig Slurry Supernatant. *Biotechnol. Lett.*, 6, 735-740, 1984.
- Woese, C.R., Kandler, O., Wheelis, M.L., Towards a Natural System of Organisms: Proposal for the Domains Archea, Bacteria and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 4576-4579, 1990.
- Yee, C.J., Effects of Microcarriers on Performance and Kinetics of the Anaerobic Fluidized Bed Biofilm Reactor, Ph.D. Dissertation, University of Pennsylvania, Philadelphia, 1990.
- Yee, C.J., Hsu, Y., Shieh, W.K. Effects of Microcarriers pore Characteristics on Methanogenic Fluidized Bed Performance, *Water Research*, 26, 1119-1125, 1992.
- Young, H.W., Young, J.C. Hydraulic Characteristics of Upflow Anaerobic Filters, *J. Environ. Eng. Div. ASCE*, 114:3, 621-638, 1988.
- Young, J. C. The Anaerobic Filter - Past, Present and Future, *in* Proc. 3th Int. Symp. on Anaerobic Digestion, Evans and Falkner Inc., Watertown, 91-105, 1983.
- Young, J.C Factors Affecting the Design and Performance of Upflow Anaerobic Filters, *Water Sci. Technol.*, 24:8, 133-155, 1991.
- Young, J.C., Dahab, M.F. Effect of Media Design on the Performance of Fixed-Bed Anaerobic Reactors, *Water Sci. Technol.*, 15, 369-383, 1983.
- Young, J.C., McCarty, P.L. The Anaerobic Filter for Waste Treatment, *in* Proc 22nd. Ind. Waste Conf., Purdue University, 559-575, 1967.
- Zábranská, J., Dohányos, M. Methods of Investigation of the Methabolism of Anaerobic Microorganisms. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.*, 15, 1, 43-55, 1987.
- Zehnder, A.J.B., Ingvorsen, K., Marti, T. Microbiology of Methane Bacteria, *in* Proc. 2nd Int. Symp. on Anaerobic Digestion, Hughes *et al.* (Eds.), Elsevier Biomedical Press, Amesterdam, 1981.

