

EFEITO DA ACLIMATIZAÇÃO DO INÓCULO E DA RECIRCULAÇÃO DA BIOMASSA NA DEGRADAÇÃO DE ÁCIDO OLÉICO EM FILTRO ANAERÓBIO

M.A. PEREIRA, M. MOTA e M. ALVES
Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho,
Braga PORTUGAL

RESUMO

Este trabalho teve por objectivo o estudo da degradação do ácido oleico (um dos mais tóxicos e mais abundante entre os Ácidos Gordos de Cadeia Longa - AGCL presentes em efluentes) em filtro anaeróbio, avaliando o efeito da aclimatização da biomassa utilizada como inóculo e também da recirculação da biomassa. Operaram-se três filtros anaeróbios (R1, R2 e R3) em paralelo. Em R1 inoculou-se biomassa não aclimatizada e não se recirculou a biomassa que saía do reactor. Em R2 inoculou-se biomassa não aclimatizada e recirculou-se a biomassa e em R3, também com recirculação, inoculou-se biomassa aclimatizada com lípidos e oleato. O desempenho dos digestores foi avaliado durante 233 dias em termos de CQO (Carência Química de Oxigénio) solúvel removida, AGV (Ácidos Gordos Voláteis) e SSV (Sólidos Suspensos Voláteis) à saída, e produção de metano. Obtiveram-se eficiências de remoção entre 70 a 77%, para uma carga aplicada de oleato de 12.5 kgCQO/m³.dia, mesmo com concentrações molares oleato/(Ca²⁺+Mg²⁺) de 6.79. Os rendimentos em metano diminuíram com o aumento da carga aplicada em oleato, embora as remoções de CQO solúvel se tenham mantido superiores a 70%. Este facto sugere que parte do oleato possa ter sido retida por adsorção na biomassa. Verificou-se que a recirculação da biomassa foi vantajosa no desempenho deste sistema, promovendo a minimização do efeito de lavagem (“washout”) e a diluição da carga tóxica aplicada, conduzindo a uma menor inibição da população acetogénica e metanogénica. Além disso, o efeito inibitório do oleato de sódio sobre as populações acetogénicas e metanogénicas foi menos sentido num filtro anaeróbio inoculado com biomassa previamente aclimatizada. Conclui-se que, do ponto de vista do tratamento de efluentes com elevada carga em oleato, o efeito combinado da recirculação de biomassa e utilização de um inóculo aclimatizado é benéfico, melhorando a eficiência do desempenho do filtro anaeróbio.

PALAVRAS-CHAVE

filtro anaeróbio, ácidos gordos de cadeia longa, toxicidade

INTRODUÇÃO

Os ácidos gordos de cadeia longa (AGV) resultam da hidrólise dos lípidos, os quais constituem uma parte importante da matéria orgânica presente nos efluentes quer industriais quer domésticos (FORSTER, 1992). Normalmente parte dos lípidos são removidos, utilizando um tratamento físico-químico. No entanto, a fracção remanescente contem ainda concentrações significativas de lípidos na forma coloidal e emulsionada, prejudiciais ao tratamento anaeróbio dos efluentes (HWU *et al.*, 1996). Os principais problemas associados ao tratamento anaeróbio de efluentes contendo lípidos são a adsorção de lípidos e ácidos gordos de cadeia longa (AGCL) resultantes da sua hidrólise na biomassa, tornando-a flutuante e sujeita a eliminação por lavagem (“washout”) (HWU, 1997) e a forte inibição das bactérias metanogénicas e acetogénicas pelos AGCL (RINZEMA *et al.*, 1994, HWU, 1997). A aplicação de sistemas de manto de lamas do tipo UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) e EGSB ao tratamento de efluentes contendo lípidos tem sido objecto de investigação recente. No entanto, apesar

da evidência da maior resistência da biomassa granular à toxicidade dos AGCL (HWU *et al.*, 1996), é também um facto que a granulação e a estabilidade granular são problemáticas no tratamento desses efluentes. De facto, a falha destes sistemas no tratamento de efluentes com elevada carga lipídica tem sido reportada por vários autores (SAMSON *et al.*, 1985, HAWKES *et al.*, 1995). A ocorrência de “washout” da biomassa parece verificar-se para concentrações de AGCL inferiores aos seus limites de toxicidade (HWU, 1997), o que evidencia a flutuação da biomassa como principal problema do tratamento anaeróbio de efluentes contendo lípidos em digestores de manto de lamas, sobrepondo-se ao efeito inibitório dos AGCL sobre a população bacteriana (RINZEMA, 1988). Num filtro anaeróbio, o meio de suporte actua como um factor físico de protecção contra o “washout”, apresentando-se como potencialmente atractivo para a retenção de biomassa na aplicação a este tipo particular de efluentes.

No presente trabalho efectuou-se o estudo da degradação do ácido oleico em filtro anaeróbio, avaliando o efeito da aclimatização da biomassa utilizada como inóculo e também da recirculação da biomassa. Utilizou-se o oleato de sódio como modelo de AGCL na medida em que é o mais abundante entre os AGCL presentes em efluentes (KOMATSU *et al.*, 1991), bem como um dos mais tóxicos (GALBRAITH *et al.*, 1971).

MATERIAIS E MÉTODOS

Instalação experimental

Foram construídos três filtros anaeróbios (R1, R2 e R3) em vidro acrílico com iguais dimensões, de acordo com o esquema ilustrado pela Figura 1.

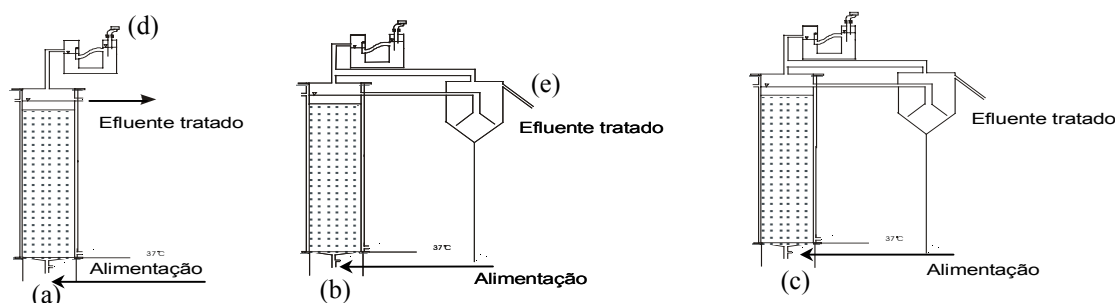


Figura 1- Representação esquemática da instalação experimental: R1 (a), R2 (b), R3 (c), medidor de gás (d) e sedimentador (e).

Nos três digestores, o volume inicial de líquido foi de 1L, contendo igual volume de enchimento, constituído por anéis de Rasching em PVC com 21 mm de tamanho, com uma área específica de leito de $230 \text{ m}^2/\text{m}^3$ e uma porosidade de 92.5%. Aos digestores R2 e R3 foram acoplados decantadores, também construídos em vidro acrílico, com um volume de líquido de 200 ml. A operação dos digestores foi monitorizada por determinações periódicas, 2 a 3 vezes por semana, da Carência Química de Oxigénio (CQO) total à entrada, e total e solúvel à saída de cada um dos reactores, dos caudais alimentados, dos ácidos gordos voláteis (AGV) nas correntes de saída e do conteúdo em metano do biogás produzido em cada um dos reactores.

Substrato e inóculo

Inicialmente os biorreatores foram alimentados com um efluente lácteo sintético, obtido por diluição de leite magro comercial com água da rede, ao qual foi adicionado um suplemento de macro e micronutrientes na proporção de 0.6 ml/gCQO alimentado e 1 ml/l, respectivamente. A composição das soluções de nutrientes adicionadas foi a seguinte: *Macronutrientes* - $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 30.2 g/l; KH_2PO_4 : 28.3 g/l KCl : 45 g/l. Esta solução foi adicionada numa quantidade de 0.6 ml por grama de CQO alimentado. *Micronutrientes* - $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 2 g/l; H_3BO_3 : 0.05 g/l; ZnCl_2 : 0.05 g/l; $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0.038 g/l; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: 0.5 g/l; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: 0.05 g/l; $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 0.09 g/l; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 2 g/l; $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 0.092 g/l; $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: 0.164 g/l; EDTA: 1g/l, Resazurina: 0.2 g/l; HCl 37%: 1 ml/l. A composição desta solução baseou-se no trabalho de ZEHNDER *et al.* (1980). Posteriormente, efectuou-se uma substituição gradual do leite magro na alimentação por oleato, passando a solução de macronutrientes a conter um suplemento de azoto de 98.9 g NH_4Cl /l, por forma a fixar a razão CQO/N/P em 250/5/1.1 (CQO). De modo a manter a alcalinidade em valores adequados, foram adicionados à alimentação 5 g de NaHCO_3 /l. Para o arranque dos biorreatores foram utilizados dois tipos de inóculo. R1 e R2 foram inoculados com biomassa proveniente da operação de um filtro anaeróbio alimentado com leite magro, contendo um teor em sólidos suspensos voláteis de 25 g VSS/l. R3 foi inoculado com biomassa proveniente da operação de um digestor anaeróbio alimentado com lípidos e oleato, contendo 18.4 g SSV/l (descrita em ALVES, 1998). O volume de inóculo, nos três reactores, foi de 300 ml.

Análises de rotina

A CQO solúvel e total e o teor em SV foram determinados de acordo com os procedimentos descritos no Standard Methods (APHA *et al.*, 1989). Os SSV na corrente de saída foram estimados pela diferença entre a CQO total e solúvel. Os AGV foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência – HPLC e a percentagem de metano no biogás foi determinada por cromatografia gasosa – GC.

Modo de operação

A operação dos digestores efectuou-se segundo três etapas de acordo com o tipo de substrato fornecido. Na 1ª etapa(I), os digestores foram alimentados com leite magro numa concentração de 2000 e de 4000 mgCQO/l. Após esse período a alimentação foi gradualmente alterada para oleato de sódio, mantendo a carga orgânica aplicada constante (2ª etapa(II)). Por ultimo, na 3ª etapa(III), o oleato de sódio passou a constituir a única fonte de carbono, a concentrações de 4000 e 8000 mgCQO/l. O tempo de retenção foi gradualmente diminuído de 3 para 0.64 dias, ao longo de 44 dias, mantendo-se depois constante até ao fim da operação. A recirculação em R2 e R3 efectuou-se, inicialmente, a um caudal de 15 l/dia, passando para o dobro a partir do 224º dia. Na Tabela I encontram-se registadas, em resumo, as condições de operação características de cada uma das fases das três etapas, bem como a sua duração.

Tabela I- Descrição das principais características de operação dos digestores e sua duração.

Etapa	Tempo (dias)	Tipo de substrato (mgCQO/l)		Condições de operação características
		Leite magro	Oleato	
I	0-44	2000	-	Diminuição do TRH de 3 para 0.64 dias.
	44-80	2000	-	TRH constante.
	80-94	4000	-	Aumento da carga orgânica.
II	94-105	3000	1000	Carga orgânica e TRH constante.
	105-119	2000	2000	
	119-150	1000	3000	
III	150-205	-	4000	Aumento da carga orgânica.
	205-224	-	8000	
	224-233	-	8000	

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A operação dos três digestores efectuou-se em paralelo nas mesmas condições operatórias, sendo avaliada durante 233 dias em termos de CQO solúvel removido, AGV e SSV à saída, e produção de metano. Na Figura 2 encontra-se representada a evolução dos parâmetros operatórios em R1, R2 e R3 ao longo do tempo de operação, durante as três etapas de funcionamento. Numa primeira etapa (I) efectuou-se o arranque dos três digestores através de aumentos graduais da carga orgânica aplicada até atingir um valor de 6 kg CQO/m³.dia no 80º dia, utilizando substrato contendo leite magro como única fonte de carbono (Figura 2 (a)). A composição do substrato fornecido aos três digestores foi gradualmente alterada (Etapa II), a partir do 94º dia, com a progressiva substituição do leite magro por oleato de sódio, mantendo a carga orgânica total de entrada constante. Durante estas duas etapas a performance dos três digestores apresentou-se bastante semelhante com eficiências de remoção superiores a 90% e baixos teores de AGV totais nas correntes de saída (Figura 2 (a), (b) e (c)). A performance do digestor R3 apresentou-se, no entanto, ligeiramente inferior relativamente a R1 e R2.

A partir do 150º dia o oleato passou a constituir a única fonte de carbono alimentada aos três digestores (Etapa III), inicialmente a uma concentração de 4000 mgCQO/l e posteriormente, a partir do dia 205, 8000 mgCQO/l. Durante esta última etapa verificou-se uma diminuição progressiva da eficiência dos três digestores, acompanhada de um aumento da concentração de AGV totais à saída (Figura 2 (b)). No digestor R3 este efeito foi menos sentido, apresentando-se mais estável e, contrariamente ao verificado nas duas primeiras etapas, com maiores eficiências e menor teor de AGV à saída, relativamente a R1 e R2. Este facto põe em evidência a vantagem decorrente do efeito combinado da recirculação de biomassa e utilização de um inóculo aclimatizado no desempenho dos digestores, no tratamento de efluentes com elevada carga em oleato.

No 167º dia, assinalado na Figura 2 (a) por uma seta, a operação dos digestores foi interrompida por um período de 15 dias, procedendo-se ao armazenamento destes a 4°C.

O rearranque dos três digestores efectuou-se, nas mesmas condições de operação em que estes se encontravam antes, sem que se verificasse grande destabilização da performance dos mesmos, com excepção do digestor R2 que apresentou uma súbita descida da eficiência de remoção até um valor de 52%, retornando às condições anteriores após cinco dias.

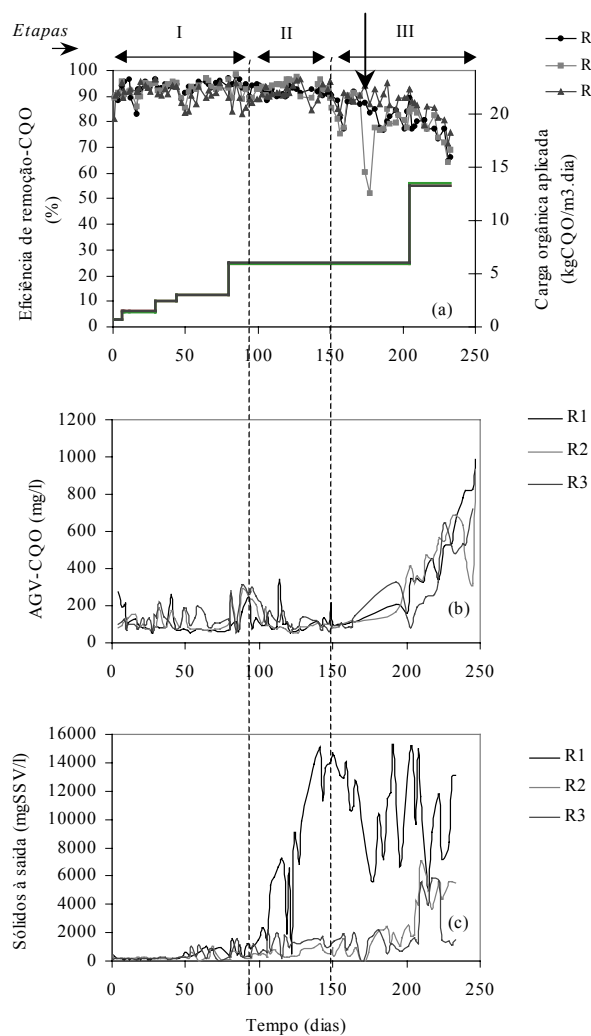


Figura 2 - Evolução dos parâmetros operatórios de R1, R2 e R3 ao longo do tempo de operação. (.Nota: I-leite magro como única fonte de carbono, II-mistura de leite magro e oleate de sódio, III-oleato como única fonte de carbono).

Relativamente à capacidade de retenção de biomassa apresentada pelos três digestores (Figura 2 (c)), verificou-se que, quando se passou a adicionar oleato na alimentação (Etapa II), mantendo constante a carga orgânica aplicada se observou um aumento acentuado dos teores de SSV na corrente de saída de R1, provavelmente devido a adsorção do oleato na biomassa, tornando-a flutuante. As diferenças verificadas entre este e R2 e R3, evidenciam a potencialidade da utilização de recirculação da biomassa

no que diz respeito à minimização do efeito de “washout”. No entanto, durante a etapa III, quando a alimentação passou a ser unicamente constituída por oleato, observou-se um aumento bastante significativo do “washout” da biomassa de R2 e R3 (perto de 200%) quando a carga orgânica em oleato foi aumentada para 12.5 kgCQO/m³.dia. Com o aumento da velocidade de recirculação em R2 e R3 para aproximadamente o dobro (dia 224), não se verificaram alterações significativas no desempenho dos dois digestores, com exceção de uma diminuição considerável do teor de SSV à saída de R3.

Na Figura 3 encontra-se representada a variação da concentração média dos AGV (a) e dos teores de substrato não acidificado - fracção de CQO referente à diferença entre os teores em CQO solúvel e CQO dos AGV (acetato e propionato) à saída - (b), durante as etapas II e III. Durante a etapa II, observou-se um decréscimo dos níveis de AGV à saída dos digestores, sugerindo a não ocorrência de inibição das bactérias metanogénicas com conseqüente acumulação de AGV. No entanto, quando a alimentação passou a conter oleato como única fonte de carbono (Etapa II) este efeito inibitório começou a fazer sentir-se, principalmente em R1 e R2, tornando-se mais evidente com o aumento da carga orgânica em oleato (CQO da alimentação=8000 mgCQO/l). Na etapa II as diferenças, a nível de acumulação de AGV, entres os três digestores não se apresentaram muito significativas. No entanto, durante esta última etapa é possível verificar que em R3, com inóculo adaptado, este efeito é menos sentido, o que poderá ser resultado de uma degradação mais eficiente dos mesmos por parte da população metanogénica ou de uma menor formação dos mesmos, decorrente de um deficiente funcionamento da população acetogénica. A possibilidade de haver uma inibição das bactérias acetogénicas envolvidas na β -oxidação implicaria a acumulação de substrato não acidificado nos digestores. Tal como se pode observar na Figura 3 (b), à medida que a concentração de oleato foi gradualmente aumentada, mantendo a carga orgânica constante (etapa II), os teores em substrato não acidificado nas correntes de saída apresentaram, também, um aumento gradual. Com a eliminação do co-substrato na alimentação (etapa III) este efeito tornou-se mais visível em R1 e R2, apesar de praticamente insignificante em R3. O aumento da carga orgânica em oleato conduziu a uma acumulação de substrato não acidificado bastante significativa, principalmente em R1, sugerindo a ocorrência de uma maior inibição da população acetogénica neste digestor relativamente a R2 e R3, ambos com recirculação. O efeito de diluição da carga tóxica pela utilização de recirculação poderá estar relacionado com esta constatação, conduzindo a uma menor inibição das bactérias acetogénicas.

No presente trabalho atingiram-se concentrações bastante elevadas de oleato. Sabe-se, no entanto, que a presença de iões cálcio baixa a concentração de AGCL na forma solúvel, devido à formação de precipitados de oleato de cálcio, reduzindo o efeito inibitório do mesmo (HANAKI *et al.*, 1981, ROY *et al.*, 1985). Admitindo que o ião magnésio possa exibir um efeito semelhante ao ião cálcio determinaram-se os valores da razão molar oleato/(Ca²⁺+Mg²⁺) existentes no decorrer do presente trabalho, bem como da concentração que teóricamente teria permanecido livre no seio do líquido (Tabela II).

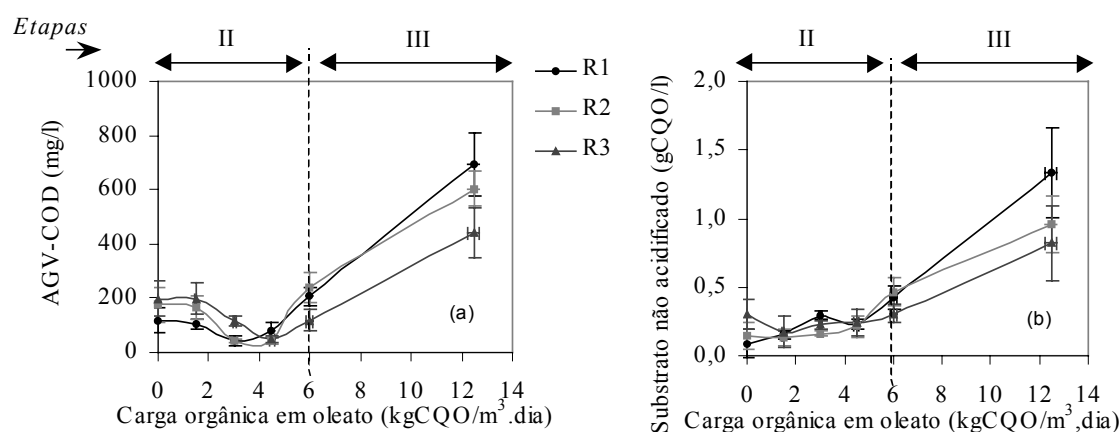


Figura 3- Evolução dos teores em AGV-CQO (a) e substrato não-acidificado (b) com a carga orgânica em oleato aplicada, durante as etapas II e III.

Pode observar-se que, com excepção do período entre o 95º e 105º dia, a concentração de oleato alimentado excedeu a razão molar estequiométrica 2, relativamente aos iões divalentes referidos.

Tabela II- Razão molar oleato/(Ca²⁺+Mg²⁺) alimentada ao longo da operação.

Etapa	Tempo (dias)	Razão molar Oleato/(Ca ²⁺ +Mg ²⁺)	Oleato não precipitado (mg/l)
II	95-105	1.00	0.0
	105-119	2.03	10.5
	119-150	3.11	355.0
III	150-205	4.23	701.0
	205-233	6.79	1948.0

Convém referir, no entanto, que as concentrações em oleato que se atingiram no presente trabalho são significativamente superiores aos valores que geralmente ocorrem em efluentes da indústria de lacticínios. De um modo aproximado, considerando que 44% (em CQO) do leite é matéria gorda (HANAKI *et al.*, 1981) e ainda que a hidrólise desta matéria a AGCL não reduz o conteúdo em CQO, os teores lipídicos de um efluente lácteo, assumindo um valor médio de 4000 mgCOQ/l, serão aproximadamente 1700 mgCQO/l. No presente trabalho, este valor de concentração corresponderia a uma carga aplicada em oleato de 3 kgCQO/m³.dia, para a qual se verifica uma elevada eficiência de remoção, baixos teores de AGV e de substrato não acidificado, bem como um elevado rendimento em metano.

Os mecanismos de eliminação de oleato podem ser biodegradação e adsorção na biomassa. A ocorrência do fenómeno de adsorção dos AGCL encontra-se evidenciada em vários estudos referidos na literatura (RINZEMA, 1988, HANAKI *et al.*, 1981, HWU, 1997). Recentemente ALVES (1998) observou que a biomassa caracterizada após alimentação com oleato como única fonte de carbono apresentava uma elevada taxa de

produção de metano devida a “substrato residual”, quando incubada em reactor fechado a 37°C, sugerindo o seu estado de encapsulação por oleato ou por um intermediário da sua degradação. Este fenómeno de adsorção justifica as discrepâncias observadas frequentemente entre a remoção de CQO e a produção de metano, que é traduzida por um baixo rendimento em metano (SAYED *et al.*, 1987). A evolução do rendimento em metano durante as duas últimas etapas de funcionamento dos três digestores encontra-se representada na Figura 4 (a). Tal como pode ser observado, durante este período o digestor sem recirculação de biomassa, R1, apresentou um menor rendimento em metano, comparativamente com os outros dois, ambos com recirculação. Este facto poderá estar relacionado com o aumento da velocidade ascensional do líquido induzido pela recirculação, o qual promove o efeito de mistura dentro do digestor permitindo a libertação do biogás aprisionado nos agregados de biomassa. Por outro lado, o efeito de diluição da carga tóxica pela utilização de recirculação poderá, também, conduzir a uma menor inibição das bactérias metanogénicas, responsáveis directas da produção de metano, tal como referido anteriormente.

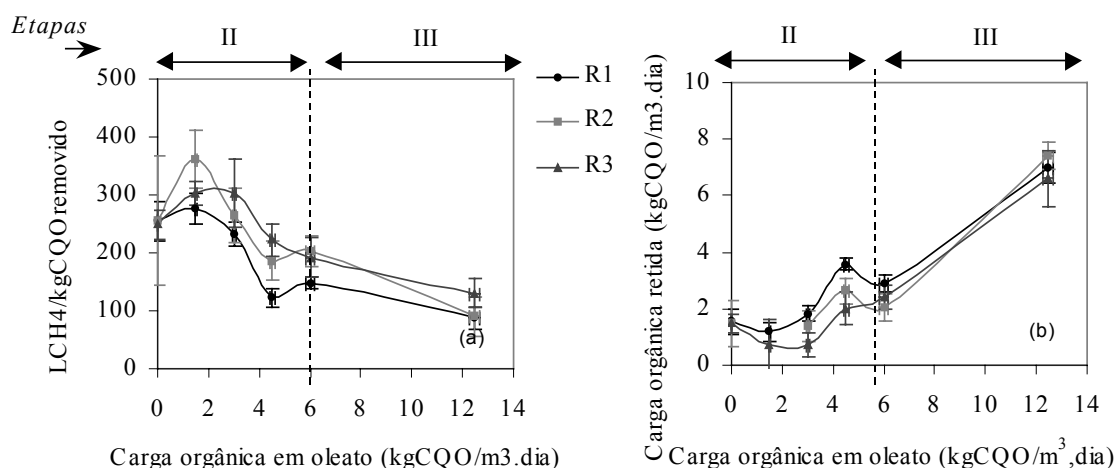


Figura 4- Evolução do rendimento em metano (a) e da carga orgânica retida (b).

Nos três digestores é observada uma diminuição da fracção de carga orgânica removida utilizada para produção de metano à medida que a carga orgânica em oleato aplicada aumenta, sugerindo a retenção de parte da carga orgânica alimentada nos digestores. De facto, através do balanço aos fluxos de carga em termos de CQO pode verificar-se um aumento da carga em CQO retida (determinada pela diferença entre a carga de CQO solúvel removida e a carga em CQO de metano produzido) em função da carga em oleato aplicada (Figura 4 (b)). A carga orgânica designada por “carga orgânica retida” inclui a fracção de CQO removido que se transformou em biomassa. Atendendo ao facto de que durante este período de operação o valor estequiométrico 2, da razão molar oleato/(Ca²⁺+Mg²⁺), foi excedido, esta elevada acumulação de carga em CQO nos digestores sugere a sua retenção por adsorção na biomassa. O estado de encapsulação da biomassa nos digestores parece ser também sugerido pela inspecção visual da biomassa em microscópio óptico de fluorescência (Figura 5). Após se ter alimentado oleato aos três digestores verificou-se a existência de zonas esbranquiçadas que pareciam envolver

os agregados de biomassa (Figura 5(I) (R1a), (R2a) e (R3a)). Em fluorescência, estas demonstravam diminuir a intensidade da autofluorescência exibida pelas populações metanogénicas (Figura 5(I) (R1b), (R2b) e (R3b)), sugerindo a existência de uma camada opaca, actuando como uma barreira às emissões de luz.

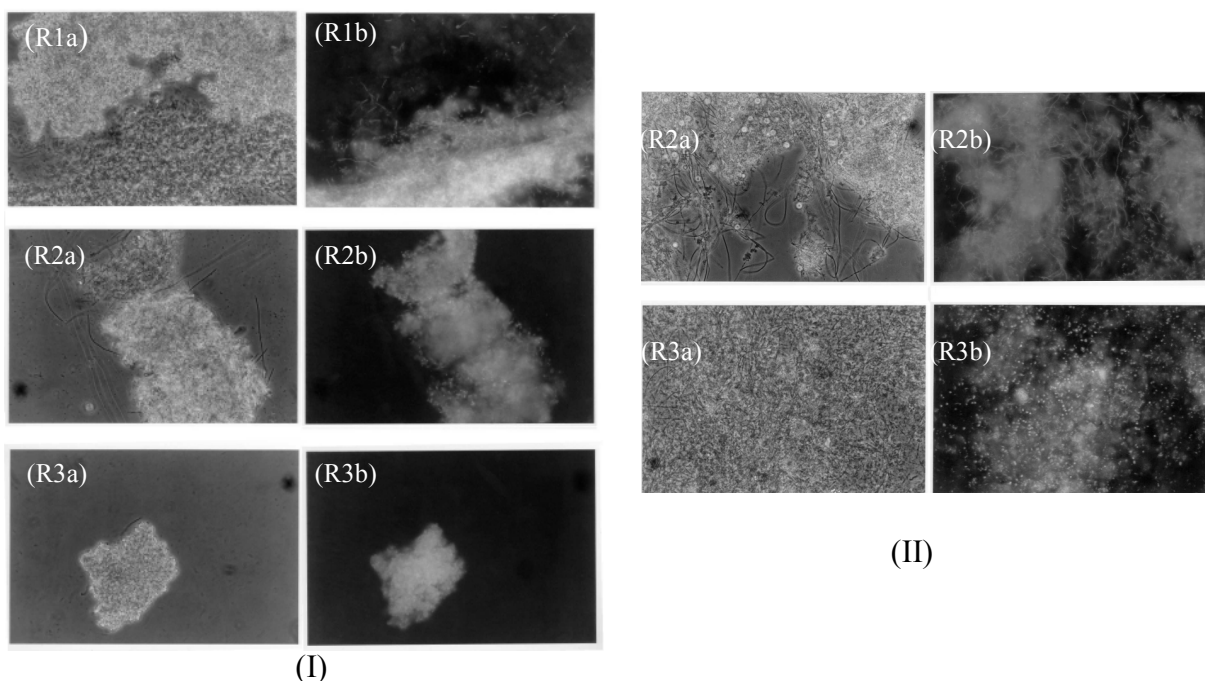


Figura 5- Fotografias obtidas num microscópio óptico de fluorescência com uma ampliação de 400 vezes: (I) da biomassa presente em R1 (119º dia), R2 e R3 (150º dia) e (II) da biomassa presente em R2 e R3 (94º dia). (campo normal(a), fluorescência(b)).

Estas zonas não eram visíveis nos agregados de biomassa presentes nos digestores durante a etapa em que foram alimentados unicamente com leite magro (etapa I) tal como se pode verificar na Figura 5(II), com excepção da biomassa de R3, em que estas zonas eram também visíveis durante este período (Figura 5(II) (R3b)). Este facto poderá estar relacionado com a existência de oleato adsorvido, resultante da prévia aclimatização com lípidos e oleato.

CONCLUSÕES

Com este trabalho evidenciou-se a potencialidade da aplicação do filtro anaeróbio no tratamento de um efluente sintético com elevada concentração de ácido oleico, obtendo-se eficiências de remoção, entre 70 e 77%, para uma carga orgânica de oleato aplicada de 12.5 kgCQO/m³.dia, mesmo com concentrações molares oleato/(Ca²⁺+Mg²⁺) de 6.79. No presente trabalho atingiram-se concentrações em oleato significativamente superiores aos valores que geralmente ocorrem em efluentes da indústria de lacticínios (aproximadamente 1700 mgCQO-AGV/l), para as quais se verificou uma elevada eficiência de remoção, baixos teores de AGV e de substrato não acidificado, bem como um elevado rendimento em metano. Os rendimentos em metano diminuíram com o

aumento da carga aplicada em oleato, embora as remoções de CQO solúvel se tenham mantido superiores a 70%, facto este que pode sugerir que parte do oleato possa ter sido retida por adsorção na biomassa. Após alimentação com oleato a biomassa apresentava-se envolvida por zonas esbranquiçadas que demonstravam diminuir a intensidade da autofluorescência exibida pelas populações metanogénicas. A utilização de recirculação da biomassa demonstrou-se vantajosa no desempenho deste sistema, promovendo a minimização do efeito de lavagem (“washout”) e a diluição da carga tóxica aplicada, conduzindo a uma menor inibição da população acetogénica e metanogénica. Além disso, o efeito inibitório do oleato de sódio sobre as populações acetogénicas e metanogénicas foi menos sentido num filtro anaeróbio inoculado com biomassa previamente aclimatizada. Conclui-se que, do ponto de vista do tratamento de efluentes com elevada carga em oleato, o efeito combinado da recirculação de biomassa e utilização de um inóculo aclimatizado é benéfico, melhorando a eficiência do desempenho do filtro anaeróbio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, M.M. 1998. Estudo e caracterização de digestores anaeróbios de leito fixo. *Tese de Doutoramento* Universidade do Minho, Braga.
- FORSTER, C.F. 1992. Oils, fats and greases in wastewater treatment. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **55**, 402-404.
- GALBRAITH, H., MILLER, T.B., PATON, A.M. and THOMSON, J.K. 1971. Antibacterial activity of long chain fatty acids and the reversal with calcium, magnesium, ergocalciferol and cholesterol. *J. Appl. Bacteriol.* **34**, 803-813.
- HANAKI, K., MATSUO, T. and NAGASE, M. 1981. Mechanisms of inhibition caused by long chain fatty acids in anaerobic digestion process. *Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 1591-1560.
- HAWKES, F.R., DONNELLY, T. and ANDERSON, G.K. 1995. Comparative performance of anaerobic digesters operating on ice-cream wastewater. *Wat. Res.*, **29**:2, 525-533.
- HWU, C.-S. 1997. Enhancing anaerobic treatment of wastewaters containing oleic acid. *Ph.D. Thesis*, Wageningen Agricultural University, Wageningen, The Netherlands.
- HWU, C.-S., DONLON, B. and LETTINGA, G. 1996. Comparative toxicity of long-chain fatty acid to anaerobic sludges from various origins. *Wat. Sci. Technol.*, **34**, 5-6, 351-358.
- KOMATSU, T., HANAKI, K. and MATSUO, T. 1991. Prevention of lipid inhibition in anaerobic processes by introducing a two-phase system. *Wat. Sci. Technol.*, **23**, 1189-1200.
- RINZEMA, A. 1988. Anaerobic treatment of wastewater with high concentration of lipids or sulfate. *Ph.D. Thesis*, Wageningen Agricultural University, Wageningen, The Netherlands.
- RINZEMA, A., BOONE, M., VAN KNIPPENBERG, K. and LETTINGA, G. 1994. Bactericidal effect of long chain fatty acids in anaerobic digestion. *Wat. Environ. Res.*, **66**:1, 40-49.
- ROY, F., SAMAIN, E., DUBOURGUIER, H.C and ALBAGNAC, G. 1986. *Syntrophomonas sapovorans* sp. nov., a new obligately proton reducing anaerobe oxidizing saturated and unsaturated long chain fatty acids. *Arch. Microbiol.*, **145**, 142-147.
- SAMSON, R., VAN DEN BERG, B., PETERS, R. and HADE, C. 1985. Dairy waste treatment using industrial-scale fixed-film and upflow sludge bed anaerobic digesters: design and start-up experience. In: *Proc. 39th Purdue Industrial Waste Conference*, Bell, J.M. (Ed.), Butterworth Publ., Boston, 235-241.
- SAYED, S., VAN CAMPEN, L. and LETTINGA, G. 1987. Anaerobic treatment of slaughterhouse waste using a granular sludge UASB reactor. *Biological Wastes*, **21**, 11-28.
- ZEHNDER, A.J.B., HUSER, B.A., BROCK, T.D. and WUHRMANN, K. 1980. Characterization of an acetate-decarboxylating, non-hydrogen-oxidizing methane bacterium. *Arch. Microbiol.*, **124**, 1-11.