



Universidade de Aveiro

Departamento de Ambiente e Ordenamento

Ano 2013

**Sandra Cristina
Rodrigues Amaral**

**Caracterização microbiológica de reatores SBR para produção de
PHA**



**Sandra Cristina
Rodrigues Amaral**

**Caracterização microbiológica de reatores SBR para produção de
PHA**

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



“Tenho a impressão de ter sido uma criança a brincar à beira-mar, divertindo-me a descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano continua misterioso diante dos meus olhos”.

(Isaac Newton)

O júri

Presidente

Prof. Doutora Maria Helena Gomes de Almeida Gonçalves Nadais

Professora Auxiliar do Departamento de Ambiente e Ordenamento da Universidade de Aveiro

Doutora Luísa Alexandra Seuanes Serafim Martins Leal

Professora Auxiliar Convidada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Maria Isabel Aparício Paulo Fernandes Capela

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

Agradecimentos

Não poderia deixar de apresentar os meus sinceros agradecimentos a algumas pessoas que, de diferentes formas, tão importantes foram no decorrer desta longa etapa académica.

Começo por agradecer à minha orientadora, Professora Doutora Isabel Capela, pela disponibilidade e apoio, sempre que solicitado, para além da simpatia com que sempre me presenteou.

À Professora Doutora Helena Nadais, pela disponibilização do equipamento, imprescindível para esta dissertação.

Um agradecimento muito especial à Mestre e Bolseira, Tânia Gameiro, pela valiosa ajuda, pela grande orientação científica e por me ter inculcido o gosto e a motivação pela caracterização dos microrganismos, para mim “desconhecidos”. Quero agradecer o apoio, profissional e pessoal, a paciência dispensada e toda a sabedoria transmitida para a elaboração desta dissertação. Obrigada pela confiança que me transmitiste e os bons momentos de descontração proporcionados.

Um obrigado aos meus colegas de laboratório, João e Daniel, pela paciência que tiveram ao transmitir-me a informação necessária dos reatores para a composição dos meus resultados. Ainda à Cátia, um obrigada, pelos momentos de descontração que me ajudaram a passar horas em frente ao microscópio.

Aos meus pais, Joaquim e Emília, aos meus irmãos, Carla e Nuno e à minha avó “Lima”, por me apoiarem em todas as fases do meu percurso académico, por todas as conversas, ora de risos, ora de lamentos e por todas as palavras encorajadoras que me traziam ao de cima. Obrigada por sempre terem acreditado em mim.

Não poderia deixar de agradecer ao Sr. Avelino e à D. Irene, pelo apoio, pela boa disposição com que sempre me presenciaram e pela preciosa ajuda que me concederam, a qual foi imprescindível no meu suporte financeiro. Um muito obrigado.

Finalmente, ao Filipe, o apoio, o carinho, a amizade e o incentivo constantes. Um muito obrigado pela paciência e compreensão com que enfrentou a minha má disposição, que me assalta inúmeras vezes, e as minhas preocupações. Um muito obrigado. (*“á-eme-ó ifén tê-é emetê-emetê-emetê”*)

Palavras-chave

Culturas mistas, Reatores SBR, Ensaio *Batch*, Polihidroxicanoatos (PHA), Microbiologia, Identificação Microscópica.

Resumo

A capacidade que determinadas bactérias têm em acumular biopolímero intracelular, a partir de substratos complexos, tem vindo a ser largamente estudada. Os Polihidroxicanoatos (PHA) têm sido o foco nos últimos anos, pois para além de possuírem propriedades semelhantes às dos plásticos convencionais, são biodegradáveis. A sua maior produção tem sido conseguida através de culturas puras, que apresentam custos elevados. Para contornar esta situação têm sido experimentadas culturas mistas, que possuem custos mais reduzidos, mas apresentam produtividades baixas, comparativamente à utilização de culturas puras. Para que o processo, a partir de populações mistas, se torne competitivo é necessário maximizar a produção de PHAs, através de um primeiro passo de enriquecimento da cultura e consequente seleção, que é conseguido recorrendo a fases consecutivas de “fome” / “fartura”, em reatores SBR e de um segundo passo que maximiza a acumulação, através de ensaios *Batch*. Foram utilizados AOV's como fonte de carbono, provenientes do soro de queijo acidificado.

O objetivo deste estudo foi caracterizar a população microbiana presente em reatores SBR de seleção de microrganismos produtores de PHAs, através da monitorização microbiológica ao longo do tempo de operação. Foi ainda verificada a evolução da acumulação de biopolímero intracelular em ensaios *Batch*. As observações microscópicas realizadas continuamente foram relacionadas com condições de operação impostas ao reator.

Os resultados indicaram grande diversidade de microrganismos presentes no reator, detetados através de técnicas simples e rápidas de microscopia e, em alguns casos, recorrendo a colorações (Gram, Tinta da china, Azul do Nilo). Foi ainda concluído que em ambos os reatores SBR foram selecionadas populações de microrganismos capazes de produzir PHA, sendo maioritariamente Gram-negativas. No entanto, a quantificação de biopolímero não foi realizada, por falta de equipamento laboratorial. Todas as técnicas utilizadas foram úteis e importantes na observação da evolução da microfauna, por forma a conhecer os microrganismos dominantes e mais importantes no processo de produção de PHA.

Keywords

Mixed Cultures, SBR reactors, *Batch assays*, Polyhydroxyalkanoates (PHA), Microbiology, Microscopic Identification.

Abstract

The ability of certain bacteria to accumulate intracellular biopolymer from complex substrates has been widely studied. Polyhydroxyalkanoates (PHA) have been the focus of recent years, because they have similar properties to conventional plastics and are biodegradable. Its largest production has been achieved through pure cultures that present high costs. In order to minimize the PHA production costs, mixed cultures have been used, but the high accumulation percentage of pure cultures was not achieved yet. The process of PHA production from mixed cultures has a first step of culture enrichment and subsequent selection, which is achieved by consecutive phases of "famine"/"feast" in SBR reactors and a second step that maximizes the accumulation, through batch assays. AOV were used as carbon source from acidified cheese whey.

The aim of this work was to characterize the microbial population in SBR reactors by microbiological monitoring over operation time. The evolution of intracellular biopolymer accumulation was also monitored. The microscopic observations were correlated with operational parameters applied for reactors.

It was observed a great diversity of microorganisms in the reactors, identified by simple and quick microscopy techniques and, in some cases, using colorings (Gram, Chinese ink and Blue Nile). It was further concluded that in both reactors populations of microorganisms able to accumulate PHA were selected, being mostly Gram-negative. All techniques used were useful and important in micro fauna's characterization, in order to identify the dominant and most important microorganisms for PHA production.

ÍNDICE

1.	Introdução.....	1
1.1.	Motivação.....	3
1.2.	Populações Microbianas em tratamentos biológicos.....	4
1.3.	Diversidade de Microrganismos	5
1.3.1.	Protozoários.....	5
1.3.2.	Bactérias formadoras de Flocos	10
1.3.3.	Bactérias Filamentosas.....	10
1.4.	Microrganismos Produtores de PHA.....	13
1.4.1.	Culturas Puras	13
1.4.2.	Culturas mistas.....	15
1.5.	Seleção de culturas produtoras de PHA em reatores SBR.....	17
1.5.1.	Comportamento Hidráulico	17
1.5.2.	Funcionamento	18
1.5.3.	Funcionamento do ADF.....	19
1.6.	Produção de PHA em reatores <i>Batch</i>	22
1.6.1.	Polihidroxialcanoatos, PHA.....	22
1.6.2.	Microbiologia e extração de PHA	25
1.7.	Técnicas de Identificação de Microrganismos.....	26
1.7.1.	Observação Direta.....	26
1.7.2.	Contagem de protozoários e pequenos flagelados.....	27
1.7.3.	Índice Biótico de Lamas.....	28
1.7.4.	Coloração de Gram	30
1.7.5.	Azul do Nilo	31
1.7.6.	Presença de EPS	32
1.8.	Objetivos	33
2.	Materiais e Métodos.....	35

2.1.	Condições Experimentais dos Reatores monitorizados.....	37
2.2.	Observação microscópica.....	39
2.2.1.	Observação Direta.....	40
2.2.2.	Contagem de protozoários e pequenos flagelados.....	41
2.2.3.	Índice Biótico de Lamas.....	42
2.2.4.	Coloração de Gram.....	42
2.2.5.	Azul do Nilo	44
2.2.6.	Presença de EPS.....	45
3.	Resultados/ Discussão	47
3.1.	Seleção de culturas em reatores SBR	49
3.1.1.	SBR 1.....	49
3.1.1.1.	Observação Direta.....	49
3.1.1.2.	Coloração de Gram.....	53
3.1.1.3.	Azul do Nilo	54
3.1.1.4.	Presença de EPS.....	55
3.1.1.5.	Avaliação do comportamento microbiológico.....	56
3.1.2.	SBR 2.....	57
3.1.2.1.	Observação Direta.....	58
3.1.2.2.	Contagem de protozoários e pequenos flagelados.....	62
3.1.2.3.	Índice Biótico de Lamas	63
3.1.2.4.	Coloração de Gram.....	64
3.1.2.5.	Azul do Nilo	66
3.1.2.6.	Presença de EPS.....	67
3.1.2.7.	Avaliação do comportamento microbiológico.....	68
3.1.3.	Avaliação do processo de seleção de culturas	68
3.2.	Acumulação de PHAs em reatores <i>Batch</i>	69
3.2.1.	Batch 1.....	69
3.2.1.1.	Observação Direta.....	69

3.2.1.2.	Azul do Nilo	70
3.2.2.	Batch 2.....	71
3.2.2.1.	Observação Direta.....	72
3.2.2.2.	Azul do Nilo	72
3.2.3.	Batch 3.....	72
3.2.3.1.	Observação Direta.....	73
3.2.3.2.	Azul do Nilo	73
3.2.4.	Batch 4.....	74
3.2.4.1.	Observação Direta.....	74
3.2.4.2.	Azul do Nilo	74
3.2.5.	Avaliação do processo de acumulação de PHA.....	74
4.	Conclusões.....	77
5.	Trabalho futuro	81
6.	Referências Bibliográficas.....	85

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 – Imagem microscópica de: a) <i>Aspidisca cicada</i> e b) <i>Euplotes sp</i> , exemplos de ciliados móveis de fundo.....	7
Figura 1.2 – Imagem microscópica de: a) uma colónia de <i>opercularia sp.</i> e b) <i>uma vorticella microstoma</i>	8
Figura 1.3 – Imagens microscópicas de: a) uma das espécies de ciliados nadadores, b) flagelados e c) ameba, presentes em sistemas de lamas ativadas.	9
Figura 1.4 – Imagem de flocos desenvolvidos em sistemas de lamas ativadas. Ampliação 100x.....	10
Figura 1.5 – Imagem visualizada ao microscópio, de uma espécie de bactéria filamentosa. Ampliação 400x.	11
Figura 1.6 – Imagens de: a) <i>R. Eutropha</i> , b) bactérias do género <i>Pseudomonas</i> , c) <i>A. latus</i> e d) bactérias <i>E. coli</i> recombinantes, com biopolímero no seu interior.	15
Figura 1.7 – Esquema do processo de funcionamento de um reator SBR.....	18
Figura 1.8 – Perfis das concentrações e da velocidade específica de crescimento num processo com culturas mistas submetidas a condições dinâmicas de adição de carbono (adaptado de serafim <i>et al.</i> , 2003)	21
Figura 1.9 – Estrutura geral dos PHA (khanna <i>et al.</i> , 2005).....	23
Figura 1.10 – Esquema representativo dos quadrantes da câmara de Neubauer.....	28
Figura 1.11 – Estrutura da parede celular em: a) bactérias gram-positivas e b) bactérias gram-negativas.	31
Figura 1.12 – Grânulos de PHA visualizados ao microscópio de epifluorescência após coloração com azul do nilo (adaptado de serafim <i>et al.</i> , 1999).....	32
Figura 1.13 – Imagem da visualização da presença de EPS numa amostra de lamas ativadas.....	32
Figura 2.1 – Calendarização da operação dos diferentes reatores nos 89 dias.....	38
Figura 2.2 - a) Imagem do microscópio carl zeiss usado no laboratório de microbiologia; b) observação em zig-zag para análise da microfauna presente na amostra.	40
Figura 2.3 – Imagem da câmara de neubauer.....	41
Figura 2.4 - a) Ilustração dos critérios de contagem de células; células consideradas na contagem a preto e células não consideradas na contagem a vermelho; b) exemplo de escolha de quadrantes a serem contados para a contagem de células em câmara de neubauer (a azul).	42
Figura 3.1 - Evolução da cultura ao longo do tempo; imagens captadas no dia: a) início do reator – ampliação 100x; b) 14º dia – ampliação 100x; c) 18º dia – 400x e d) 30º dia – ampliação 100x.....	50
Figura 3.2 - Bactérias filamentosas do tipo: a) <i>microthrix parvicella</i> , b) Tipo 0041, c) <i>nocardia sp.</i> E d) Tipo 1863, observadas na amostra de dia 25º dia (15 de Fevereiro). Ampliação 400x.	51

Figura 3.3 – Evolução da presença de protozoários ao longo do tempo no reator SBR 1; a) início do reator, b) 3º dia, c) 14º dia, d) 18º dia, e) 25º dia, f) 28º dia, g) e h) 30º dia.....	52
Figura 3.4 – Visualização da coloração de Gram no: a) início do reator e b) fase final do reator, em que (1), (2) e (3) representam bactérias gram-positivas. Ampliação 400x.....	53
Figura 3.5 - Imagens de fluorescência com o corante azul do nilo: a) sem fluorescência, b) com fluorescência, a preto e branco e c) com fluorescência vermelha (real), respeitantes ao 14º dia de monitorização; d) sem fluorescência, e) com fluorescência a preto e branco e f) com fluorescência vermelha (real), respeitantes ao 28º dia de monitorização. Ampliação 400x.....	54
Figura 3.6 – Imagens com coloração negativa para EPS, retirada ao reator no: a) 14º dia (ampliação 100x) e b) 28º dia (ampliação 400x).....	55
Figura 3.7 – Microfauna existente nas lamas inoculadas no reator SBR 2, provenientes da ETAR da Prio – Aveiro; a) ampliação 100x; b), c), d), e) e f) ampliação 400x.....	57
Figura 3.8 – Evolução geral da cultura do SBR 2 ao longo do tempo; imagens captadas no dia: a) 2º dia; b) 23º dia; c) 33º dia e d) 61º dia. Ampliação 100x.....	58
Figura 3.9 – Imagem do: a) protozoário <i>Vorticella sp.</i> , captada no 23º dia e b) nematode, captado no 26º dia. Ampliação 400x.....	59
Figura 3.10 – Imagens de: a) presença de grande quantidade de pequenos flagelados, no 28º dia; b) <i>euplotes sp.</i> , no 35º dia; c) colónia de <i>opercularia sp.</i> , no 40º dia e d) <i>nuclearia amoeba</i> , no 40º dia. Ampliação 400x.....	60
Figura 3.11 – Imagens capturadas no 2º dia após o arranque do SBR 2, contendo: a) <i>microthrix parvicella</i> e b) <i>gordona amarae</i> . Ampliação 400x.....	61
Figura 3.12 – Imagens da espécie: a) <i>sphaerotilus natans</i> , no 2º dia; b) <i>thiothrix i</i> , no 21º dia e c) <i>beggiatoa sp.</i> , no 51º dia. Ampliação 400x.....	61
Figura 3.13 – Imagens ao microscópio da visualização em câmara de Neubauer: a) a 100x, representando todo o quadrante e b) a 400x, representando um dos quadrados dos 16 existentes em cada um dos quadrantes.....	62
Figura 3.14 – Evolução da quantidade de flagelados e protozoários existentes, por litro e valor de IBL, ao longo do tempo.....	63
Figura 3.15 – Imagens retiradas no dia: a) e b) 2º dia (ampliação 100x); c) 7º dia (ampliação 400x) e d) 40º dia (ampliação 400x), identificando algumas bactérias filamentosas gram-positivas (setas azuis).	64
Figura 3.16 – Imagens retiradas no 2º dia, identificando bactérias gram-negativas: a) tipo 0041 (ampliação 100x) e b) <i>haliscomenobacter hydroxsis</i> (ampliação 400x).....	65
Figura 3.17 – Imagens de grânulos de PHA observados por microscopia de epifluorescência após coloração com azul do nilo, ao longo do tempo: a), b) e c) 12º dia; d), e) e f) 26º dia; g), h) e i) 40º dia e j), k) e l) 56º dia (ampliação 400x).....	66
Figura 3.18 – Imagens retiradas no dia: a) 5º dia e b) 42º dia, após coloração com tinta-da-china (ampliação 100x).....	67
Figura 3.19 – Imagens captadas no dia 13 de maio (1º ensaio <i>Batch</i>), por observação direta da amostra: a) floco bastante estruturado (ampliação 100x) e b) protozoários e filamentosas (ampliação 400x)....	70

Figura 3.20 – Imagens de grânulos de PHA observados por microscopia de epifluorescência após coloração com Azul do Nilo: a), b) e c) momento da alimentação e d), e) e f) 5h depois da alimentação, referentes ao <i>Batch 1</i> (ampliação 400x).....	70
Figura 3.21 – Imagem tirada no início dos ensaios <i>Batch 2, 3 e 4</i> , no dia 22 de Maio.....	71
Figura 3.22 – Imagens observadas ao microscópio referentes ao <i>Batch 2</i> , em diferentes períodos do ensaio: a) 0,5h; b) 2,5h e c) 4,5h.....	72
Figura 3.23 - Imagens observadas ao microscópio referentes ao <i>Batch 3</i> , em diferentes períodos do ensaio: a) 0,5h; b) 2,5h e c) 4,5h.....	73
Figura 3.24 – Imagens de grânulos de PHA observados por microscopia de epifluorescência após coloração com Azul do Nilo: a), b) e c) no primeiro momento de amostragem, d), e) e f) no último momento de amostragem, referentes ao <i>Batch 3</i>	73
Figura 3.25 - Imagens observadas ao microscópio referentes ao <i>Batch 4</i> , em diferentes períodos do ensaio: a) 0,5h; b) 2,5h e c) 4,5h.....	74

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1 – Lista de espécies pertencentes aos diferentes grupos de bacteriófagos.	6
Tabela 1.2. Situações particulares do funcionamento do tratamento biológico (segundo madoni, 1994a.).....	7
Tabela 1.3. Organismos filamentosos indicadores de problemas operacionais em lamas ativadas (Richard, 1989).....	13
Tabela 1.5 – Tabela de duas entradas para o cálculo do IBL.	29
Tabela 1.6 – Conversão do valor de IBL em classes de qualidade biológica das lamas e avaliação da eficiência depuradora do tratamento.....	30
Tabela 2.1 - Parâmetros de operação e quantidades utilizados nos reatores SBR.	37
Tabela 2.2 – Parâmetros de operação e quantidades utilizados nos reatores <i>Batch</i>	38

LISTA DE ABREVIATURAS

ADF – Alimentação Dinâmica Aeróbia

CBO – Carência Bioquímica em Oxigênio

CQO – Carência Química de Oxigênio

EPS – Material Polimérico Extracelular

ETAR – Estação de Tratamento de Águas Residuais

F / M – Razão alimento / microrganismos

GAOs – *Glycogen Accumulating Organisms*

IBL – Índice Biótico de Lamas

IVL – índice Volumétrico de Lamas

OD – Oxigênio Dissolvido

PAOs – *Polyphosphate Accumulating Organisms*

PHA – Polihidroxialcanoatos

SBR – *Sequencing Batch Reactor*

TRH – Tempo de Retenção Hidráulico

mcl PHA – polihidroxialcanoatos de cadeia média

PHB – polihidroxibutirato

PHB/HV - polihidroxibutirato-hidroxivalerato

PHB/HHx – poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxihexanoato)

P(3HB) – poli(3-hidroxibutirato)

1. INTRODUÇÃO

1.1. MOTIVAÇÃO

As atividades agro-industriais, nomeadamente a indústria de laticínios e o processamento de leite para produção de queijo, têm apresentado uma preocupação crescente, no que diz respeito às elevadas quantidades de subprodutos e efluentes líquidos produzidos. Estas correntes são potenciais poluentes se descarregados diretamente no meio hídrico ou se submetidos a tratamento inadequado. Para que a sustentabilidade ambiental seja assegurada é necessário que se proceda ao tratamento e à valorização dos subprodutos destas indústrias, nomeadamente ao soro de queijo. Uma alternativa viável para o seu tratamento / valorização é a fermentação acidogénica, que permite a produção de ácidos orgânicos voláteis (AOVs) e ácido láctico, em condições anaeróbias. Estes ácidos são compostos importantes como substrato para culturas mistas capazes de produzir bioplásticos, na tentativa destes materiais virem a substituir os plásticos convencionais.

É do conhecimento geral que a sociedade atual é dependente dos polímeros sintéticos. Em Portugal, o consumo de resíduos de plásticos, por habitante, é de cerca de 40 Kg/ano, não representando, ainda assim, o país com maiores consumos (Instituto Nacional de Estatística). Este material tem suscitado, no entanto, grandes problemas devido à sua alta resistência à biodegradação, originando grandes quantidades de resíduos de embalagens. É por isso importante tentar produzir diferentes tipos de plásticos biodegradáveis, como por exemplo os polihidroxicanoatos (PHA), os únicos plásticos 100% biodegradáveis, produzidos por culturas microbianas mistas, a partir de substratos complexos, como os efluentes industriais, que podem assim ser valorizados.

Atualmente já se faz a produção de biopolímeros com altas taxas de rentabilidade, mas recorrendo a culturas puras, em que a competição de mercado ainda não se faz sentir, uma vez que apresentam elevados custos de produção. A produção de PHA recorrendo a culturas mistas aparenta ser assim uma boa alternativa e consiste numa sequência de passos: a fermentação acidogénica da fonte de carbono para obter AOVs, a seleção da cultura com elevada capacidade de acumulação de PHA, utilizando esses ácidos como substrato e a otimização da produção, empregando as culturas selecionadas no passo precedente. Desta forma o custo de produção é reduzido porque não é necessária a esterilização do meio e porque se recorre a matéria-prima sem qualquer custo, uma vez que se trata de resíduos ou efluentes.

Neste sentido, com este trabalho pretende-se caracterizar os consórcios de microrganismos envolvidos no processo de produção de PHA, presentes em reatores SBR alimentados com o substrato proveniente de um reator anaeróbio acidogénico, através da implementação de técnicas simples de microscopia e de alguns métodos de coloração. Esta caracterização permite identificar os microrganismos presentes em culturas mistas, com potencial para produzir PHA.

1.2. POPULAÇÕES MICROBIANAS EM TRATAMENTOS BIOLÓGICOS

Os processos de tratamento de resíduos orgânicos utilizando microrganismos aeróbios têm sido muito utilizados, pois surgiram como uma tecnologia que desenvolve uma comunidade específica de microrganismos que utilizam os efluentes não tratados como substrato e, através de um processo de oxidação biológica, reduzem a sua carga poluidora. Estas comunidades são compostas por bactérias, protozoários e metazoários, que formam uma rede trófica relativamente simples, da qual o tratamento aeróbio está dependente. As bactérias constituem a parte principal e funcionalmente mais importante destas comunidades.

Os microrganismos, que se encontram mais frequentemente nos reatores biológicos para o tratamento de águas residuais, apresentam-se na forma de células dispersas em suspensão, em flocos, em grânulos de bactérias ou em filmes microbianos. Os grânulos são estruturas mais rígidas do que os flocos e são constituídos essencialmente por microrganismos e polímeros extracelulares. No entanto, nem sempre são claras as fronteiras teóricas entre flocos e grânulos, podendo estes últimos ser considerados apenas como um estado mais avançado de agregação, caracterizado por uma muito maior consistência do que a dos flocos (Nicolau *et al.*, 1999).

Atualmente, a indústria de lacticínios é considerada uma das maiores fontes de águas residuais a partir do processamento de alimentos. Atendendo a normas de descarga é necessário o tratamento destes efluentes, de modo a reduzir o risco ambiental, como por exemplo, problemas de eutrofização em rios e lagos. No entanto, é ainda atrativo tratar estes efluentes e ao mesmo tempo criar valor a partir do seu tratamento, conseguindo produzir novos produtos, como é o caso dos bioplásticos.

1.3. DIVERSIDADE DE MICRORGANISMOS

Na mistura que existe num reator concebido para tratar ou valorizar águas residuais, são vários os organismos que lá podem existir. Normalmente encontra-se cerca de 95% de bactérias e 5% de outros organismos, como protozoários e metazoários, rotíferos, invertebrados e muito raramente, fungos.

1.3.1. PROTOZOÁRIOS

Os protozoários desempenham um papel importante na cadeia alimentar microbiana durante o tratamento biológico de efluentes e a sua abundância e diversidade são um bom indicador do desempenho do processo, uma vez que melhoram a qualidade do efluente tratado através da predação da maior parte das bactérias dispersas no licor misto. Para além disso estimulam o crescimento bacteriano, promovem a floculação e no caso de algumas espécies, eliminam a poluição. Na ausência de protozoários, o efluente final é caracterizado por possuir uma Carência Bioquímica em Oxigénio (CBO) mais elevada e uma maior turbidez, devido à presença de muitas bactérias dispersas no licor (Cruds, 1975).

Neste sentido, Madoni (1994) introduziu o conceito de Índice Biótico de Lamas (*Sludge Biotic Index*), IBL, baseado na presença e abundância de certos grupos de protozoários, que fornece um valor numérico, o que permite monitorizar diariamente as condições de operação dos sistemas biológicos. No entanto, apesar da maioria dos estudos relatar boas correlações diretas entre o índice IBL e o funcionamento do tratamento, este índice parece não ser sempre confiável, na medida em que nem sempre a composição da microfauna traduz a qualidade do efluente final, dado que existem outras condicionantes que também contribuem para esta qualidade (Liu *et al.*, 2007).

A microfauna pode ser dividida em dois grupos, consoante a sua presença seja benéfica ou não no funcionamento da ETAR: i) grupo positivo, constituído por ciliados móveis de fundo, ciliados sésseis e amibas com teca; e ii) grupo negativo, constituído pelos pequenos flagelados, ciliados nadadores, *Vorticella microstoma* e *Opercularia sp.* (Madoni, P., 1996).

O número de protozoários ciliados é normalmente na ordem dos 10^6 indivíduos por litro, representando, aproximadamente, 9% da cultura microbiana mista. Quando este número diminui para 10^4 indivíduos por litro, indica uma depuração deficiente do efluente. Nesta situação observa-se um aumento de bactérias dispersas, o que conseqüentemente leva a um

Caracterização Microbiológica de Reatores SBR para Produção de PHA

Universidade de Aveiro

aumento da turbidez do efluente e um aumento de CBO. Um número maior que 10^7 indivíduos por litro indica, por outro lado, uma boa depuração e uma ótima eficiência de tratamento (Cruds, 1975; Madoni, 1981).

TABELA 1.1 – LISTA DE ESPÉCIES PERTENCENTES AOS DIFERENTES GRUPOS DE BACTERIÓFAGOS.

Bacteriófagos		
Nadadores	Móveis de Fundo	Sésseis
<i>Colpoda sp.</i>	<i>Aspidisca cicada</i>	<i>Carchesium spp.</i>
<i>Cyclidium glaucoma</i>	<i>Aspidiscia lynceus</i>	<i>Epistylis spp.</i>
<i>Loxocephalus sp.</i>	<i>Euplotes affinis</i>	<i>Opercularia sp.</i>
<i>Pseudocohnilembus pusillus</i>	<i>Euplotes patella</i>	<i>Stentor spp.</i>
<i>Sathrophilus sp.</i>	<i>Trachelophyllum pusillum</i>	<i>Vorticella sp.</i>
<i>Uronema nigricans</i>	<i>Trochilia minuta</i>	<i>Zoothamnium spp.</i>

Os ciliados bacteriófagos podem ser divididos em três grupos (Tabela 1.1), segundo o seu comportamento: i) os nadadores, que se encontram na parte líquida e se alimentam das bactérias dispersas no licor misto; ii) os móveis de fundo, que habitam a superfície dos flocos e se alimentam de bactérias que se encontram na superfície dos flocos; e iii) os sésseis, que se encontram fixos nos flocos mediante um pedúnculo, precipitando com o floco quando ocorre a sedimentação (Madoni, 2003).

O crescimento dos decompositores, predominantemente bactérias heterotróficas, depende da qualidade e quantidade de matéria orgânica dissolvida. Para os predadores o crescimento depende da disponibilidade de presas. As bactérias dispersas constituem o alimento para flagelados heterotróficos e bacteriófagos que, por sua vez, se tornam presas dos organismos carnívoros. As relações de competição e predação criam oscilações e sucessões das populações até ser atingida uma estabilidade dinâmica (Madoni, 2003).

Podem distinguir-se três fases que se sucedem ao longo do funcionamento destes sistemas de tratamento: i) a fase inicial de arranque da instalação, que é caracterizada pela presença de espécies típicas do efluente a tratar, principalmente ciliados nadadores e flagelados; ii) a segunda fase, que é caracterizada pela substituição dos ciliados nadadores por formas sésseis e móveis de fundo e iii) a fase estacionária, caracterizada por uma microfauna que possui estruturas que refletem as condições de estabilidade, ou seja, o equilíbrio dinâmico entre a carga orgânica e a biomassa, predominando as formas sésseis e móveis de fundo.

Uma espécie ou grupo não deve dominar perante todos os outros. Caso tal situação ocorra é indicação, normalmente, de uma disfunção trófica, devido à ação de fatores limitantes que impedem o desenvolvimento das espécies em minoria. Na Tabela 1.2 estão indicadas algumas situações em que existe um grupo dominante e as causas possíveis associadas à dominância

INTRODUÇÃO

de cada grupo. A identificação do grupo dominante permite diagnosticar o estado particular do funcionamento de uma instalação.

TABELA 1.2. SITUAÇÕES PARTICULARES DO FUNCIONAMENTO DO TRATAMENTO BIOLÓGICO (SEGUNDO MADONI, 1994A.)

Grupo Dominante	Eficiência	Causa possível
Pequenos flagelados	Má	Lamas pouco oxigenadas
Pequenas amibas nuas e flagelados	Má	Carga elevada e/ou dificilmente biodegradável
Pequenos ciliados nadadores (< 50 µm)	Medíocre	Lamas pouco oxigenadas
Grandes ciliados nadadores (> 50 µm)	Medíocre	Carga demasiado alta
Ciliados sésseis	Baixa	Fenómenos transitórios
Ciliados móveis de fundo	Boa	-----
Ciliados sésseis + móveis de fundo	Boa	-----
Amibas com teca	Boa	Carga baixa e/ou diluída; boa nitrificação

Os ciliados móveis de fundo e os ciliados sésseis normalmente co-dominam a microfauna, uma vez que ocupam nichos ecológicos diferentes, evitando assim a competição. No entanto, a relação de abundância entre os dois grupos tende a variar com a carga orgânica. Os móveis de fundo (Figura 1.1), como por exemplo, a *Aspidisca cicada*, e os *Euplotes* sp., diminuem com o aumento da carga orgânica, enquanto os organismos sésseis apresentam maior resistência a níveis de carga orgânica mais elevados.

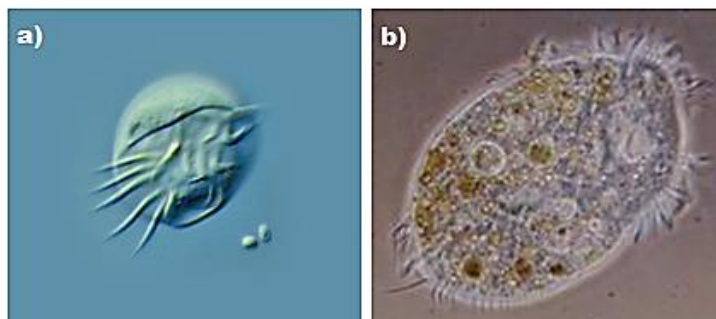


FIGURA 1.1 – IMAGEM MICROSCÓPICA DE: A) *ASPIDISCA CICADA* E B) *EUPLOTES SP*, EXEMPLOS DE CILIADOS MÓVEIS DE FUNDO.

Os ciliados móveis de fundo estão também relacionados com o Índice Volumétrico de Lamas (IVL), parâmetro que mede a sedimentação e o espessamento das lamas biológicas. Para valores baixos de IVL, a densidade de ciliados é elevada e para valores altos a sua densidade é reduzida drasticamente (Pagnotta & Tommasi, 1979).

Os ciliados sésseis são, normalmente, dominantes em sistemas de lamas ativadas. No entanto, em condições transitórias, em que existe redução da eficiência depurativa, estes ciliados podem aumentar rapidamente e a sua densidade pode representar mais de 80% da microfauna total (Madoni, 1981). Normalmente dominam a microfauna para baixos valores

de razão Alimento / Microrganismos (F/M). Para valores mais elevados desta razão tornam-se co-dominantes juntamente com os flagelados (Cruds *et al.*, 1970).

Entre os ciliados sésseis existem algumas espécies, como a *Vorticella microstoma* e a *Opercularia sp.*, que podem sobreviver e crescer em lamas ativadas expostas a condições ambientalmente críticas. Quando estas espécies estão presentes em elevada densidade, devem ser consideradas separadamente das outras formas sésseis.

A *Opercularia sp.* está associada a elevados níveis de CBO e é a espécie mais observada em lamas com elevada carga. Na Figura 1.2 a) está representada uma colónia de indivíduos desta espécie, que possuem um pedúnculo em comum. É uma espécie bastante tolerante, principalmente à presença de metais pesados e à deficiência de oxigénio.

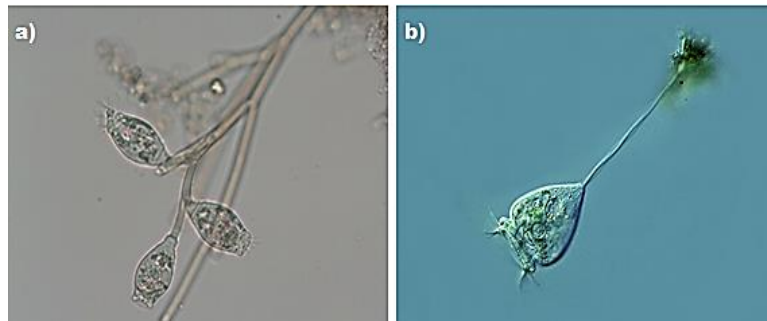


FIGURA 1.2 – IMAGEM MICROSCÓPICA DE: A) UMA COLÓNIA DE *OPERCULARIA SP.* E B) UMA *VORTICELLA MICROSTOMA*.

Esta espécie é capaz de sobreviver melhor que os outros protozoários, em ambientes desfavoráveis e por esta razão é observada em instalações de tratamento de efluentes industriais contendo substâncias tóxicas (Becares, 1991).

A *Vorticella microstoma*, Figura 1.2 b), é frequente na primeira fase de colonização, sendo posteriormente substituída pela *Vorticella convalaria* que deve dominar na fase de estabilidade. Em situações de redução da concentração de oxigénio observa-se alternância entre estas duas espécies, devido à sua diferente capacidade de tolerância à carência de oxigénio (Madoni *et al.*, 1984). A *Vorticella microstoma* é portanto um válido indicador de carência de oxigénio no reator, da escassa qualidade do efluente e de baixos valores de Oxigénio Dissolvido (OD).

Os ciliados nadadores, representado um exemplo na Figura 1.3 a), colonizam na fase inicial da instalação, quando as bactérias formadoras de flocos ainda são escassas. Posteriormente os flocos começam a formar-se e os ciliados sésseis começam a ganhar a competição pelas bactérias dispersas, uma vez que são filtradores mais eficientes que os ciliados nadadores.

INTRODUÇÃO

Assiste-se assim a uma substituição gradual destes últimos pelos ciliados sésseis (Madoni, 1994a).

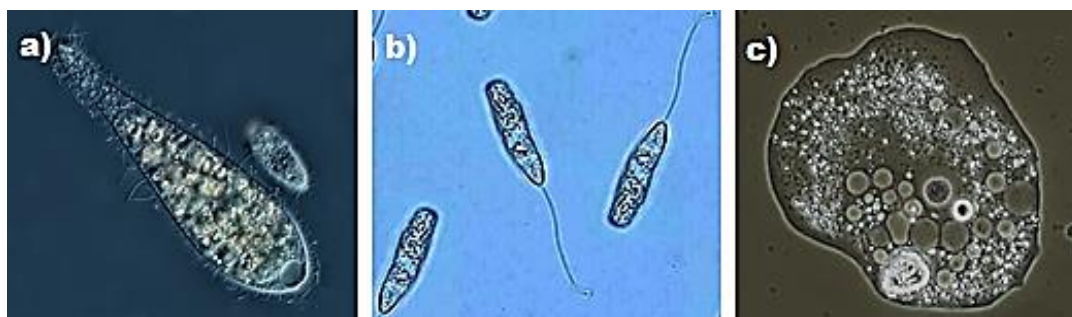


FIGURA 1.3 – IMAGENS MICROSCÓPICAS DE: A) UMA DAS ESPÉCIES DE CILIADOS NADADORES, B) FLAGELADOS E C) AMEBA, PRESENTES EM SISTEMAS DE LAMAS ATIVADAS.

Quando os ciliados nadadores se tornam predominantes, a qualidade do efluente é má (Cruds *et al.*, 1970). Estes ciliados bacteriófagos requerem grande quantidade de bactérias dispersas para se desenvolverem. Os pequenos ciliados nadadores observam-se sempre juntamente com os pequenos flagelados e, por vezes, estes dois grupos dominam a microfauna (Madoni, 1994a).

Os flagelados (Figura 1.3 b)) sofrem competição por parte dos ciliados bacteriófagos e sofrem predação por parte de outros ciliados, não se encontrando por isso em grande número nos processos analisados. Normalmente estão presentes na fase de arranque, quando as bactérias formadoras de flocos estão ausentes. Alimentam-se de bactérias dispersas e com o tempo são substituídos por ciliados bacteriófagos (Madoni, P., 1994 a). Uma grande quantidade destes organismos é indicação de um mau desempenho biológico da instalação, derivado de um arejamento insuficiente ou de uma carga orgânica elevada (Jenkins *et al.*, 2004). A dominância de flagelados torna-se evidente quando estes atingem a densidade de 100 indivíduos ao longo da câmara de Fuchs-Rosenthal. Deve, neste caso, considerar-se o grupo dominante da microfauna (Madoni, P., 1994a).

As amebas (Figura 1.3 c)) crescem em matéria orgânica particulada e são capazes de tolerar baixos índices de OD. Um aumento da quantidade destes organismos pode indicar uma elevada quantidade de matéria orgânica particulada (Jenkins *et al.*, 2004). Algumas destas espécies possuem uma carapaça designada por teca, sendo bastante abundantes em sistemas de lamas ativadas, podendo aparecer normalmente sob três formas distintas: *Arcella*, *Diffugia* e *Englypha*. As amebas com teca são dominantes nas lamas caracterizadas por baixa carga orgânica, longo tempo de retenção, alta concentração em oxigénio dissolvido e ainda baixos valores de IVL. Sob estas condições, a qualidade do efluente é excelente e o desempenho da

instalação alcança o seu valor máximo. Em situações de alta carga e alto valor de Carência Química de Oxigênio (CQO), estas espécies são substituídas por ciliados sésseis, *Opercularia* e ciliados nadadores (Sasahara *et al.*, 1983).

1.3.2 BACTÉRIAS FORMADORAS DE FLOCOS

Os flocos são uma estrutura heterogênea complexa, composta por agregados bacterianos e outros organismos, designados de formadores de flocos, como sendo *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Citromonas*, *Flavobacterium* e *Zooglea*. Estas bactérias segregam uma substância polimérica extracelular, EPS, que rodeia todo o floco (Seviour *et al.*, 2010).

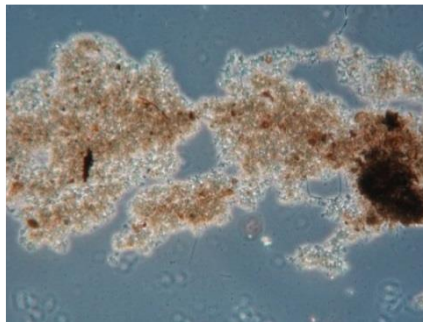


FIGURA 1.4 – IMAGEM DE FLOCOS DESENVOLVIDOS EM SISTEMAS DE LAMAS ATIVADAS. AMPLIAÇÃO 100X.

Existem dois níveis de estruturação dos flocos de lamas ativadas: a micro e a macroestrutura. A microestrutura diz respeito à agregação microbiana, à adesão e à biofloculação. A macroestrutura consiste na formação de redes, a partir de organismos filamentosos, aos quais as bactérias formadoras de flocos aderem. Esta rede de organismos filamentosos proporciona aos flocos maior resistência e maiores dimensões. Como consequência, a sua integridade é preservada mesmo quando há aumento das condições de fracionamento em ambientes turbulentos (Jenkins *et al.*, 2004).

1.3.3 BACTÉRIAS FILAMENTOSAS

Nem todas as bactérias presentes num sistema de lamas ativadas são formadoras de flocos. Muitos microrganismos filamentosos, na sua maioria bactérias, podem desenvolver-se no licor presente no tanque de arejamento. As bactérias filamentosas (Figura 1.5) são organismos unicelulares que se multiplicam por cissiparidade, permanecendo na vizinhança umas das outras. A compactação da estrutura do floco é favorecida pelo crescimento de um

INTRODUÇÃO

esqueleto filamentososo, sobre o qual se vão acumulando substâncias inertes e outras bactérias, o que explica de um modo geral a irregularidade dos flocos.

As bactérias filamentosas podem ser consideradas como parte integrante da comunidade microbiológica do processo de lamas ativadas. Embora a forma como surgem nas instalações continue, na maioria dos casos, a ser desconhecida (Wanner, 1993; Wanner, 1994), elas têm um papel importante na formação de flocos com boa capacidade de sedimentação (Jenkins *et al.*, 1993). Os flocos sem esqueleto filamentososo ou com um crescimento filamentososo muito incipiente são, de um modo geral, menores, menos resistentes às agressões causadas, por exemplo, pelo arejamento e têm uma menor capacidade de sedimentar. Os problemas surgem quando o balanço da comunidade normal deste sistema fica perturbado e as bactérias filamentosas proliferam, podendo causar problemas de *bulking* e *foaming*.

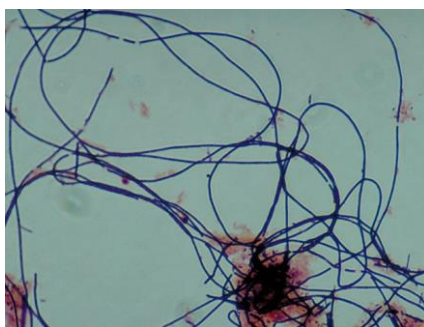


FIGURA 1.5 – IMAGEM VISUALIZADA AO MICROSCÓPIO, DE UMA ESPÉCIE DE BACTÉRIA FILAMENTOSA. AMPLIAÇÃO 400X.

O *bulking sludge* é um problema muito habitual nos sistemas de lamas ativadas, resultando numa deficiente sedimentação da lama biológica, o que pode levar à sua perda com o efluente final, diminuindo assim a sua qualidade e também diminuindo a idade das lamas. Associado ao *bulking* podem surgir outros problemas como o aumento da CQO, o aumento de sólidos no efluente final, a diminuição da concentração de sólidos na lama espessada e a sobrecarga hidráulica na fase de tratamento do excesso de lamas na ETAR. Podem distinguir-se dois tipos de *bulking*: o *bulking* viscoso e o *bulking* filamentososo. O primeiro está associado a uma síntese excessiva de exopolímero bacteriano, o que leva à formação de colónias com uma morfologia característica e com grande capacidade de retenção de água, provocando um “inchaço” nas lamas, com consequentes problemas de sedimentação. A origem mais comum do *bulking* viscoso é um déficit nutritivo, nomeadamente quando se trata de um excesso de carbono em relação à quantidade de azoto e fósforo. O *bulking* filamentososo resulta do crescimento excessivo de microrganismos filamentosos.

Embora estes problemas sejam dos mais graves ao nível da operação dos sistemas de tratamento biológico, não existem soluções universais para efetuar o controlo do crescimento

excessivo destes microrganismos. É importante identificar o tipo de filamento dominante que está a provocar o *bulking*, para tentar solucionar o problema pela origem, adotando uma ação específica para combater tal microrganismo. É por isso importante identificar não só pormenores que são difíceis de observar como também utilizar colorações específicas para observação microscópica.

No caso dos sistemas de lamas ativadas as espumas apresentam-se como uma camada superficial no reator biológico e no sedimentador secundário. Estas espumas são estáveis, densas, espessas e de cor acastanhada, o que dificulta a separação eficiente da biomassa bacteriana do clarificado, reduzindo a sua qualidade (Soddell *et al.*, 1990). A análise microscópica revela, geralmente, a presença de uma grande quantidade de dois tipos de bactérias filamentosas: Actinomicetes Gram positivos, ramificados, contendo ácidos micólicos designados por Nocardioformes ou Actinomicetes longos; e não ramificados, Gram positivos, geralmente *Microthrix parvicella* (Rainey *et al.*, 1995; Blackall *et al.*, 1994). As causas de ocorrência de *foaming* também não são totalmente conhecidas, mas parecem envolver a hidrofobicidade associada aos lípidos da parede celular destes dois tipos de Actinomicetes, causando a flutuação das lamas, quando sujeitas a arejamento (Richard, 1989). Este tipo de espumas provoca várias disfunções dentro do sistema de lamas ativadas, uma vez que reduz a transferência de oxigénio, dificulta a manutenção celular e produz, muitas vezes, um efluente de baixa qualidade.

As causas do excessivo crescimento de bactérias filamentosas num reator passam por valores de F/M baixos, carência de nutrientes como azoto e fósforo nos efluentes a tratar, proporções incorretas de C:N:P (carbono: azoto: fósforo), baixo teor de oxigénio dissolvido, elevada idade das lamas, presença de substâncias facilmente biodegradáveis, pH baixo e configuração do reator, entre outros (Richard, 1989).

Caso o seu crescimento seja excessivo os organismos filamentosos podem ser vistos como indicadores de determinados problemas operacionais. No entanto, nem todas as bactérias filamentosas fornecem um diagnóstico imediato e correto, pois a sua existência pode ser devida a múltiplas causas, como é possível ver na Tabela 1.3. Por exemplo, o Tipo 1701 pode ser um bom indicador, pois à sua presença associa-se apenas uma única causa, baixo teor em Oxigénio Dissolvido, enquanto que o mesmo não acontece com a *Thiothrix*.

INTRODUÇÃO

TABELA 1.3. ORGANISMOS FILAMENTOSOS INDICADORES DE PROBLEMAS OPERACIONAIS EM LAMAS ATIVADAS (RICHARD, 1989).

Causa	Organismos filamentosos indicadores
Baixa taxa F/M	<i>M. parvicella</i> , <i>Nocardia sp.</i> , <i>H. hydrossis</i> , tipos 0041, 0675, 0092, 0581, 0961, 0803
Baixo teor em oxigénio dissolvido	1701, <i>S. natans</i> , <i>Thiothrix sp.</i> , possivelmente 021N
Esgotos sépticos	<i>Thiothrix sp.</i> , <i>Beggiatoa sp.</i> , possivelmente 021N
Baixo pH	Fungos
Carência de nutrientes (N e/ou P)	<i>Thiothrix sp.</i> , possivelmente 021N

1.4. MICRORGANISMOS PRODUTORES DE PHA

Os biopolímeros têm vindo a ser produzidos comercialmente a partir de culturas microbianas puras. No entanto esta produção torna-se muito cara, devido em parte aos substratos utilizados. Para além disso o controlo do processo é mais elevado para manter culturas puras, o que leva a elevados custos de investimento. Uma alternativa à utilização de culturas puras, que leva à redução dos custos, é a utilização de culturas microbianas mistas (Serafim *et al.*, 2003). Este conjunto de microrganismos de diferentes espécies tem capacidade de usar resíduos industriais como substrato para a produção de PHA.

Os microrganismos produtores de PHA podem pertencer à classe de bactérias Gram-positivas ou Gram-negativas (Serafim *et al.*, 2000).

1.4.1. CULTURAS PURAS

As bactérias podem ser divididas em dois grandes grupos, segundo as suas características de acumulação do biopolímero. O primeiro grupo requer limitação de nutrientes essenciais como azoto, fósforo ou magnésio para sintetizarem o PHA a partir de uma fonte de carbono em excesso. São incluídas neste grupo a *Ralstonia eutropha*, *Pseudomonas extorquens* e *Pseudomonas oleovorans*. O segundo grupo de bactérias não necessita da limitação de nutrientes para sintetizar PHA e podem acumular biopolímero durante o crescimento, como é o caso da *Alcaligenes latus* e a *Escherichia coli* recombinante. Estas características devem ser tomadas em conta quando se realiza a produção de PHA (Khanna *et al.*, 2005).

Para a produção à escala industrial, as bactérias mais favoráveis são a *Azotobacter sp.*, *Methylobacterium sp.*, *R. eutropha* recombinante e *E. coli* recombinante, tendo em conta a grande variedade de substratos que podem utilizar. A *Azotobacter sp.* foi a primeira bactéria utilizada para efetuar síntese de P(3HB), pois consegue utilizar tanto a glucose como a sacarose como substrato. No entanto, o facto de ela produzir um polissacarídeo paralelamente à produção do biopolímero faz com que o processo seja de difícil controlo, afastando a escolha desta bactéria para produção industrial (Formolo *et al.*, 2003).

Para produzir biopolímero a partir de uma linhagem pura de bactérias é necessário grandes investimentos, mas os resultados são muito satisfatórios: são capazes de acumular 80 a 90% de biopolímero no seu interior. Alguns exemplos de culturas puras capazes de acumular PHA no seu interior são mencionados a seguir.

I) *RALSTONIA EUTROPHA*

Esta espécie tem sido a mais estudada em torno deste assunto, devido à sua capacidade de acumular grandes quantidades de PHB, a partir de fontes simples de carbono. Esta bactéria Gram-negativa pode acumular mais de 80% da sua massa celular seca em P(3HB), utilizando diversos substratos como a frutose e o soro de queijo. Para além da produção de polihidroxicanoatos (PHA), esta espécie também é utilizada para produção de outros biopolímeros (Khanna *et al.*, 2005). Na Figura 1.6 a) está representada a bactéria *R. eutropha* com os grânulos de biopolímero no seu interior.

II) *BACTÉRIAS DO GÉNERO PSEUDOMONAS*

As bactérias do género *Pseudomonas* (Figura 1.6 b)) podem produzir PHA de cadeia média e de cadeia longa, a partir de substratos contendo alcanos ou ácido alcanóico. A formação intracelular de PHA tem vindo a ser demonstrada em *Pseudomonas oleovorans*, bactérias Gram-negativas, cultivadas em meios contendo ácidos n-alcanóicos. No entanto a formação de PHA foi observada somente para hexanoatos e ácidos n-alcanóicos superiores (Khanna *et al.*, 2005).

INTRODUÇÃO

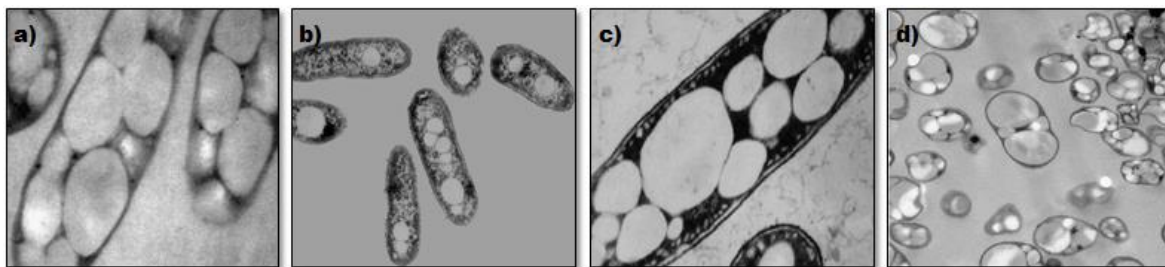


FIGURA 1.6 – IMAGENS DE: A) *R. EUTROPHA*, B) BACTÉRIAS DO GÊNERO *PSEUDOMONAS*, C) *A. LATUS* E D) BACTÉRIAS *E. COLI* RECOMBINANTES, COM BIOPOLÍMERO NO SEU INTERIOR.

III) *ALCALIGENES LATUS*

Estes microrganismos (Figura 1.6 c)) são classificados como produtores de biopolímero associado ao seu crescimento. Têm elevada velocidade específica de crescimento e apresentam a grande vantagem de poderem utilizar diversos substratos como fonte de carbono barata. Esta espécie produz PHB a uma taxa semelhante à espécie *R. eutropha* (Khanna *et al.*, 2005).

IV) *ESCHERICHIA COLI* RECOMBINANTE

Esta espécie tem sido muito utilizada para produção de vários biopolímeros (Figura 1.6 d)), sendo capaz de acumular grandes quantidades de PHA, chegando a mais de 90% da biomassa (Lee *et al.*, 1995). Não possuem polimerases intracelulares que possam degradar o polímero à medida que ele é acumulado e podem utilizar várias fontes de carbono, o que permite a utilização de matérias-primas de baixo custo. A desvantagem é a formação de filamentos de células que diminuem a velocidade de crescimento celular e diminuem a atividade metabólica, o que vai provocar um decréscimo na acumulação de PHA (Khanna *et al.*, 2005).

1.4.2. CULTURAS MISTAS

Em culturas microbianas mistas existe uma vasta gama de microrganismos capazes de acumular PHA em condições transientes de carbono e oxigênio. Esses microrganismos são selecionados a partir das condições de operação impostas ao reator (Serafim *et al.*, 2008).

As principais bactérias responsáveis pela acumulação de PHA em culturas mistas, num processo anaeróbio / aeróbio são as bactérias acumuladoras de fosfato (PAOs – Polyphosphate Accumulating Organisms) e as acumuladoras de glicogênio (GAOs – Glycogen

Accumulating Organisms). Em ambos os microrganismos a síntese de biopolímero desempenha um papel importante no seu metabolismo (Serafim *et al.*, 2003).

O acetato e o propionato são precursores do monómero HB, onde domina a espécie *Thauera sp.*, em conjunto com a *Azoarcus sp.*, encontrada em sistemas alimentados com acetato e ainda a *Kepliensis amaricoccus*, encontradas em sistemas alimentados com propionato. As duas primeiras espécies mencionadas, como ocupam diferentes nichos, conseguem co-habitar no mesmo reator (Dias *et al.*, 2006).

A produção industrial de biopolímeros a partir de culturas mistas seria uma revolução para a substituição dos plásticos convencionais, uma vez que é um processo muito mais barato do que aqueles que utilizam culturas puras. No entanto o desenvolvimento do estudo respeitante às espécies capazes de produzir PHA, partindo de uma cultura mista, ainda está muito aquém do desenvolvimento que se tem constituído com espécies em cultura pura. São exemplos de bactérias produtoras de PHA em culturas mistas: *Thauera*, *Azoarcus*, *Amaricoccus*, *Alcaligenes*, *Comamonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium* e *Kluyvera* (Lemos *et al.*, 2008). São apresentadas a seguir, com mais algum detalhe, algumas dessas espécies.

I) *THAUERA SP.*

Esta espécie usa, preferencialmente o propionato, butirato e valerato como fontes de carbono, não acumulando PHA quando o acetato é usado como substrato. As três fontes de carbono que usam para acumular PHA têm bons desempenhos, especialmente o butirato.

II) *AZOARCUS SP.*

Esta espécie utiliza como fonte preferencial de carbono o acetato, propionato e valerato e não acumulam na presença de butirato. As três fontes de carbono que usam para acumular PHAs têm bons desempenhos sobretudo o acetato.

1.5. SELEÇÃO DE CULTURAS PRODUTORAS DE PHA EM REATORES SBR

Ultimamente, não só se tem enfatizado na importância de tratar as águas residuais, como se tornou uma inovação poder reutilizá-las e até mesmo valorizar todos os subprodutos provenientes dos efluentes produzidos pelas diversas indústrias espalhadas por todo o planeta. Neste contexto são utilizados vários processos para o seu tratamento, tais como os reatores SBR (Sequencing *Batch* Reactor), para retirar toda a carga poluente que o ambiente não pode aceitar. Estes reatores são uma modificação do sistema de lamas ativadas e são utilizados em várias estações de tratamento de águas residuais, quer domésticas, quer industriais.

Os reatores SBR podem ainda ser utilizados no processo de produção de PHA a partir de culturas mistas. É neste tipo de reator onde é feita a seleção da cultura produtora de biopolímeros.

1.5.1. COMPORTAMENTO HIDRÁULICO

Os reatores SBR aproximam-se de um reator de mistura completa, ou seja, a concentração de qualquer composto deve ser igual em todos os pontos do reator. Num bom dimensionamento de um SBR o seu comportamento hidráulico não apresenta curto-circuitos e onde se reduzem muito as possibilidades de existência de zonas mortas. O curto-circuito é a passagem preferencial do fluxo por um determinado caminho, dando origem a locais com diferente TRH (tempo de retenção hidráulico). As zonas mortas são locais com TRH superior ao projetado, uma vez que são locais onde o efluente permanece mais tempo do que nos outros pontos do reator. Estas duas situações, que se devem maioritariamente à geometria dos reatores, devem ser evitadas por forma a eliminar a fração de moléculas que permanecem na unidade, durante tempos diferentes do TRH de projeto e assim tornar mais eficiente o processo de tratamento.

O reator SBR tem uma característica importante: não possui sedimentador nem recirculação de lamas. Para além disso, permite efetuar alterações nas condições operatórias (modo de funcionamento de cada fase) sem que haja um total desequilíbrio no sistema. Como funciona numa única unidade de tratamento torna-se um processo muito valorizado, pois necessita de pequenas áreas para ser instalado.

Os reatores SBR são amplamente utilizados em engenharia ambiental, pois têm as mais diversas aplicações. Os reatores SBR biológicos são utilizados no tratamento de águas residuais em ETARs, podendo o tratamento associado a este tipo de reatores ser aeróbio, com possibilidade de ocorrer a nitrificação ou anaeróbio/anóxico/aeróbio com a possibilidade de ocorrer também a desnitrificação.

1.5.2. FUNCIONAMENTO

O processo de um SBR faz parte da família de tratamentos aeróbios por lamas ativadas. (Pirra, 2005). A principal vantagem deste sistema é o facto de ser possível controlar o crescimento de bactérias filamentosas, favorecendo a seleção e manutenção da biomassa formadora de flocos com boas condições de sedimentabilidade (Charmot *et al.*, 1997). Este parâmetro é normalmente dependente da estrutura, densidade e tamanho dos agregados microbianos presentes no reator. Para manter uma boa sedimentabilidade das lamas é necessário que haja um equilíbrio entre as bactérias filamentosas e as bactérias formadoras de flocos (Jenkins *et al.*, 2003).

O processo de tratamento biológico por lamas ativadas foi pela primeira vez introduzido em Inglaterra em 1914. Neste processo existe uma cultura microbiológica de enriquecimento, constituída por um consórcio de microrganismos e macrorganismos que metabolizam substâncias inorgânicas e orgânicas do efluente, transformando-as em formas ambientalmente aceites (Richard, 1989).

Neste tipo de tratamento o reator tem um ciclo operacional composto por cinco períodos distintos: enchimento, reação, sedimentação, extração e repouso (Figura 1.7).

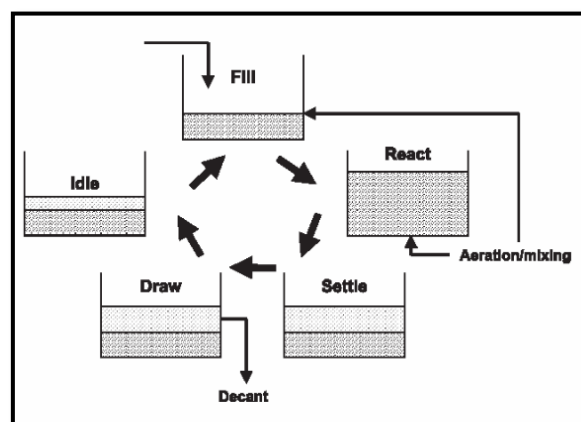


FIGURA 1.7 – ESQUEMA DO PROCESSO DE FUNCIONAMENTO DE UM REATOR SBR.

INTRODUÇÃO

O período de enchimento, ou período de alimentação é a introdução de um determinado volume de efluente a ser tratado no tanque de arejamento. Esta etapa pode ocorrer com ou sem agitação, com ou sem arejamento. A reação, também denominada por arejamento, inicia-se quando termina o enchimento e corresponde ao início da mistura entre a biomassa e o efluente, promovida por agitação e difusão de ar. É nesta fase que ocorre a maioria das reações de remoção de carga poluente e onde ocorre também a seleção propriamente dita das células acumuladoras de PHAs. A sedimentação da biomassa ocorre quando se desliga o arejamento e a agitação, promovendo desta forma a separação do efluente tratado dos sólidos biológicos, formando um sobrenadante na parte superior do reator. O período de extração consiste na retirada de sobrenadante, que é bombeado para o exterior. Este volume retirado é normalmente, igual ao volume introduzido durante a alimentação. É ainda nesta fase que ocorre a retirada de lamas biológicas em excesso, visto que é nesta altura que elas se encontram mais concentradas. O período de repouso é o intervalo de tempo que vai desde a extração até à nova alimentação, ou seja, até se iniciar um novo ciclo. (Bungay *et al.*, 2007).

Em laboratório este tipo de reator permite monitorizar todo o processo, por imposição de determinadas condições de operação e obtendo-se respostas muito viáveis de serem posteriormente implementadas industrialmente. Desta forma pretende-se recorrer a este tipo de reator para tentar encontrar consórcios de microrganismos capazes de produzirem PHA, reduzindo assim a grande quantidade de resíduos orgânicos gerados e que tanto prejudicam o ambiente.

1.5.3. FUNCIONAMENTO DO ADF

Na produção de PHA o processo é efetuado em três estágios: fermentação acidogénica do resíduo orgânico, seleção da cultura acumuladora de PHA e produção de PHA através de ensaios *Batch*. O primeiro estágio não é objeto deste estudo pois trata-se de um processo anaeróbio. Apenas é importante salientar que esta etapa é necessária para a produção dos ácidos que fazem parte da alimentação do reator aeróbio, construído para a seleção da cultura. O conteúdo em açúcar da matéria-prima inicial é transformado em ácidos gordos, tais como acetato, propionato e butirato, que são posteriormente utilizados por culturas mistas, uma vez que, ao contrário das culturas puras não armazenam carbonohidratos como PHA, mas sim como glicogénio. Este processo foi proposto por Dionisi *et al.* (2006a).

As culturas mistas introduzidas no reator SBR são compostas por populações de microrganismos de composição desconhecida, capazes de realizar reações intracelulares e extracelulares específicas, sendo selecionadas pelas condições operacionais impostas ao sistema biológico. O desenvolvimento da sua capacidade de armazenamento intracelular está intimamente ligado com as condições operacionais que limitam o seu metabolismo primário (Dias *et al.*, 2006).

Existem dois tipos de processos para selecionar culturas a partir de substratos complexos. Um dos processos é o chamado processo anaeróbio/aeróbio que, tal como o nome indica, opera em ciclos alternados anaeróbios e aeróbios. O outro processo, realiza-se por alimentação dinâmica aeróbia (ADF), em que as lamas são submetidas a dois períodos consecutivos de disponibilidade (fartura) e indisponibilidade (fome) de substrato.

No primeiro passo do processo anaeróbio / aeróbio, os microrganismos consomem polifosfato como fonte de energia para a captação anaeróbia das fontes de carbono. Estes substratos captados são temporariamente armazenados como PHA. Quando a condição se torna aeróbia o PHA é utilizado para crescimento e regeneração do polifosfato. Por esta razão a síntese de PHA por culturas mistas foi inicialmente observada em estações de tratamento de águas residuais concebidas para remoção de fósforo (Serafim *et al.*, 2008).

No segundo passo, que é estudado nesta dissertação, as condições de “fome”/ “fartura” (Figura 1.8) resultam de condições transientes de carbono. Após um longo período de carência de carbono, quando é adicionada uma elevada concentração de substrato, as bactérias transformam a maior parte da fonte de carbono em PHA, como reserva de carbono e energia. Durante o período de “fome” as bactérias consomem os PHA acumulados, produzindo energia essencial para o seu crescimento e manutenção celular. Contudo, nesta fase de fome a sua taxa de crescimento é extremamente baixa, sendo necessária a sua adaptação na fase de excesso de substrato (Majone *et al.*, 1999).

INTRODUÇÃO

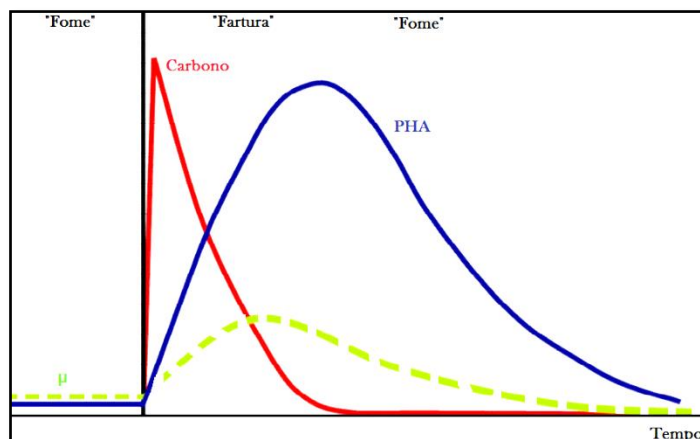


FIGURA 1.8 – PERFIS DAS CONCENTRAÇÕES E DA VELOCIDADE ESPECÍFICA DE CRESCIMENTO NUM PROCESSO COM CULTURAS MISTAS SUBMETIDAS A CONDIÇÕES DINÂMICAS DE ADIÇÃO DE CARBONO (ADAPTADO DE SERAFIM *ET AL.*, 2003).

Este processo pode levar a dois tipos de adaptação por parte dos microrganismos, dependendo da natureza do substrato e das condições de operação. A biomassa pode acumular o substrato como reserva intracelular (acumulação como resposta), sendo esta resposta mais rápida, uma vez que necessita de menor adaptação fisiológica dos microrganismos, ou a biomassa pode aumentar o crescimento celular (crescimento como resposta). Este último fenômeno verifica-se quando o tempo de exposição ao substrato é demasiado prolongado, possibilitando aos microrganismos uma adaptação fisiológica (Dionisi *et al.*, 2006c; Serafim *et al.*, 2000). Neste tipo de processo os microrganismos que possuem a capacidade de armazenar polímeros, como fonte de carbono e energia, podem sobreviver durante a fase de fome, tornando-se dominantes sobre os restantes microrganismos. A seleção sob condições de ADF já foi testada utilizando resíduos complexos reais tais como: efluentes de lagares de azeite (Dionise *et al.*, 2006a), melão de cana-de-açúcar (Albuquerque *et al.*, 2007, Albuquerque *et al.*, 2010), entre outros.

Segundo estudos realizados por Johnson *et al.* (2009) é possível selecionar uma cultura quase pura, a partir de uma cultura mista, através de manipulação das condições de operação do reator de seleção de cultura. Com a ajuda de um reator SBR, alimentado com acetato, a cultura mista é transformada numa cultura quase pura, altamente enriquecida com microrganismos acumuladores de PHA, com capacidades de armazenamento até 89%. As condições utilizadas foram: tempo de residência de um dia e ciclos de 12 horas, produzindo PHB como polímero final. A cultura era dominada por *Gammaproteobacterium*, que mostrou pouca semelhança, ao nível do 16S rRNA, relativamente às bactérias conhecidas (menos de 90% de similaridade da sequência) (Johnson *et al.*, 2009a).

1.6. PRODUÇÃO DE PHA EM REATORES *BATCH*

A acumulação de PHA foi durante muito tempo considerada como parte integrante da seleção de culturas, mas estes dois passos apresentam diferenças significativas. No passo de seleção, o objetivo é selecionar culturas de microrganismos com elevada capacidade de produção de PHA, enquanto que no passo de acumulação, essas culturas são utilizadas para maximizar a produção de PHA.

A acumulação de PHA é realizada em reatores *Batch* onde é inoculada uma amostra de biomassa retirada no final da fase de “fartura” do reator de seleção e alimentado com o mesmo substrato, mas a uma maior concentração (Villano *et al.*, 2010) e impondo limitação de nutrientes. A eficiência do processo de acumulação é um reflexo da eficiência do processo prévio de seleção da cultura.

1.6.1. POLIHIDROXIALCANOATOS, PHA

Os polihidroxicanoatos (PHA) são poliésteres de ácidos hidroxialcanóicos e/ou hidroxialcenóicos, que podem ser acumulados por diversos microrganismos em grande quantidade, sem afetar a pressão osmótica das células. Estes microrganismos acumulam os polímeros na forma de grânulos, que podem chegar a constituir aproximadamente 90% da massa celular seca. O polímero acumulado no interior das células funciona como material de reserva de carbono e energia. Os PHA são geralmente sintetizados quando os microrganismos se encontram em condições adversas ao seu crescimento (Sudesh *et al.*, 2000), tais como a limitação de nutrientes ou fatores de crescimento, a presença de uma fonte de carbono em excesso, ou em situações de limitações físicas, como a temperatura (Lee, 1996b). Quando as condições de crescimento regressam à normalidade, os biopolímeros ficam disponíveis para serem utilizados como fonte de carbono e energia (Sudesh *et al.*, 2000).

A primeira observação de grânulos de PHAs em células bacterianas foi feita por Beijerinck, em 1888 (Chowdhury, 1963). Mais tarde, Lemoigne descreveu, pela primeira vez, a composição dos PHA como sendo constituídos por um material desconhecido na forma de homopolímeros do ácido 3-hidroxibutírico, ao qual deu o nome de poli-3-hidroxibutirato (P3HB) (Lemoigne, 1926). Foi também demonstrado que a ocorrência deste polímero de reserva era um fenómeno generalizado em bactérias Gram-negativas (Sudesh *et al.*, 2000).

INTRODUÇÃO

A segunda fase da pesquisa de PHAs deu-se quando se identificou que a incorporação de uma segunda unidade monomérica em P(3HB) podia aumentar significativamente as suas propriedades úteis. Isto levou a um aumento da pesquisa e interesse comercial para este polímero de reserva bacteriano. Foi nesta fase que ocorreu a primeira produção industrial de um co-polímero, constituído por 3HB (3-hidroxi butirato) e 3HV (3-hidroxi valerato). A tendência da investigação foi para identificar e caracterizar todas as variedades de hidroxiácidos, levando à descoberta de numerosos componentes. No final da década de 1980 já era claro que estes polímeros de armazenamento eram sintetizados não apenas por bactérias Gram-negativas, mas também por uma grande variedade de bactérias Gram-positivas, aeróbias e anaeróbias, bem como por algumas arqueobactérias (Sudesh *et al.*, 2000).

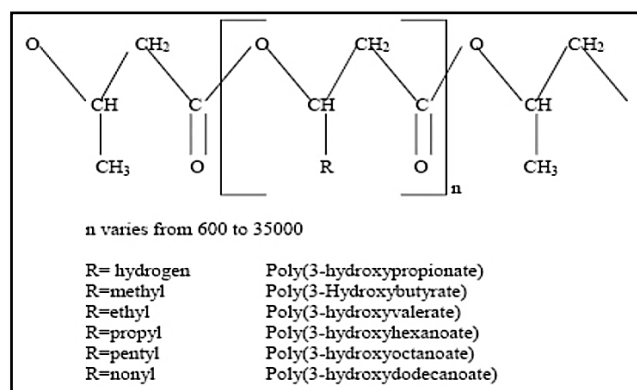


FIGURA 1.9 – ESTRUTURA GERAL DOS PHA (KHANNA *ET AL.*, 2005).

Na Figura 1.9 está representada a estrutura geral dos PHA, com a lista de radicais que se alteram, consoante o polímero de que se trata. O PHA melhor caracterizado e mais frequentemente produzido pelas bactérias é o PHB, polihidroxi butirato, sendo constituído por monómeros de 3-hidroxi butirato (Madigan *et al.*, 2000). Para além deste, existem outros vulgarmente acumulados por microrganismos, como por exemplo o PHV, polihidroxi valerato, o PMHV, polihidroxi metil valerato e o PMHB, polihidroxi metil butirato.

Dependendo do número de átomos de carbono presentes na cadeia do monómero, os PHA podem ser divididos em três grupos: PHA de cadeia curta, compostos por três a cinco átomos, PHA de cadeia média, compostos por seis a catorze átomos e PHA de cadeia longa, compostos por mais de catorze átomos. A bactéria *R. eutropha* e muitas outras bactérias produzem PHA de cadeia curta, enquanto, por exemplo, a *P. oleovorans* e outras bactérias da mesma espécie produzem PHA de cadeia média (Lenz *et al.*, 1990). Alguns PHA de cadeia curta são

demasiado rígidos e quebradiços, não possuindo as propriedades mecânicas necessárias para aplicações médicas ou em embalagens. Em contraste, os PHA de cadeia média podem ser elastómeros, mas têm, no entanto, pouca força mecânica.

Os PHA são utilizados na agricultura, como transportadores biodegradáveis, para libertação controlada de reguladores de crescimento, fertilizantes, fungicidas, herbicidas e inseticidas. No entanto a sua maior aplicação são as embalagens de alimentos, frascos, filmes, recipientes e garrafas (European Bioplastics). A biodegradabilidade destes polímeros permite que sejam aplicados em produtos de higiene pessoal, tais como fraldas descartáveis. São também usados como matéria-prima para a produção de tintas e adesivos (Weiner, 1997; Mikova *et al.*, 2006). Por serem biocompatíveis podem ter várias aplicações médicas e farmacêuticas, sendo utilizados em seringas, fios de sutura cirúrgica, enxertos de vasos sanguíneos e implantes ósseos e ainda como transportadores para libertação controlada de drogas e medicamentos (Wang *et al.*, 2008; Dai *et al.*, 2009). Estudos realizados por Reush e outros investigadores mostram que existe PHB no plasma humano, podendo variar entre 0,60 a 18,2 miligramas por litro de sangue. O PHB liga-se às lipoproteínas VLDL e LDL e não forma ligações com as HDL. Este dado sugere que o PHB pode ter efeitos fisiológicos importantes (Reush *et al.*, 1992). Segundo Zhang e outros investigadores, através da esterificação do PHB e de PHA de cadeia média, pode obter-se biodiesel (Zhang *et al.*, 2009).

Foi a empresa ICL (Imperial Chemical Industries Ltd.), que em 1982 começou a produzir polímero biodegradável, através da fermentação em grande escala, que substituiria o plástico sintético. Este polímero foi patenteado com o nome "Biopol" e é produzido pela bactéria *R. eutropha*. Esta bactéria é capaz de acumular, no seu interior, até cerca de 90% de PHB do seu peso seco (Andersen *et al.*, 1990). Atualmente, apenas alguns PHA são produzidos a nível industrial, como o PHB (polihidroxibutirato), o PHVB (poli-3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) e o PHBH (poli-3-hidroxibutirato-co-3-hidroxihaxanoato). A tecnologia para a produção destes biopolímeros utiliza culturas puras a partir de um substrato puro concentrado.

A escolha do substrato é muito importante para a produção dos PHA, tanto em termos de produtividade volumétrica, para se poder tornar um produto economicamente competitivo, como em termos de preço. Presentemente os custos de produção dependem principalmente do preço do substrato, do seu rendimento e da eficiência de extração dos polímeros das células (Lee, 1996a). Embora seja produzido industrialmente, o bioplástico é mais caro do que os plásticos sintéticos (9€/Kg vs. 1€/Kg, respetivamente) e, portanto, ainda é

INTRODUÇÃO

maioritariamente considerado como um polímero pouco atrativo comercialmente (Serafim *et al.*, 2004). É por esta razão que vários são os estudos feitos em torno desta temática, com vista à otimização económica da produção de PHA. A possibilidade de utilizar uma vasta gama de substratos mais baratos incluindo resíduos industriais e agrícolas, pode fazer com que o preço dos PHA possa ser reduzido (Meesters, 1998).

O uso de culturas mistas tornou-se uma alternativa interessante às culturas puras (Chua *et al.*, 2003; Reis *et al.*, 2003). Várias são as tentativas para viabilizar o processo de produção do material em questão, com o principal objetivo de aumentar a produtividade e diminuir os custos. As modificações genéticas em bactérias, que lhes permite acumular altos níveis de polímero no seu citoplasma e a utilização de fontes de nutrientes de origem agroindustrial, são algumas das tentativas que têm sido realizadas.

1.6.2. MICROBIOLOGIA E EXTRAÇÃO DE PHA

É na fase de limitação de nutrientes que a concentração celular residual (concentração celular menos a concentração de PHA) é constante e a concentração celular aumenta apenas devido ao teor intracelular de PHA (Álvarez Chávez *et al.*, 2012).

A mistura de ácidos orgânicos voláteis, presentes em efluentes / resíduos fermentados, pode permitir diferentes propriedades cinéticas, dependendo da população que está presente no meio reacional. O acetato e o propionato são precursores de monómeros HB e as espécies dominantes nestes sistemas é a *Thauera sp.*, juntamente com o género *Azoarcus sp.*, que usa preferencialmente o acetato, e ainda a *Amaricoccus Kεplicensis*, que usa preferencialmente o propionato (Lemos *et al.*, 2008). No entanto, ainda é necessário mais investigação nesta área, por forma a comparar a capacidade de armazenamento destas espécies e ainda se existem outras espécies até agora desconhecidas capazes de armazenar PHA (Serafim *et al.*, 2008).

O passo que se sucede à acumulação máxima de biopolímero é a sua extração do interior das células. O uso de solventes é o procedimento mais comum para recuperar os PHA acumulados pelas bactérias. Estes solventes vão alterar a permeabilidade da membrana celular em que o polímero é dissolvido no solvente e o resíduo da biomassa permanece insolúvel. Embora os solventes tenham um impacto negativo muito elevado no ambiente, este ainda é o processo que garante purezas acima dos 98%, necessárias para aplicações médicas ou na indústria alimentar (Jacquel *et al.*, 2008).

Tendo em conta as baixas quantidades de PHA obtidos geralmente por culturas mistas, o processo de extração torna-se de grande relevância. É evidente que os custos de extração são inversamente proporcionais ao conteúdo de células que contêm grânulos de PHAs. Assim sendo, a otimização da extração do polímero é, nestas situações, bastante importante.

1.7. TÉCNICAS DE IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS

Para complementar o estudo do processo de produção de PHAs a partir de microrganismos presentes nos reatores é necessário fazer a sua identificação através de técnicas de microscopia. Para tal são recolhidas amostras do reator em questão e analisadas aplicando técnicas diferentes, que permitam visualizar a presença / ausência de bactérias de elevado interesse na produção de PHA. Estes métodos são ainda importantes por permitirem monitorizar e avaliar todo o processo decorrente da operação e controlo do reator.

1.7.1. OBSERVAÇÃO DIRETA

A observação das amostras ao microscópio é importante para determinar a atividade biológica das lamas, baseada na estrutura das comunidades dos microrganismos, a natureza dos flocos e a quantidade e tipo de organismos filamentosos presentes no meio de cultura. Para se avaliar o comportamento de reatores SBR e de se manter todos os processos em bom funcionamento, é necessário efetuar análises biológicas, sendo estas um complemento das análises físico-químicas.

A observação microscópica da biomassa é um método muito rápido e simples, que permite a identificação de alterações bruscas no desempenho do sistema em estudo. Tem sido uma ferramenta útil na obtenção de parâmetros quantitativos necessários para o diagnóstico de problemas de *bulking* filamentosos, como por exemplo, o tamanho dos filamentos e a sua abundância, entre outros. No entanto, este tipo de análise tem as suas limitações. Para além de necessitar de pessoas bem treinadas para identificação de comunidades microbianas, existem algumas bactérias filamentosas que têm a capacidade de modificar a sua morfologia em resposta a alterações das condições ambientais.

INTRODUÇÃO

As amostras devem ser retiradas em pontos onde a mistura seja boa, abaixo da superfície, para evitar os sólidos suspensos ou espumas que possam estar presentes na camada superficial. A frequência de amostragem varia com as situações. Uma análise diária apenas se justifica em casos críticos de aparecimento de *bulking*, por exemplo, e durante períodos específicos de operação experimental. Para uma monitorização em laboratório, paralela a métodos físico-químicos, a recolha de amostras semanais é normalmente aceite, estando, no entanto, atento a problemas que possam surgir, de modo a aumentar a frequência de amostragem.

Retirada uma amostra, esta deve ser observada ao microscópio o mais depressa possível, uma vez que a amostra vai alterando e perdendo algumas características ao longo do tempo. No caso de não poder ser feita a análise de imediato, então conserva-se a amostra no frio. É importante evitar que a amostra congele pois tal situação modifica as características quer dos flocos, quer dos organismos filamentosos. Curtos tempos desde a recolha da amostra até à sua examinação permitem interpretações mais fiáveis dos resultados.

A observação direta ao microscópio permite ver a evolução dos flocos ao longo do tempo. Na fase de arranque é natural que não haja muitos flocos e que estes estejam em fase de formação, pouco regulares e pouco densos. À medida que o sistema avança para um estado estacionário os flocos vão ganhando outras dimensões e tornam-se mais regulares e mais densos, sendo o seu esqueleto composto por bactérias filamentosas, que lhes conferem grande resistência.

1.7.2. CONTAGEM DE PROTOZOÁRIOS E PEQUENOS FLAGELADOS

A contagem dos protozoários e dos pequenos flagelados fez-se recorrendo à Câmara de Neubauer, também denominada de Hemocitómetro. Esta câmara, apesar do desenvolvimento de várias técnicas laboratoriais, tem-se mostrado como um método dos mais usados para este tipo de contagem e permite determinar a concentração de microrganismos presentes nas amostras retiradas dos reatores.

A Câmara de Neubauer, implementada por Thomas Addis, em 1920, consiste numa lâmina de microscopia, bem mais alta do que uma lâmina normal, onde estão gravadas duas câmaras. Em conjunto com a lâmina, existe uma lamela, a qual se denomina de lamínula, que é colocada sobre a lâmina. Associada à lâmina existe uma profundidade conhecida, neste caso de 0,100 mm. Em cada câmara são gravadas marcações que as dividem em quadrantes de dimensões

conhecidas. Cada uma possui nove quadrados de contagem, cada um com 1 mm² de área. Desta forma é possível determinar quantos microrganismos existem num volume conhecido. Existem três tipos diferentes de quadrados de contagem, normalmente definidos por A, B e C, com dimensões diferentes, permitindo que sejam realizadas contagens de células de diferentes tamanhos (Figura 1.10).

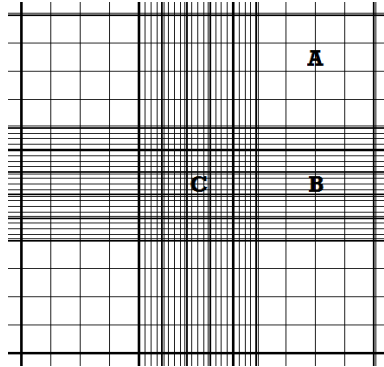


FIGURA 1.10 – ESQUEMA REPRESENTATIVO DOS QUADRANTES DA CÂMARA DE NEUBAUER.

Células grandes são contadas no quadrante A, enquanto que as de tamanho intermédio são contadas no quadrante B e as células muito pequenas contadas no quadrante C. A visualização ao microscópio é feita em contraste de fase, usando a ampliação 100x e se necessário, para células mais pequenas, a ampliação 400x. Para a contagem de protozoários e flagelados a contagem é feita no quadrante A. A contagem é realizada da esquerda para a direita, de cima para baixo, contando os 16 quadrados existentes. Este procedimento repete-se para os 3 restantes quadrantes A.

1.7.3. ÍNDICE BIÓTICO DE LAMAS

Na análise da microfauna, um dos índices que pode ser utilizado é o Índice Biótico de Lamas, concebido por Madoni em 1994 e que é baseado na abundância e diversidade da comunidade de protozoários e pequenos flagelados presentes no reator e na diferença de sensibilidades reveladas por alguns grupos da microfauna a fatores operacionais e físico-químicos prevaletentes no sistema.

Esta análise tem-se demonstrado muito eficiente na avaliação e previsão do desempenho dos sistemas clássicos de lamas ativadas, assim como da qualidade do efluente final. O IBL foi criado para demonstrar a importância dos protozoários no desempenho global do tratamento

INTRODUÇÃO

biológico. Este índice foi proposto um ano depois, de forma a demonstrar a importância dos protozoários no desempenho dos processos de tratamento biológico aeróbios.

Este índice permite a identificação e quantificação de grupos específicos de protozoários, de pequenos flagelados, de ciliados nadadores, móveis de fundo, sésseis e amibas com teca. Há outros grupos, como os rotíferos e nematodes que também podem ser usados na avaliação da qualidade biótica.

A determinação do IBL permite definir a qualidade biológica das lamas, mediante valores numéricos convencionais, recorrendo à tabela de duas entradas, apresentada na Tabela 1.5.

TABELA 1.4 – TABELA DE DUAS ENTRADAS PARA O CÁLCULO DO IBL.

Grupo dominante	Dens. (ind./L)	S > 10		8 < S < 10		5 < S < 7		S < 5	
		F < 10	10 < F < 100	F < 10	10 < F < 100	F < 10	10 < F < 100	F < 10	10 < F < 100
Ciliados móveis + sésseis* e/ou amiba com teca	≥ 10 ⁶	10	8	9	7	8	6	7	5
	< 10 ⁶	9	7	8	6	7	5	6	4
Ciliados sésseis* > 80%	≥ 10 ⁶	9	7	8	6	7	5	6	4
	< 10 ⁶	8	6	7	5	6	4	5	3
<i>Opercellaria</i> spp.	≥ 10 ⁶	7	5	6	4	5	3	4	2
	< 10 ⁶	6	4	5	3	4	2	3	1
<i>Vorticella microstoma</i>	≥ 10 ⁶	6	4	5	3	4	2	3	1
	< 10 ⁶	5	3	4	2	3	1	2	0
Ciliados nadadores	≥ 10 ⁶	5	3	4	2	3	1	2	0
	< 10 ⁶	4	2	3	1	2	0	1	0
Pequenos flagelados (> 100)Y	≥ 10 ⁶		4		3		2		1
	< 10 ⁶		3		2		1		0

**Opercellaria* e *Vorticella microstoma* não abundante
Y – nº de flagelados na câmara de Neubauer

No lado esquerdo da tabela estão as considerações relativas ao grupo dominante e a densidade total da microfauna (em indivíduos por litro). À medida que se desce na tabela, a qualidade biótica decresce. No lado direito da tabela estão representadas quatro classes, conforme o número total de espécies que constituem a microfauna (excluindo flagelados) e a densidade de flagelados (F), contabilizados na Câmara de Neubauer. Para determinar o IBL é necessário selecionar a linha correspondente ao grupo dominante e ter em conta a densidade

Caracterização Microbiológica de Reatores SBR para Produção de PHA

Universidade de Aveiro

total da microfauna. No caso de haver dois grupos dominantes, escolhe-se o grupo que ocupa a posição mais baixa. A coluna é selecionada tendo em conta o número total de unidades sistemáticas que compõe a microfauna da lama e a densidade total dos pequenos flagelados. O valor do IBL é determinado pelo cruzamento da linha e da coluna selecionadas.

Este método é baseado em dois princípios, segundo Madoni (1994). O primeiro princípio reside nas alterações no domínio dos protozoários em relação às condições ambientais e operacionais. Por exemplo, alguns protozoários podem ter uma influência negativa sobre o valor do índice. São exemplos a *Vorticella microstoma* e *Opercularia spp.* O segundo princípio reside na diminuição da densidade das células e do número de grupos taxonómicos que diminuem a eficiência operacional do sistema. O IBL permite ao operador definir a qualidade biológica das lamas através de valores numéricos convencionais (de 0 a 10), agrupadas em quatro classes de qualidade., segundo a Tabela 1.6.

TABELA 1.5 – CONVERSÃO DO VALOR DE IBL EM CLASSES DE QUALIDADE BIOLÓGICA DAS LAMAS E AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DEPURADORA DO TRATAMENTO.

Valores de IBL	Classe	Avaliação
8 - 10	I	Lamas bem colonizadas e estáveis; atividade biológica ótima; elevada eficiência depuradora
6 - 7	II	Lamas bem colonizadas e estáveis; atividade sub-ótimal; eficiência depuradora suficiente
4 - 5	III	Atividade biológica insuficiente; eficiência depuradora medíocre
0 - 3	IV	Atividade biológica muito baixa; eficiência depuradora baixa

1.7.4. COLORAÇÃO DE GRAM

A técnica de coloração de Gram é uma técnica de coloração diferencial que permite distinguir os dois principais grupos de bactérias por microscopia ótica.

Foi descoberta pelo físico dinamarquês Hans Christian Gram, em 1884, que a partir da coloração conseguia obter uma melhor visualização das amostras que analisava. No entanto, descobriu que nem todas as bactérias coravam com este método, o que o levou a sugerir a possibilidade de utilizar um contrastante. Gram faleceu sem ter conseguido que o seu método tivesse sido reconhecido. Atualmente, esta técnica é fundamental para a taxonomia e identificação de bactérias sendo, em muitos casos, utilizada como técnica de rotina.

Por via de corantes específicos, utilizados neste teste, as bactérias têm um comportamento diferente, face à coloração de Gram, consoante a espessura da parede celular bacteriana. As

INTRODUÇÃO

bactérias Gram-negativas apresentam uma parede estratificada, constituída por uma membrana externa e por uma camada mais interna que contém peptidoglicano e que é mais fina que a das Gram-positivas. Desta forma o precipitado solúvel que se forma com a ação do mordente (Soluta de Lugol) é removido aquando da adição do agente descolorante (álcool a 95% ou acetona). Este vai causar a solubilização total ou parcial da camada de peptidoglicano. Só posteriormente, com a adição do contrastante (Safranina) é que as células Gram-negativas coram de vermelho. Por sua vez, as bactérias Gram-positivas apresentam uma parede celular espessa, homogénea, geralmente não estratificada e predominantemente constituída por peptidoglicano. Deste modo, o precipitado insolúvel que se forma por ação do mordente, fica retido no interior da célula por esta camada espessa e portanto estas células não são descoradas pelo agente descolorante. Elas ficam com a coloração conferida pelo corante primário (Violeta de Cristal). Por conseguinte, a diferença da estrutura da parede celular bacteriana e em particular a espessura da camada de peptidoglicano é a responsável pelo diferente comportamento das bactérias face à coloração de Gram (Figura 1.11).

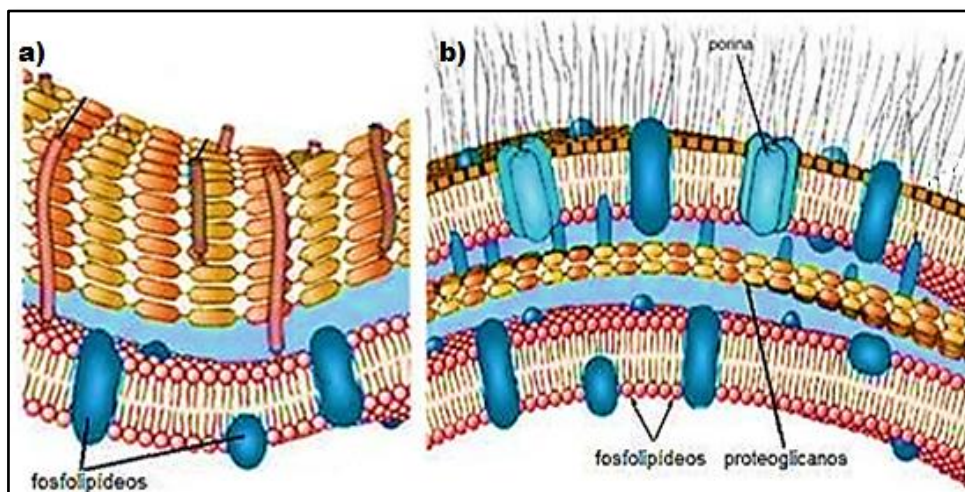


FIGURA 1.11 – ESTRUTURA DA PAREDE CELULAR EM: A) BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS E B) BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS.

1.7.5. AZUL DO NILO

Os grânulos de PHA podem ser observados por microscopia de epifluorescência (Figura 1.12), usando corantes lipofílicos tais como o Azul do Nilo (Serafim *et al.*, 1999).

O corante Azul do Nilo foi testado de forma positiva na coloração de bactérias acumuladoras de polihidroxialcanoatos, tais como *Bacillus megaterium* e *Azotobacter chroococcum*. O corante Azul do Nilo é utilizado para detetar grânulos de PHA existentes nos citoplasmas das

células. É por isso um método importante nesta dissertação, uma vez que permite verificar se ocorre acumulação de polímero ao longo do tempo de operação dos reatores, dado não estar implementado o método de quantificação de polímero. Esta deteção é feita a partir da resposta de fluorescência, que aumenta com a concentração de PHA (Hui, 2005).

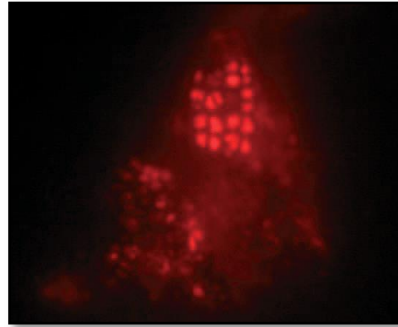


FIGURA 1.12 – GRÂNULOS DE PHA VISUALIZADOS AO MICROSCÓPIO DE EPIFLUORESCÊNCIA APÓS COLORAÇÃO COM AZUL DO NILO (ADAPTADO DE SERAFIM *ET AL.*, 1999).

1.7.6. PRESENÇA DE EPS

As lamas ativadas possuem outros componentes além das bactérias metabolicamente ativas. Existe uma estrutura livre, na qual as bactérias são unidas por uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS), crucial para a estabilidade dos flocos da biomassa.

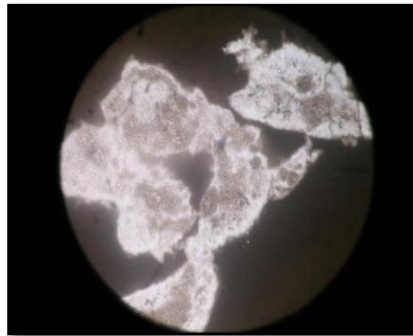


FIGURA 1.13 – IMAGEM DA VISUALIZAÇÃO DA PRESENÇA DE EPS NUMA AMOSTRA DE LAMAS ATIVADAS.

Esta substância é formada por polissacarídeos, no caso das bactérias Gram negativas, e por peptidoglicanos, no caso das bactérias Gram positivas. Este polímero orgânico aumenta a viscosidade da água, ajudando as bactérias a formar o microambiente necessário à atividade das enzimas extracelulares, facilitando a união das células simples para formar agregados maiores até constituir os flocos. A união das células depende da dimensão e da carga electrostática. Esta substância está envolvida em fenómenos de aderência, na formação da

INTRODUÇÃO

matriz, no controlo da fisiologia microbiana e na estabilidade, a longo prazo, da biomassa. No entanto, a função exata do conteúdo e a composição destas substâncias na determinação da estabilidade dos flocos das lamas ainda não está totalmente estudada (Sheng *et al.*, 2006).

Para este trabalho em concreto a visualização de EPS apenas permite um acompanhamento da prevenção do aparecimento desta substância ao longo da etapa de seleção dado o excesso da sua produção levar a uma má sedimentabilidade dos flocos biológicos e a uma consequente perda de biomassa. A coloração negativa da amostra recorrendo à tinta-da-china, permite detetar se as colónias microbianas estão a produzir substâncias poliméricas extracelulares e assim verificar se há produção de PHA, uma vez que as bactérias apenas produzem uma dessas substâncias de cada vez. A presença de EPS impede a entrada do corante nas células (Sheng *et al.*, 2008) tornando possível a visualização da substância polimérica em torno do floco. No entanto para este caso em concreto o ideal é não haver produção de EPS, mas sim de PHA. Em lamas que contenham muito EPS observa-se grandes áreas claras, que correspondem ao material polimérico, que impede as moléculas de carbono da tinta-da-china penetrarem nos flocos.

1.8. OBJETIVOS

O objetivo principal definido para esta dissertação foi a aplicação de técnicas microscópicas simples e rotineiras, com o intuito de caracterizar a população microbiana presente nos reatores SBR, onde ocorreu a seleção das culturas produtoras de PHA. As técnicas microscópicas não foram além da observação direta da amostra e de algumas técnicas de coloração, que permitiram identificar morfológicamente a população existente. Como objetivo adicional desta dissertação tinha sido inicialmente considerada a aplicação de uma técnica molecular (FISH) para identificar com maior exatidão os tipos de bactérias existentes. No entanto, apesar de se terem preparado amostras para a realização desta técnica, os resultados não puderam ser colocados, uma vez que aquando da entrega do presente documento, estes ainda não tinham sido obtidos. Pretendeu-se ainda relacionar as condições físico-químicas de operação dos reatores com os diferentes microrganismos detetados nos momentos de amostragem aos reatores instalados no laboratório, com potencial de produção de PHA.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DOS REATORES MONITORIZADOS

De modo a cumprir os objetivos desta dissertação foi acompanhado o funcionamento de dois tipos de reatores: reatores SBR (seleção de culturas produtoras de PHA) e reatores *Batch* (acumulação de biopolímero).

Para a fase de seleção da cultura produtora de PHA foram monitorizados dois reatores SBR, que apenas diferiram na quantidade de alcalinidade adicionada (Tabela 2.1). O reator SBR 1 teve início no dia 21 de Janeiro, tendo funcionado durante 31 dias (terminou a 21 de Fevereiro por morte acidental dos microrganismos). O reator SBR 2 teve início no dia 13 de Março, sendo monitorizado durante 70 dias (até dia 22 de Maio), encontrando-se ainda em funcionamento. Deu-se início a este segundo reator, uma vez que o primeiro não resistiu a uma alteração brusca de pH, que fez com que se perdesse toda a biomassa existente. A monitorização total ocorreu assim durante 102 dias, sendo retiradas e analisadas um total de 27 amostras, que foram sujeitas aos métodos microscópicos descritos na secção seguinte.

TABELA 2.1 - PARÂMETROS DE OPERAÇÃO E QUANTIDADES UTILIZADOS NOS REATORES SBR.

Parâmetros	SBR 1	SBR 2
pH	8,00	8,00
Carga Orgânica	1,5 g CQO / L . dia	1,5 g CQO / L . dia
SSV	3,0 g / L	3,0 g / L
SST	3,8 g / L	3,8 g / L
Alcalinidade Inicial	1,8 g CaCO ₃ / L	4,8 g CaCO ₃ / L
TRS (Tempo de Retenção de sólidos)	10 dias	10 dias
TRH (Tempo de Retenção Hidráulico)	5 dias	5 dias
Tempo de ciclo	1 dia	1 dia

Para a fase de acumulação de PHA foram monitorizados 4 reatores *Batch*. O primeiro reator (Batch 1) foi testado ao longo de um dia (13 de Maio) e as lamas inoculadas neste ensaio vieram do reator SBR 1. Os restantes 3 ensaios *Batch* foram realizados no dia 22 de Maio em simultâneo e as lamas inoculadas nestes 3 reatores eram provenientes do SBR 2 (Tabela 2.2).

Caracterização Microbiológica de Reatores SBR para Produção de PHA

Universidade de Aveiro

TABELA 2.2 – PARÂMETROS DE OPERAÇÃO E QUANTIDADES UTILIZADOS NOS REATORES *BATCH*.

Parâmetros	<i>Batch 1</i>	<i>Batch 2, 3 e 4</i>
Carga Orgânica	1,5 g CQO /L.dia	1,5 g CQO /L.dia
SSV	1,3 g SSV / L	1,8 g SSV / L
Volume	500 mL	475 mL

Para melhor compreender este estudo apresenta-se a calendarização do período de monitorização de cada reator ao longo do tempo.

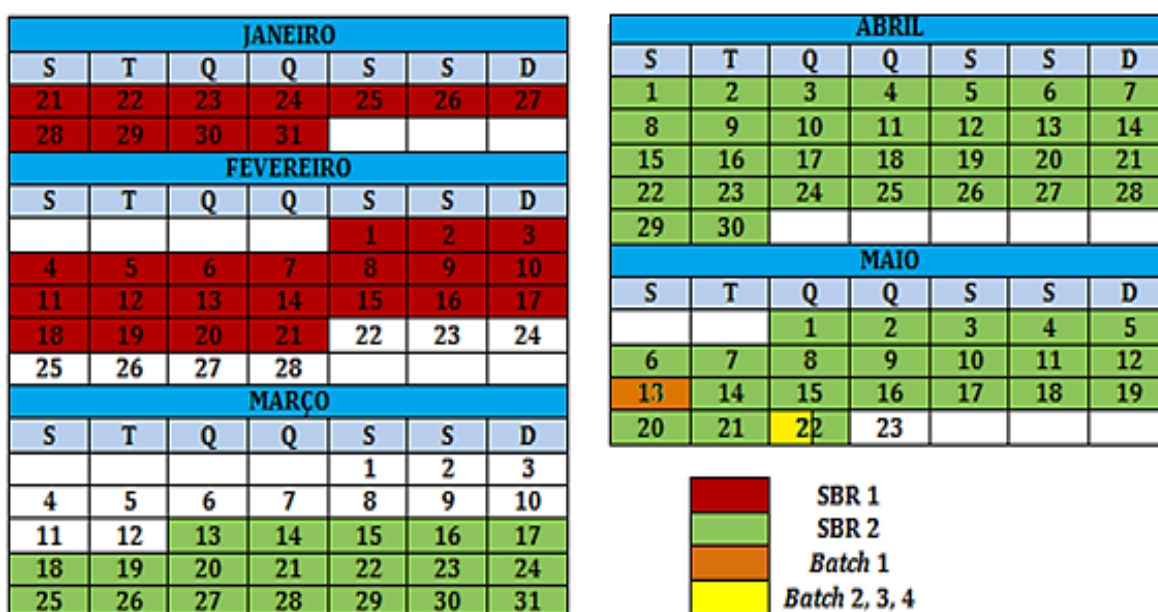


FIGURA 2.1 – CALENDARIZAÇÃO DA OPERAÇÃO DOS DIFERENTES REATORES NOS 89 DIAS.

O primeiro reator monitorizado foi o reator SBR 1 que teve a duração de 31 dias. Devido à perda de biomassa, este reator não pode ser mantido operacional por mais tempo, tendo-se dado início a um novo reator, o SBR 2. O reator SBR 2 teve início no dia 13 de Março, 32º dia de trabalho experimental, e foi monitorizado durante 70 dias, terminando a 22 de Maio. Em paralelo com este reator foram realizados dois dias distintos de ensaios *Batch*. O primeiro ensaio (*Batch 1*) decorreu no 93º dia de trabalho experimental, correspondendo ao 61º dia de monitorização do SBR 2, dia 13 de Maio. Os outros ensaios, *Batch 2, 3 e 4*, foram realizados em simultâneo no dia 22 de Maio, dia em que terminou a monitorização ao reator SBR 2.

2.2. OBSERVAÇÃO MICROSCÓPICA

Para concretizar o objetivo de monitorização microbiológica dos reatores anteriormente referidos, foi necessário implementar vários métodos microscópicos para identificação e quantificação dos microrganismos mais importantes, principalmente os produtores de PHA. As técnicas implementadas para observação microscópica do funcionamento dos reatores SBR foram: observação direta, contagem de protozoários e pequenos flagelados, determinação do Índice Biótico de Lamas (IBL), coloração de Gram, coloração com Azul do Nilo e identificação de EPS (Substância Polimérica Extracelular).

Em média, foram tiradas 3 amostras por semana aos reatores SBR, no momento em que o oxigénio dissolvido começava a aumentar, correspondendo ao início da fase de “fartura” pois, de acordo com o processo de Alimentação Dinâmica Aeróbia (ADF) este é o momento em que as bactérias têm o máximo de polímero intracelular. Em todas as amostras foi realizado o maior número de métodos de modo a obter resultados fiáveis. As amostras não foram submetidas a qualquer método para conservação, uma vez que eram tratadas e observadas num período nunca superior a uma hora, após a sua retirada.

Relativamente à observação da evolução microbiológica nos reatores *Batch*, as amostras foram retiradas em períodos de duas em duas horas. Nessas amostras procedeu-se apenas à observação direta, para conhecer quais os consórcios microbianos presentes ao longo do ensaio e à coloração com Azul do Nilo, para verificar a evolução da produção de biopolímero. Estes reatores foram alimentados uma única vez, incitando o contacto dos microrganismos com todo o substrato.

É importante referir que algumas das amostras retiradas aos reatores foram fixadas com paraformaldeído e posteriormente submetidas à técnica de FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*). No entanto, aquando da data de entrega deste documento os resultados ainda não estavam terminados, pelo que não se incluiu nem o método nem qualquer discussão referente a esta técnica.

De seguida são descritos todos os métodos que foram realizados ao longo do período de monitorização dos reatores.

2.2.1. OBSERVAÇÃO DIRETA

O método universal de observação direta ao microscópio foi implementado nos dois tipos de reatores, uma vez que é um método, apesar de simples, muito importante para conhecer a microfauna existente nas amostras. Representa o primeiro contacto com os microrganismos e a partir dele é que se implementam outras técnicas consoante o que se tenha observado.

Procedimento:

- 1) Limpar uma lâmina com etanol e com ajuda de papel absorvente, para eliminar toda a sujidade que possa conter. Fazer o mesmo com a lamela a utilizar;
- 2) Pipetar 20 μL de cultura fresca e colocar no centro da lâmina;
- 3) Cobrir a amostra com a lamela previamente limpa e retirar o excesso de água com papel absorvente;
- 4) Observar ao microscópio ótico. Neste trabalho foi utilizado o microscópio Carl Zeiss Axio Imager A2, ligado a uma câmara Carl Zeiss AxioCam MRm, (Figura 2.2 a)) que por sua vez está ligada a um computador, o que, através do programa de *software* AxioVision Rel. 4.8., permitiu obter imagens a preto e branco. Os filtros para esta observação são os de contraste de fase e as objetivas utilizadas para observação das amostras são de ampliação 10x, 40x e 100x. A ocular tem um conjunto de lentes que ampliam mais 10x o material a ser observado;
- 5) A lâmina é percorrida de cima para baixo, da esquerda para a direita, como indicado na Figura 2.2 b).
- 6) Preparar, no mínimo, mais duas réplicas e repetir o processo.

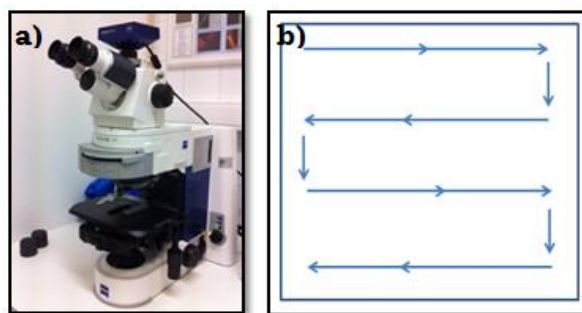


FIGURA 2.2 - A) IMAGEM DO MICROSCÓPIO CARL ZEISS USADO NO LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA; B) OBSERVAÇÃO EM ZIG-ZAG PARA ANÁLISE DA MICROFAUNA PRESENTE NA AMOSTRA.

2.2.2. CONTAGEM DE PROTOZOÁRIOS E PEQUENOS FLAGELADOS

Esta contagem foi realizada com a ajuda da Câmara de Neubauer, que teve de ser previamente estudada, para se ter conhecimento do modo como é utilizada. Este método, para além de ser útil para o conhecimento das várias espécies, vai permitir a definição do Índice Biótico de Lamas das amostras recolhidas nos reatores.

Procedimento (segundo Estridge B. *et al.*, 1999)

- 1) Com a ajuda de uma pipeta preencher com água destilada as ranhuras que se encontram na Câmara de Neubauer, para facilitar a fixação da lamela. Pressionar levemente e fazer movimentos para cima e para baixo até à sua fixação (nota: se levantar a lâmina na perpendicular com a bancada e a lamela não cair é porque está bem fixa);
- 2) Com a ajuda de uma micropipeta coloca-se 10 μL de amostra entre a lâmina e a lamela, preenchendo totalmente o volume da câmara;
- 3) Após colocação da amostra nas câmaras aguarda-se cerca de 2 minutos para que haja sedimentação das células e procede-se à observação ao microscópio;
- 4) É recomendado que, para fazer contagem de bactérias, se use os quadrantes que contêm os quadrados maiores, caso haja entre 8 a 20 células por cada um dos 16 quadrantes. Quando houver mais do que 20 células, será necessário efetuar a diluição da amostra (exemplo: 100 μL de amostra para 900 μL de água destilada – diluição 1:10);



FIGURA 2.3 – IMAGEM DA CÂMARA DE NEUBAUER.

- 5) Conta-se, seguindo a orientação da Figura 2.2 b) todas as células dos 16 quadrados do quadrante. Por fim conta-se o total de células do quadrante.

NOTA: nos limites de cada quadrado só são contabilizadas as células que estão sobre os limites superior e esquerdo (ver Figura 2.4 a)).

- 6) Anotar a quantidade de células contadas e repetir o processo para os demais quadrados, anotando os resultados;

NOTA: quanto maior o número de células contadas, maior a exatidão da medição. Uma boa técnica para escolha de quadrados a serem contadas está demonstrada na Figura 2.4 b).

7) A concentração de células por cada litro de amostra é calculada pela equação (1):

$$n^{\circ} \text{ de células} / L = \frac{\text{média de células contadas nos 4 quadrados grandes}}{\text{volume}_{\text{quadrado}}[\mu\text{L}] \times \text{diluição}} \times 10^6 \quad (1)$$

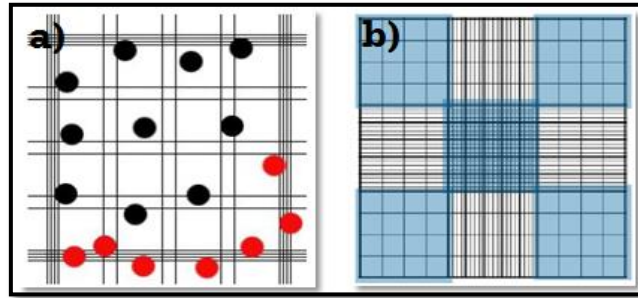


FIGURA 2.4 - A) ILUSTRAÇÃO DOS CRITÉRIOS DE CONTAGEM DE CÉLULAS; CÉLULAS CONSIDERADAS NA CONTAGEM A PRETO E CÉLULAS NÃO CONSIDERADAS NA CONTAGEM A VERMELHO; B) EXEMPLO DE ESCOLHA DE QUADRANTES A SEREM CONTADOS PARA A CONTAGEM DE CÉLULAS EM CÂMARA DE NEUBAUER (A AZUL).

2.2.3. ÍNDICE BIÓTICO DE LAMAS

Este é um método que permite a monitorização das populações na componente biótica das lamas presentes nos reatores de seleção.

Procedimento (segundo Madoni, 1994):

- 1) Numa lâmina previamente limpa coloca-se 20 μL de amostra fresca;
- 2) Colocar a lamela sobre a lâmina, de maneira a não criar bolhas de ar;
- 3) Proceder à identificação de espécies de protozoários e sua quantificação;
- 4) Após quantificar os protozoários presentes recorre-se à tabela de duas entradas, apresentada na Tabela 1.5, que definirá qual o índice atribuído à lama em questão.

2.2.4. COLORAÇÃO DE GRAM

Esta é uma técnica de coloração diferencial, que permite distinguir os dois principais grupos de bactérias por microscopia ótica. Desta forma podemos identificar o tipo de bactérias presentes nas amostras retiradas dos reatores SBR.

Reagentes:

- Violeta de Cristal:

- a) Dissolver 2 g de Violeta de Cristal em 20 mL de etanol a 95%;
- b) Dissolver, à parte da primeira dissolução, 0,8 g de oxalato de amônio em 80 mL de água destilada;
- c) Juntar as duas soluções preparadas anteriormente.

- Soluto de Lugol:

- a) Dissolver 1 g de iodo e 2 g de iodeto de potássio em 300 mL de água destilada.

- Safranina:

- a) Adicionar 10 mL de safranina em 90 mL de água destilada.

Procedimento (segundo o método Hucker modificado – Spigoni, *et al.*, 1992):

- 1) Assegurar que as lâminas estão limpas e colocar 20 μ L de lama fresca numa lâmina e, utilizando uma fonte de calor, secar a amostra, obtendo o esfregaço;
- 2) Colocar a lâmina sobre um recipiente onde possam cair resíduos líquidos e cobrir por completo o esfregaço com a solução de Violeta de Cristal. Deixar atuar durante 1 minuto. De seguida lavar com água destilada e retirar o excesso de água com papel absorvente;
- 3) Cobrir por completo o esfregaço com Soluto de Lugol e deixar atuar durante 1 minuto. De seguida lavar com água destilada e retirar o excesso de água;
- 4) Descorar com álcool a 95% e deixar atuar durante 10 a 20 segundos. De seguida lavar novamente com água destilada e retirar o excesso de água;
- 5) Cobrir por completo o esfregaço com Safranina e deixar atuar durante 15 segundos. De seguida lavar com água destilada e retirar o excesso de água;
- 6) Colocar a lamela sobre a lâmina, devidamente montada;
- 7) Observar ao microscópio em campo claro e de preferência com a objetiva de imersão.

2.2.5. AZUL DO NILO

A técnica de coloração com o corante Azul do Nilo permite detetar grânulos de PHA no citoplasma das células selecionadas para acumularem este biopolímero. Os grânulos de PHA podem ser observados através de um microscópio ligado a uma câmara de fluorescência que emite uma radiação a 700 nanómetros (cor verde), aproximadamente, e emite coloração vermelha fluorescente, devido à oxidação espontânea da oxazina básica em oxazona Vermelho do Nilo, sendo esta última a verdadeira responsável pela coloração dos grânulos de PHA (Serafim *et al.*, 2000). Neste teste é importante que o sistema de iluminação e o de deteção sejam adequados aos fluorocromos dos corantes, assim como os filtros de excitação (Madrid *et al.*, 2005).

Reagentes:

- Solução de NaCl a 0,9%

a) Dissolver 9 g de NaCl em 1000 mL de água destilada.

- Corante Azul do Nilo

a) Dissolver 1g de corante Azul do Nilo em 100 mL de água destilada

- Solução de Ácido acético a 8%

a) Adicionar 8 mL de ácido acético glacial (CH₃CO₂H) a 92 mL de água destilada.

Procedimento (segundo Jenkins *et al.*, 2004):

- 1) Colocar 1 mL de cultura fresca num tubo *ependorf* e centrifugar durante 5 minutos abaixo dos 5000 rpm;
- 2) Retirar o sobrenadante e ressuspender o *pellet* com 1 mL de NaCl a 0,9%;
- 3) Adicionar 5 µL de corante Azul do Nilo; colocar no *vórtex* 2 segundos para que a gota de corante se misture com a amostra;
- 4) Levar à estufa a 55°C, durante 10 minutos (o *ependorf* deve ser embrulhado em papel de alumínio, uma vez que o corante Azul do Nilo é fotossensível);
- 5) Centrifugar durante 5 minutos abaixo dos 5000 rpm;
- 6) Deitar fora o sobrenadante e ressuspender com 1 mL de NaCl a 0,9%

- 7) Centrifugar durante 5 minutos abaixo dos 5000 rpm;
- 8) Deitar fora o sobrenadante e ressuspender em 2 mL de Ácido acético a 8%;
- 9) Agitar no *vórtex* durante 1 minuto;
- 10) Centrifugar durante 5 minutos abaixo dos 5000 rpm;
- 11) Deitar fora o sobrenadante e ressuspender em 500 μ L de NaCl a 0,9%;
- 12) Preparar uma lâmina e colocar no seu centro 20 μ L do preparado. Montar a lamela e visualizar ao microscópio, usando lâmpada de fluorescência.

2.2.6. PRESENÇA DE EPS

A visualização de material polimérico extracelular nas amostras retiradas ao reator SBR de seleção de microrganismos é possível com a coloração da amostra com tinta-da-china.

Reagentes:

- Solução de tinta-da-china (adquirido já em solução)

Procedimento (segundo Jenkins *et al.*, 2004):

- 1) Adicionar 1 gota de tinta-da-china a 20 μ L de cultura fresca numa lâmina;
- 2) Montar a lamela por cima da lâmina e observar ao microscópio de contraste de fase, usando a ampliação menor (100x).

3. RESULTADOS/ DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados todos os resultados obtidos na monitorização microscópica dos reatores SBR de seleção de microrganismos e dos reatores *Batch* de acumulação de biopolímeros e respetiva discussão.

3.1. SELEÇÃO DE CULTURAS EM REATORES SBR

Os reatores SBR montados no laboratório tiveram como finalidade selecionar uma população de microrganismos, capaz de produzir PHA, a partir de uma cultura mista proveniente de um sistema de lamas ativadas, usando como substrato um subproduto da indústria láctea (soro de queijo) previamente acidificado.

3.1.1. SBR 1

Para caracterizar os consórcios de microrganismos presentes no reator SBR 1, primeiro reator a ser monitorizado, as 11 amostras tiradas foram observadas ao microscópio, quer sem qualquer tratamento, quer recorrendo a técnicas simples de coloração para facilitar a caracterização morfológica de alguns microrganismos. Essas técnicas foram adaptadas às amostras e condições existentes, de modo a tentar relacionar os microrganismos com as condições impostas aos reatores.

Neste primeiro reator não se procedeu à contagem de protozoários e pequenos flagelados, uma vez que a Câmara de Neubauer apenas chegou ao departamento no dia 10 de Abril, pelo que, este reator terminou sem que tivéssemos o material necessário para esta contagem. Como a determinação do Índice Biótico de Lamas (IBL) está dependente dessa mesma contagem, este parâmetro também não foi determinado.

3.1.1.1. OBSERVAÇÃO DIRETA

De um modo geral, foi possível observar grande diversidade microbiológica nas amostras ao longo do tempo. De entre a diversidade encontrada estavam diferentes tipos de protozoários, bactérias formadoras de flocos e alguns tipos de bactérias filamentosas, específicos de

sistemas de lamas ativadas. A Figura 3.1 mostra a evolução da cultura ao longo do tempo, representando quatro amostras observadas ao microscópio, retiradas do reator em dias diferentes, sendo a ultima imediatamente antes da ocorrência de morte da cultura e terminação deste reator.

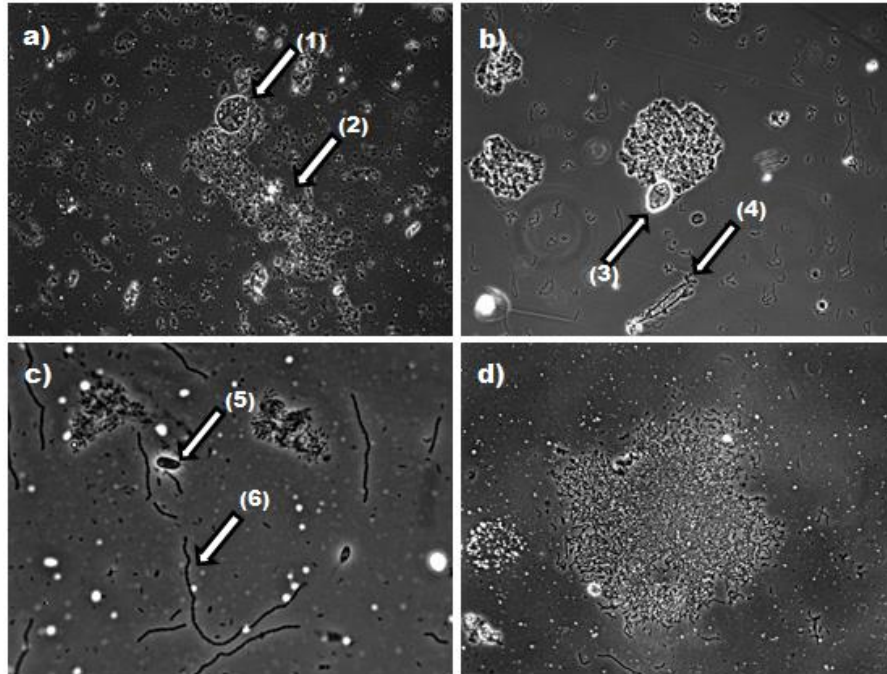


FIGURA 3.1 - EVOLUÇÃO DA CULTURA AO LONGO DO TEMPO; IMAGENS CAPTADAS NO DIA: A) INÍCIO DO REATOR – AMPLIAÇÃO 100X; B) 14º DIA – AMPLIAÇÃO 100X; C) 18º DIA – 400X E D) 30º DIA – AMPLIAÇÃO 100X.

É possível notar que no início da monitorização do reator (Figura 3.1 a)), a cultura apresentava grande quantidade de bactérias dispersas, flocos numa fase de formação (2) e alguns protozoários (1).

As bactérias dispersas são comuns na fase inicial, havendo proliferação de flagelados e de ciliados bacteriófagos, os consumidores destas bactérias. Como estes indivíduos só estão presentes na fase de colonização é normal que se encontrem bactérias dispersas na cultura.

Ao longo do tempo foi interessante observar a evolução da quantidade e forma dos flocos presentes na cultura. No início estes eram pequenos, pouco densos e irregulares (ver Figura 3.1 a) e b)), contrastando com uma fase mais avançada, em que os flocos apresentavam uma estrutura mais complexa, bastante mais densa e regular (ver Figura 3.1. d)). As bactérias filamentosas, que só vão aparecendo no reator passado algum tempo do seu arranque, representam o suporte para a estrutura dos flocos, daí o motivo dos flocos se formarem e se definirem ao longo do tempo. Se na fase inicial os organismos filamentosos são poucos, os

RESULTADOS / DISCUSSÃO

flocos não podem apresentar uma estrutura robusta. Com a reprodução e desenvolvimento de bactérias filamentosas (ver Figura 3.1 c) – número (6)) os flocos começam a ganhar corpo e a ficarem bem estruturados. O equilíbrio das quantidades destes dois tipos de microfauna indica umas lamas com boas características de sedimentabilidade.

Os pequenos flagelados, característicos da fase inicial, não podem ser considerados como representantes de uma fase mais avançada, pois são associados às lamas inoculadas no reator. No entanto, no 18º dia (8 de Fevereiro) estes indivíduos surgiram em grande número (5) (ver Figura 3.1 c)). Em lamas já com algum desenvolvimento, como era o caso, a presença destes indivíduos só pode estar relacionada com um arejamento insuficiente ou com uma carga orgânica demasiado elevada. Nesse dia foi detetado um problema no sistema de arejamento, o que poderá justificar esse aumento do número de pequenos flagelados.

Relativamente às bactérias filamentosas presentes na cultura, estas foram aparecendo ao longo do tempo, como era esperado. A Figura 3.2 contém imagens das principais bactérias filamentosas observadas no reator SBR 1.

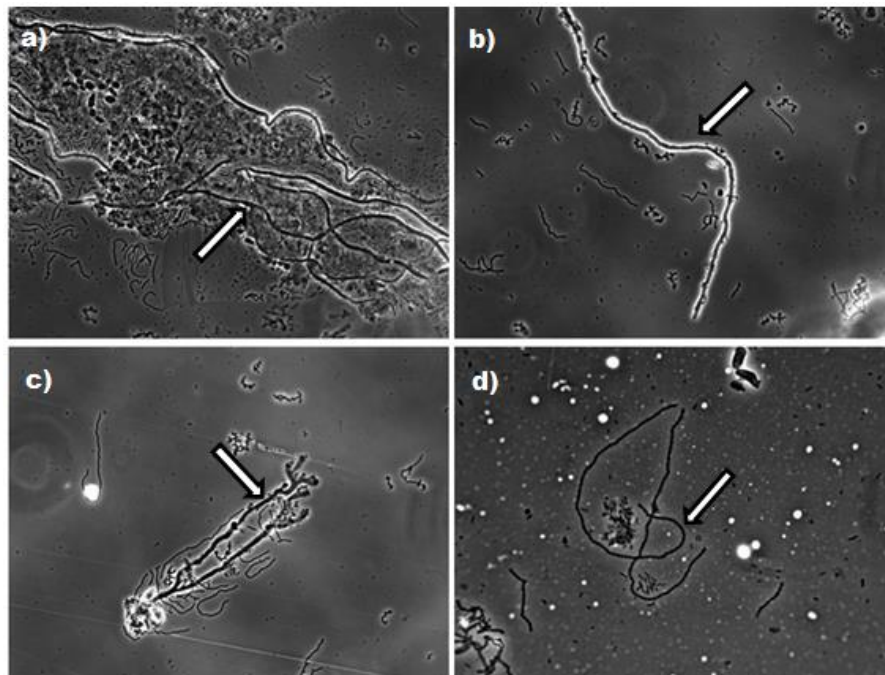


FIGURA 3.2 - BACTÉRIAS FILAMENTOSAS DO TIPO: A) *MICROTHRIX PARVICELLA*, B) TIPO 0041, C) *NOCARDIA SP.* E D) TIPO 1863, OBSERVADAS NA AMOSTRA DE DIA 25º DIA (15 DE FEVEREIRO). AMPLIAÇÃO 400X.

As principais bactérias filamentosas observadas no reator SBR 1 foram a *Microthrix parvicella* (a)), a Tipo 0041 (b)), a *Nocardia sp.* (c)) e a Tipo 1863 (d)). A *Microthrix parvicella* foi

observada no 25º dia de monitorização. Esta bactéria encontra-se normalmente relacionada com uma elevada idade das lamas. No mesmo dia detetou-se a presença de filamentosas do Tipo 0041, que também estão associadas a elevadas idades das lamas. Neste caso, o tempo de retenção de sólidos (TRS) era de 10 dias, o que pode justificar de algum modo o aparecimento destas bactérias. A *Nocardia sp.*, que também surgiu nesse mesmo dia de operação, está relacionada com o aparecimento de espumas de cor castanha e espessa que se fizeram notar nesse dia à superfície do licor misto. As bactérias filamentosas do Tipo 1863 foram observadas continuamente desde o 8º dia de monitorização do reator SBR 1. A sua presença não é alarmante, uma vez que, normalmente, não causa problemas de *bulking*. No entanto, pode causar *foaming*, devido à tendência de crescerem em solução.

Apesar da existência destes tipos de microrganismos, em nenhuma fase de monitorização microscópica foi detetável uma proliferação preocupante que pudesse pôr em risco o normal funcionamento do reator e o metabolismo dos restantes microrganismos presentes na cultura. O facto de nenhuma das espécies de bactérias filamentosas ter sido detetada em grandes quantidades está relacionado com a boa qualidade do efluente à saída do reator.

A Figura 3.3 mostra a evolução ao longo do tempo dos vários tipos de protozoários observados nas amostras retiradas do reator.

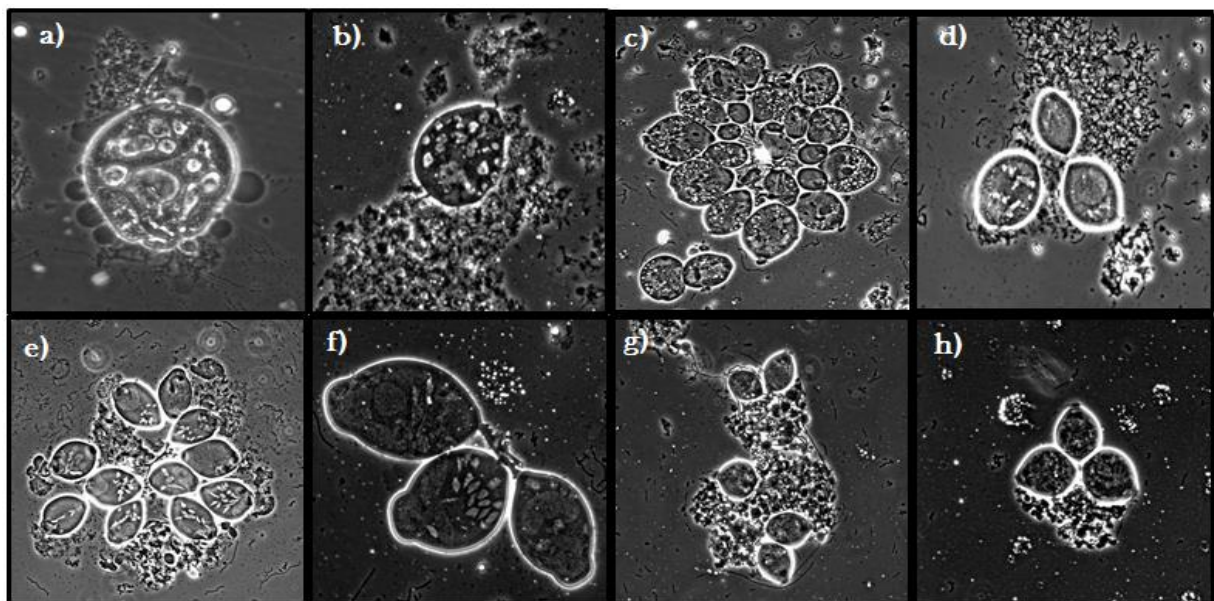


FIGURA 3.3 – EVOLUÇÃO DA PRESENÇA DE PROTOZOÁRIOS AO LONGO DO TEMPO NO REATOR SBR 1; A) INÍCIO DO REATOR, B) 3º DIA, C) 14º DIA, D) 18º DIA, E) 25º DIA, F) 28º DIA, G) E H) 30º DIA.

Os protozoários observados aquando da inoculação do reator estavam presentes nas lamas ativadas, provenientes da ETAR, e não se desenvolveram devido às condições impostas no reator SBR. A espécie observada nos 4 primeiros dias de monitorização foi a *Vorticella sp.*, que se apresentou individualmente na cultura. Estes indivíduos são, geralmente, dominantes em sistemas de lamas ativadas, pelo que é normal que tenham aparecido no início da amostragem, pois as lamas introduzidas no reator deveriam ter estes microrganismos. A espécie dominante observada desde o 18º dia até ao 31º dia (final do reator SBR 1) foi a *Opercularia sp.*, que se apresentou em colónias, normalmente agarradas por um pedúnculo comum a dois ou mais indivíduos. Este tipo de ciliados, que normalmente se encontram agarrados aos flocos, sedimentando com eles, apresenta uma elevada resistência a condições ambientais, pelo que é normal que, em situações transitórias, como é o aumento da carga orgânica, a sua densidade na fauna total possa aumentar.

A classificação do tipo de protozoários feita teve em conta a sua morfologia. Não se usou nenhum método molecular específico mas aparentam pertencer aos ciliados sésseis e móveis de fundo.

3.1.1.2. COLORAÇÃO DE GRAM

As bactérias capazes de produzir polímero podem ser bactérias Gram-positivas ou Gram-negativas, como já foi referido na secção 1.7.4. Neste sentido, o método de coloração de Gram é bastante importante nesta dissertação, por forma a facilitar a identificação das bactérias dominantes e mais importantes para a produção de PHA nas condições impostas aos reatores neste estudo. A Figura 3.4 mostra a dominância das bactérias Gram-negativas, relativamente às Gram-positivas.

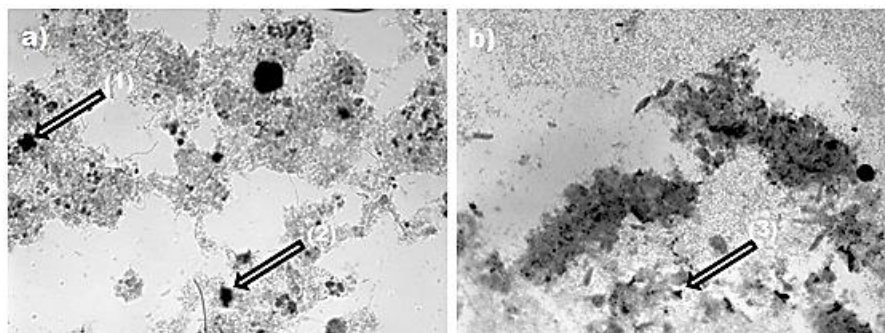


FIGURA 3.4 – VISUALIZAÇÃO DA COLORAÇÃO DE GRAM NO: A) INÍCIO DO REATOR E B) FASE FINAL DO REATOR, EM QUE (1), (2) E (3) REPRESENTAM BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS. AMPLIAÇÃO 400X.

No início da amostragem as observações realizadas ao microscópio permitiram a identificação de bactérias Gram-negativas, maioritariamente, como mostra a Figura 3.4. a), realçando que todos os pontos mais escuros que não estão identificados por setas apresentavam coloração vermelha, retratando bactérias muito aglomeradas, apesar de nas imagens a preto e branco não ser muito evidente. No entanto existiam pontos dispersos corados a púrpura, que identificavam as Gram-positivas, representadas, na imagem, pelas setas (1), (2) e (3). A predominância das bactérias Gram-negativas manteve-se até ao final da monitorização do reator. Tanto as bactérias formadoras de flocos como as bactérias filamentosas eram Gram-negativas na sua maioria. Assim, os microrganismos presentes no reator são potenciais produtores de PHA, uma vez que reagem à coloração de Gram (Khanna *et al.*, 2005).

3.1.1.3. AZUL DO NILO

A coloração com Azul do Nilo apenas começou a ser realizada no 14^o dia de monitorização microscópica. As amostras retiradas nesse dia demonstram pouca fluorescência. As Figuras 3.5 a), b) e c) constituem a mesma imagem, uma sem fluorescência, outra com fluorescência representada a preto e branco e uma terceira com fluorescência vermelha, respetivamente.

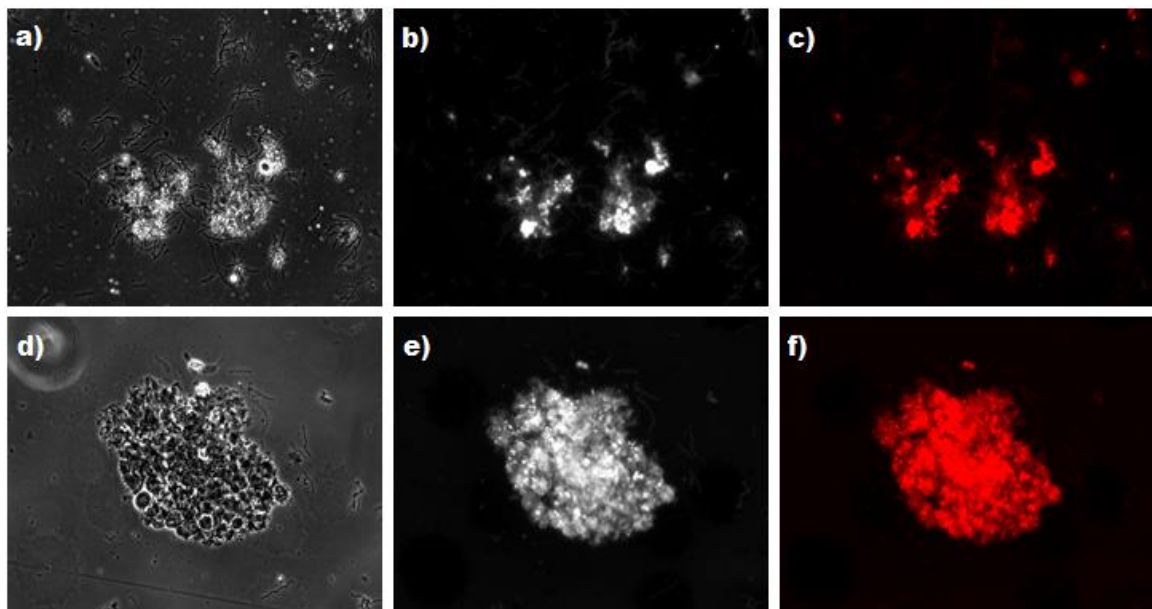


FIGURA 3.5 - IMAGENS DE FLUORESCÊNCIA COM O CORANTE AZUL DO NILO: A) SEM FLUORESCÊNCIA, B) COM FLUORESCÊNCIA, A PRETO E BRANCO E C) COM FLUORESCÊNCIA VERMELHA (REAL), RESPEITANTES AO 14^o DIA DE MONITORIZAÇÃO; D) SEM FLUORESCÊNCIA, E) COM FLUORESCÊNCIA A PRETO E BRANCO E F) COM FLUORESCÊNCIA VERMELHA (REAL), RESPEITANTES AO 28^o DIA DE MONITORIZAÇÃO. AMPLIAÇÃO 400X.

Tal facto era já esperado, uma vez que, como se trata de um reator de seleção de cultura, é necessário que os consórcios de microrganismos presentes no reator se adaptem às condições impostas, que estavam direcionadas para selecionar microrganismos capazes de acumular PHA. No 28º dia de monitorização (Figura 3.5 d), e) e f)) já se nota uma fluorescência muito maior. A imagem mostra os grânulos, bem salientes, no interior dos flocos e ainda dá para perceber que nem todas as bactérias formadoras de flocos apresentavam grânulos de PHA no seu interior. Tal facto deve-se ao estado de adaptação em que cada célula se encontrava. Como era de esperar, numa fase inicial é normal que a sua capacidade para acumular o biopolímero não seja elevada, daí a observação de poucos grânulos fluorescentes, após 14 dias. Com o passar do tempo era suposto que a fluorescência comesse a aumentar, o que se verificou ao fim de 28 dias. Como o reator apenas funcionou durante mais 2 semanas, sensivelmente as amostras que se observaram não apresentaram uma evolução quantitativa muito significativa de fluorescência, o que denota que os microrganismos presentes no reator ainda se estavam a adaptar às condições impostas, não chegando a atingir um estado estacionário. Contudo, um dos objetivos do funcionamento deste reator foi atingido, uma vez que se conseguiu visualizar grânulos de PHA no interior dos microrganismos e portanto, significa que estaria a haver uma seleção de consórcios de indivíduos capazes de produzir biopolímero, partindo de uma cultura mista.

3.1.1.4. PRESENÇA DE EPS

Para a visualização de presença de EPS foi utilizado como corante a tinta-da-china. Com este método o que se pretendia era detetar se estava a haver produção de material polimérico extracelular por parte das células.

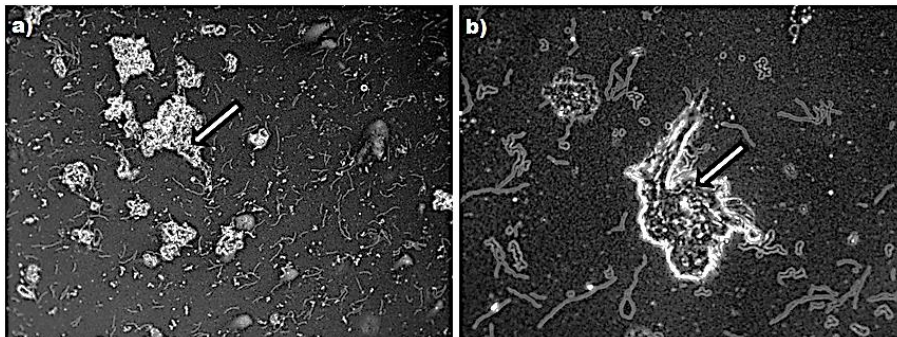


FIGURA 3.6 – IMAGENS COM COLORAÇÃO NEGATIVA PARA EPS, RETIRADA AO REATOR NO: A) 14º DIA (AMPLIAÇÃO 100X) E B) 28º DIA (AMPLIAÇÃO 400X).

Começou por se realizar esta técnica todos os dias em que era retirada amostra ao reator, mas o que se constatou foi que os resultados eram sempre equivalentes, pelo que se alargou o período de realização deste método para apenas uma vez de duas em duas semanas. A Figura 3.6 é representativa de que não estava a ser produzido EPS pelas bactérias. Nos locais das setas da imagem é visível a existência de tinta no interior dos flocos, pelo que não existia EPS em torno do floco. Se tal existisse não permitiria a entrada de tinta-da-china para o interior dos flocos. Este facto indicia que as bactérias não estavam a produzir EPS e portanto poderiam estar a produzir PHA, uma vez que estas apenas produzem um tipo de polímero. Tal resultado é muito importante no funcionamento dos reatores SBR na medida em que está relacionado com a sedimentabilidade das lamas – ausência de EPS indica boa sedimentabilidade das lamas, quando não há outros fatores a interferir, como é o caso das espumas.

3.1.1.5. AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO MICROBIOLÓGICO

De acordo com os resultados apresentados anteriormente, pode-se afirmar que o reator SBR 1, apesar de ter durado apenas 31 dias, devido à perda da sua biomassa, estava a apresentar uma evolução positiva no que diz respeito tanto à formação de grânulos de PHA armazenados no interior das células como ainda à evolução da maturidade da cultura (formação de flocos maiores e mais maduros). O processo de seleção de microrganismos evidenciou, maioritariamente, a predominância de Gram-negativos, capazes de produzir biopolímero, partindo de uma cultura mista com inúmera diversidade e em que não foi detetável a presença de EPS. Caso este reator se tivesse mantido em funcionamento durante mais tempo, poderia ter sido um potencial selecionador de cultura capaz de produzir grandes quantidades de PHA. Ainda foi possível realizar um ensaio de acumulação de biopolímeros com esta cultura, apesar de se considerar que ainda não estaria totalmente madura.

3.1.2. SBR 2

O reator SBR 2 teve início no dia 13 de Março de 2013, continuando ativo até à data. Foram retiradas 17 amostras em 70 dias de operação, realizando os mesmos métodos e a mesma periodicidade de amostragem que no reator anterior para a caracterização dos consórcios de microrganismos presentes no SBR 2.

As lamas inoculadas no reator SBR 2 foram visualizadas ao microscópio, por forma a identificar os microrganismos que estavam inicialmente presentes e quais os que se desenvolveram durante o funcionamento do reator. A Figura 3.7 apresenta os vários indivíduos que se detetaram, por observação direta, ao microscópio.

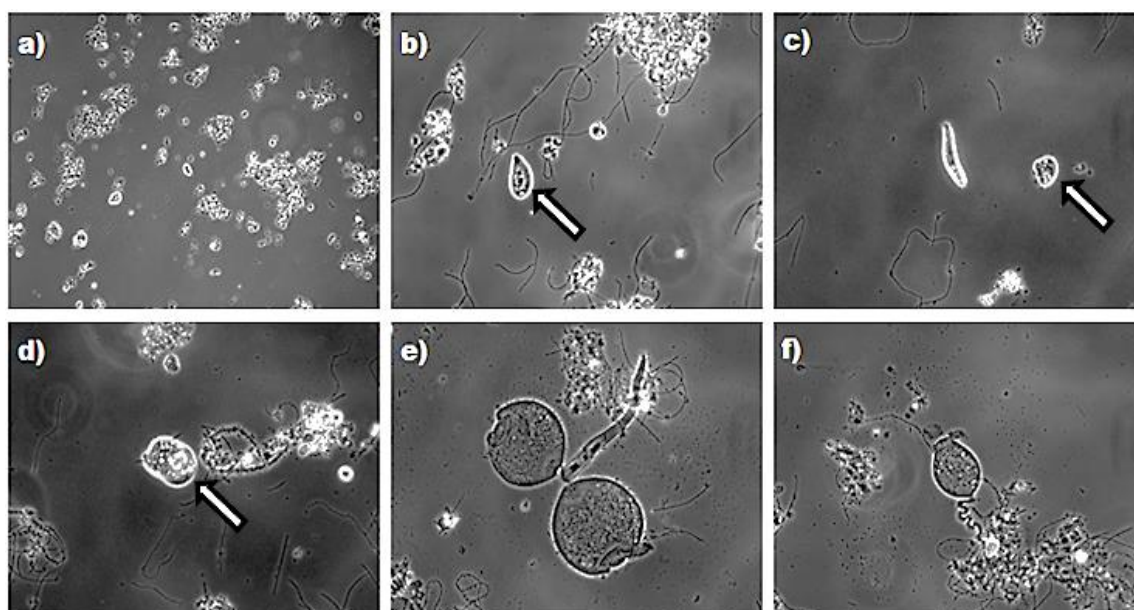


FIGURA 3.7 – MICROFAUNA EXISTENTE NAS LAMAS INOCULADAS NO REATOR SBR 2, PROVENIENTES DA ETAR DA PRIO – AVEIRO; A) AMPLIAÇÃO 100X; B), C), D), E) E F) AMPLIAÇÃO 400X.

Estas lamas tinham grande diversidade de protozoários e pequenos flagelados, para além de conterem alguns flocos e elevado número de bactérias filamentosas. Na Figura 3.7 a) está representado apenas o aspeto geral das lamas de inoculação, com alguns pequenos flagelados, flocos e bactérias filamentosas, enquanto nas restantes, são focados vários tipos de protozoários. O *Trachelophyllum pusillum*, identificado na Figura 3.7 b) foi visualizado em grande número nesta amostra. Apresenta uma coroa de flagelos na parte frontal e pertence aos protozoários ciliados nadadores, muito comuns em sistemas convencionais de lamas ativadas. Outro protozoário do mesmo tipo, que apareceu na amostra, foi o *Euplotes sp.*, identificado, com a seta, na Figura 3.7 c). Como representante dos ciliados residentes da

Caracterização Microbiológica de Reatores SBR para Produção de PHA

Universidade de Aveiro

superfície dos flocos, que contribuem para a regular forma destes, apareceu o *Aspidisca costata*, identificado na Figura 3.7 d). Na Figura 3.7 e) foi identificada a *Zoothamnium sp.*, em que os dois indivíduos partilham do mesmo pedúnculo. Por fim, apareceu uma das espécies mais vulgares em sistemas deste género, a *Vorticella sp.*, com o pedúnculo em forma de mola, que permite o seu movimento, quando estimulado por alguma situação. As lamas apresentavam assim elevada diversidade de microrganismos e, por conseguinte, a possibilidade de ter uma boa comunidade produtora de PHA é maior.

3.1.2.1. OBSERVAÇÃO DIRETA

As amostras analisadas do reator SBR 2 apresentaram uma vasta variedade de microrganismos, característicos dos tratamentos biológicos. De entre a multiplicidade encontrada estavam diversos tipos de protozoários, bactérias formadoras de flocos e alguns tipos de bactérias filamentosas, específicos do sistema de lamas ativadas. A Figura 3.8 apresenta a evolução da cultura ao longo do tempo de operação do reator, sendo a última no último dia do período de amostragem para este estudo.

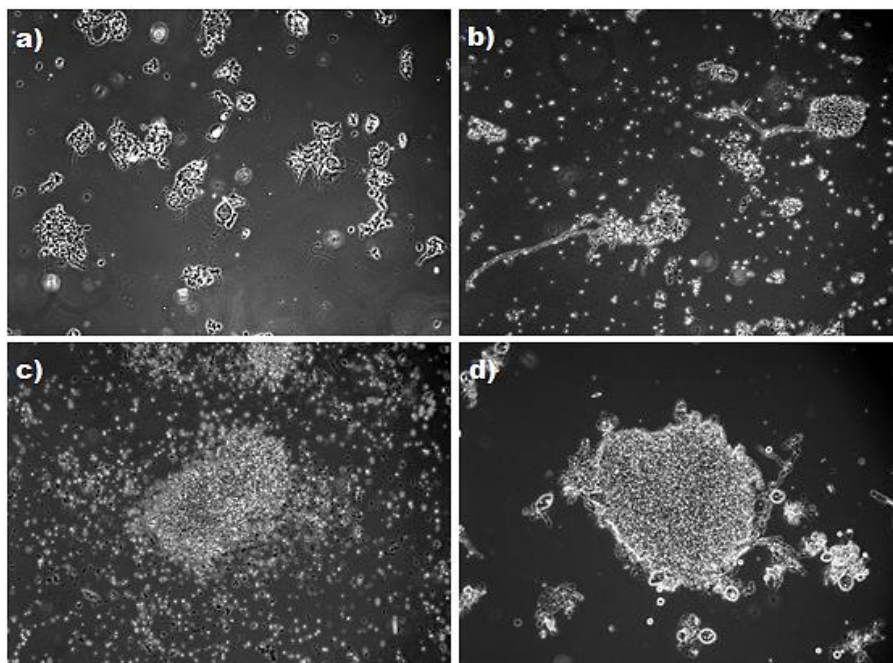


FIGURA 3.8 – EVOLUÇÃO GERAL DA CULTURA DO SBR 2 AO LONGO DO TEMPO; IMAGENS CAPTADAS NO DIA: A) 2º DIA; B) 23º DIA; C) 33º DIA E D) 61º DIA. AMPLIAÇÃO 100X.

Como é possível observar na Figura 3.8, no início de operação do reator SBR 2 o tamanho e quantidade dos flocos eram reduzidos. Com o passar do tempo foi visível o seu crescimento,

tendo os flocos ficado mais densos e bem estruturados, apresentando formas mais regulares e definidas, em parte devido ao papel fundamental de suporte das bactérias filamentosas. Na segunda amostra retirada ao reator (Figura 3.8 a)), que ocorreu no dia 15 de Março, 2 dias após o início de operação, os protozoários que foram observados no primeiro dia já não se encontravam presentes, por não se terem adaptado às condições de operação dos reatores.

No 23º dia de operação ao SBR 2, 5 de Abril, as réplicas observadas ao microscópio mostraram duas *Vorticella sp.*, com o pedúnculo preso a um floco, como se pode visualizar na Figura 3.9 a). Estes ciliados sésseis são característicos de uma fase transitória, entre a fase de início de colonização até à estabilização do sistema. São indicadores de reduzida concentração de oxigénio no reator e da fraca qualidade do efluente.

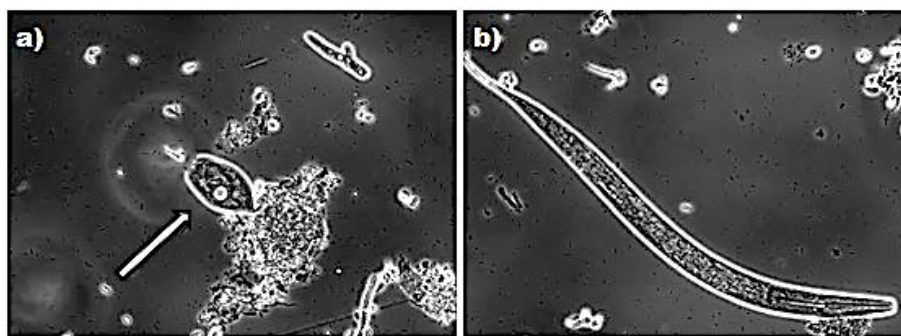


FIGURA 3.9 – IMAGEM DO: A) PROTOZOÁRIO *VORTICELLA SP.*, CAPTADA NO 23º DIA E B) NEMATODE, CAPTADO NO 26º DIA.
AMPLIAÇÃO 400X.

Ao longo do tempo, a diversidade da microfauna observada foi sendo cada vez maior. No 26º dia de operação observaram-se nematodes na amostra retirada do reator, como se pode verificar na Figura 3.9 b). Tal situação esteve relacionada com o fraco arejamento, devido a problemas com o sistema de difusão de ar, que foram solucionados assim que detetados. No 28º dia as réplicas mostraram grandes quantidades de flagelados (Figura 3.10 a)). Tal acontecimento foi relacionado com elevadas concentrações de SST que se verificaram no interior do reator. Estes valores poderão estar relacionados com o facto de, nesse dia, a alimentação ter sido preparada a partir de um efluente acidificado que apresentou maior concentração de sólidos suspensos totais. Durante os dias seguintes a diversidade microbiológica no reator diminuiu significativamente, tendo sido posteriormente reposta.

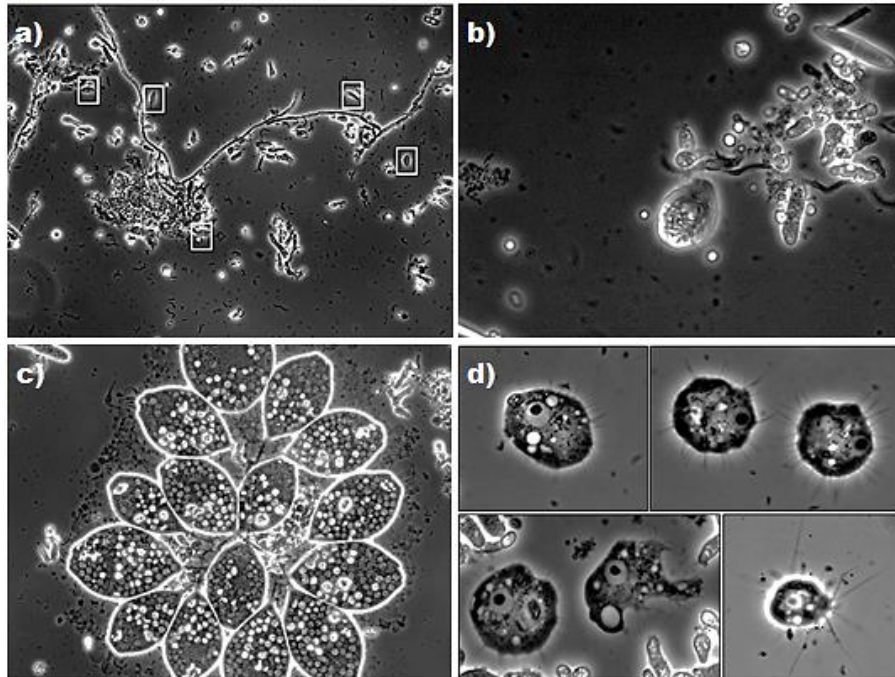


FIGURA 3.10 – IMAGENS DE: A) PRESENÇA DE GRANDE QUANTIDADE DE PEQUENOS FLAGELADOS, NO 28º DIA; B) *EUPLOTES SP.*, NO 35º DIA; C) COLÓNIA DE *OPERCULARIA SP.*, NO 40º DIA E D) *NUCLEARIA AMOEBEA*, NO 40º DIA. AMPLIAÇÃO 400X.

No 19º dia de monitorização ao SBR 2, foram detetados vários indivíduos da espécie *Euplotes sp* (Figura 3.10 b)). Este protozoário móvel de fundo é indicativo de efluentes de boa qualidade. No 24º dia surgiram vários aglomerados de protozoários do tipo *Opercularia sp.* (Figura 3.10 c)), normalmente associados à má qualidade do efluente final, no que diz respeito aos níveis de CQO. O seu crescimento é favorecido para baixos valores de oxigénio dissolvido. Nesse mesmo dia apareceram uns microrganismos denominados de *Nuclearia amoeba* (Figura 3.10 d)), pertencente às amebas, que são indicatoras de baixas cargas orgânicas e boa eficiência de tratamento. Como o valor de CQO à saída do efluente era muito baixo, o aparecimento destes indivíduos não foi relacionado com nenhum fator físico que tivesse ocorrido no reator.

No que diz respeito às bactérias filamentosas, estas tiveram um aparecimento gradual ao longo do tempo. Inicialmente, como era de esperar, as réplicas visualizadas ao microscópio não apresentavam grandes quantidades destes microrganismos. No entanto, com o desenvolvimento da microfauna no interior do reator, indo ao encontro de uma seleção de microrganismos produtores de PHA, estas foram surgindo de um modo muito diversificado. Na amostra inicial, as bactérias filamentosas presentes no reator eram principalmente as *Microthrix parvicella* (Figura 3.11 a)), características de lamas ativadas com idade elevada, provenientes das lamas que foram usadas como inóculo do reator. No 2º dia de operação

eram visíveis *Nocardioformes actinomycete sp.*, *Gordona amarae* (Figura 3.11 b)), características de episódios de *foaming*. No entanto a quantidade destas bactérias filamentosas não era significativa para que fosse considerada alarmante. Estes dois tipos de bactérias filamentosas são das mais vulgarmente encontradas em sistemas de lamas ativadas (Gerardi, 2006).

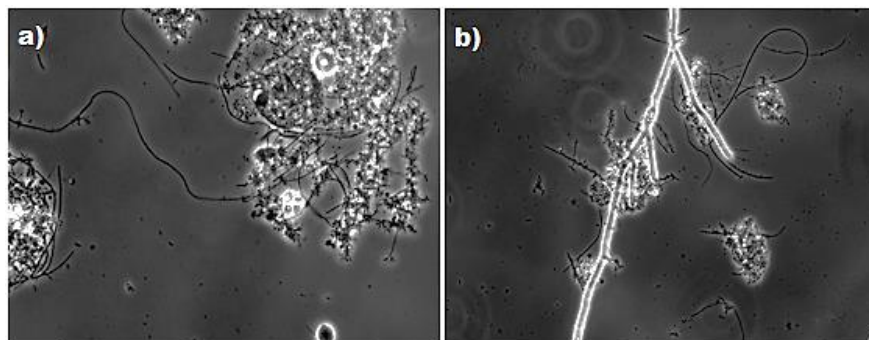


FIGURA 3.11 – IMAGENS CAPTURADAS NO 2º DIA APÓS O ARRANQUE DO SBR 2, CONTENDO: A) *MICROTHRIX PARVICELLA* E B) *GORDONA AMARAE*. AMPLIAÇÃO 400X.

No segundo dia de operação do reator outra espécie filamentosa apareceu no rastreio feito às várias réplicas. Na Figura 3.12 a) está representada a *Sphaerotilus natans*, observada na amostra de 15 de Março. Esta espécie pode conter poli- β -hidroxibutirato (PHB) como reserva e é bastante resistente a uma vasta gama de valores de oxigénio dissolvido. No 21º dia de monitorização ao SBR 2, 3 de Abril, surgiu uma nova espécie de bactérias filamentosas: a *Thiothrix I* (Figura 3.12 b)), outra das espécies que pode acumular PHB. No dia 3 de Maio, 51º dia de monitorização ao SBR 2 foi detetada a espécie *Beggiatoa sp.* (Figura 3.12 c)), que, normalmente, é indicadora de presença de sulfuretos no meio (Richard, 1989).

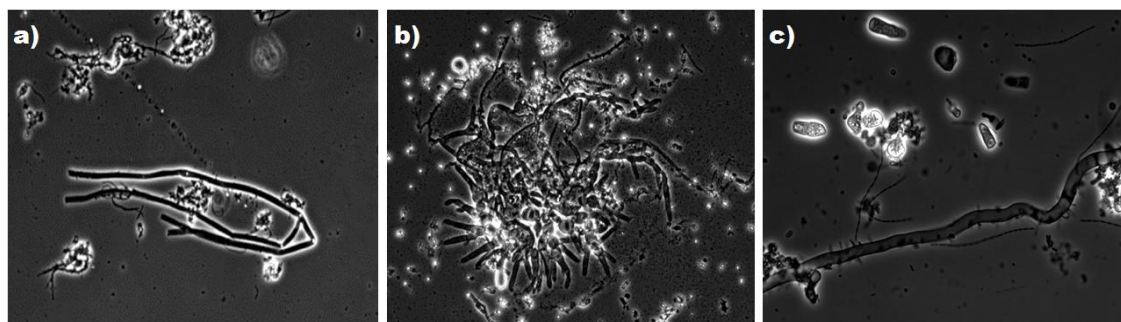


FIGURA 3.12 – IMAGENS DA ESPÉCIE: A) *SPHAEROTILUS NATANS*, NO 2º DIA; B) *THIOTHRIX I*, NO 21º DIA E C) *BEGGIATOA SP.*, NO 51º DIA. AMPLIAÇÃO 400X.

3.1.2.2. CONTAGEM DE PROTOZOÁRIOS E PEQUENOS FLAGELADOS

Durante o período de amostragem ao SBR 2, a contagem de protozoários e pequenos flagelados apenas foi efetuada a partir do 28º dia de monitorização, uma vez que apenas nesse dia foi recebida a Câmara de Neubauer. A contagem, seguindo o método descrito na secção 2.2 permitiu a quantificação de várias espécies de protozoários e pequenos flagelados, para posteriormente se proceder ao cálculo do índice IBL.

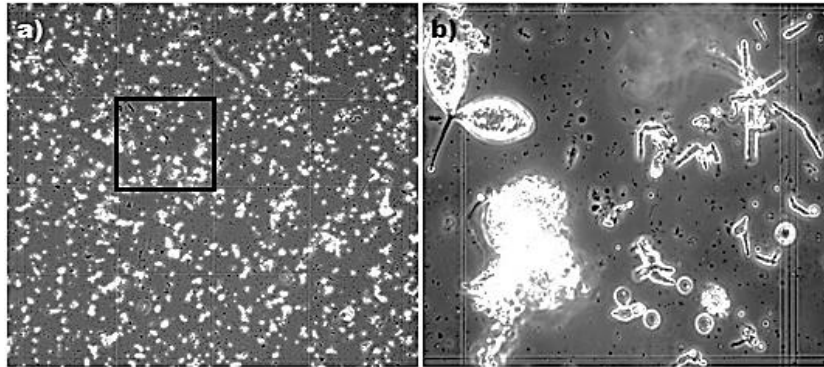


FIGURA 3.13 – IMAGENS AO MICROSCÓPIO DA VISUALIZAÇÃO EM CÂMARA DE NEUBAUER: A) A 100x, REPRESENTANDO TODO O QUADRANTE E B) A 400x, REPRESENTANDO UM DOS QUADRADO DOS 16 EXISTENTES EM CADA UM DOS QUADRANTES.

No caso dos protozoários não foi feita a contagem de cada espécie separadamente, apenas foi contabilizado o total de protozoários e, pela observação direta da amostra concluiu-se qual a espécie destes indivíduos que se encontrava em maior número. Este fator é bastante importante para o cálculo posterior do IBL, uma vez que este depende do grupo dominante visualizado nas contagens. Relativamente aos pequenos flagelados, a sua contagem foi feita detalhadamente. Estes foram rastreados nos 16 quadrados dos 4 quadrantes utilizados para contagem de células de maior tamanho. Foi uma contagem morosa, que apresentou algumas limitações, o que interferiu na exatidão da contagem. O facto de terem sido contados os pequenos flagelados *in vivo*, através de uma câmara, que apenas nos permitia visualizar partes do campo individualmente, levou a situações em que não se sabia ao certo se um determinado indivíduo já tinha sido ou não contabilizado, uma vez que se movimentavam muito rápido. Foi necessário fazer várias contagens, o que demorou bastante tempo em cada amostra. Esta contagem foi posteriormente utilizada para o cálculo do Índice Biótico das Lamas (IBL).

3.1.2.3. ÍNDICE BIÓTICO DE LAMAS

O Índice Biótico de Lamas (IBL) das lamas do SBR 2 foi determinado, a partir da contagem de protozoários e pequenos flagelados, que se iniciou no 28º dia desde o arranque do reator. A partir de então, houve um acompanhamento regular na contagem destes indivíduos, cuja informação se encontra sob forma de gráfico na Figura 3.14.

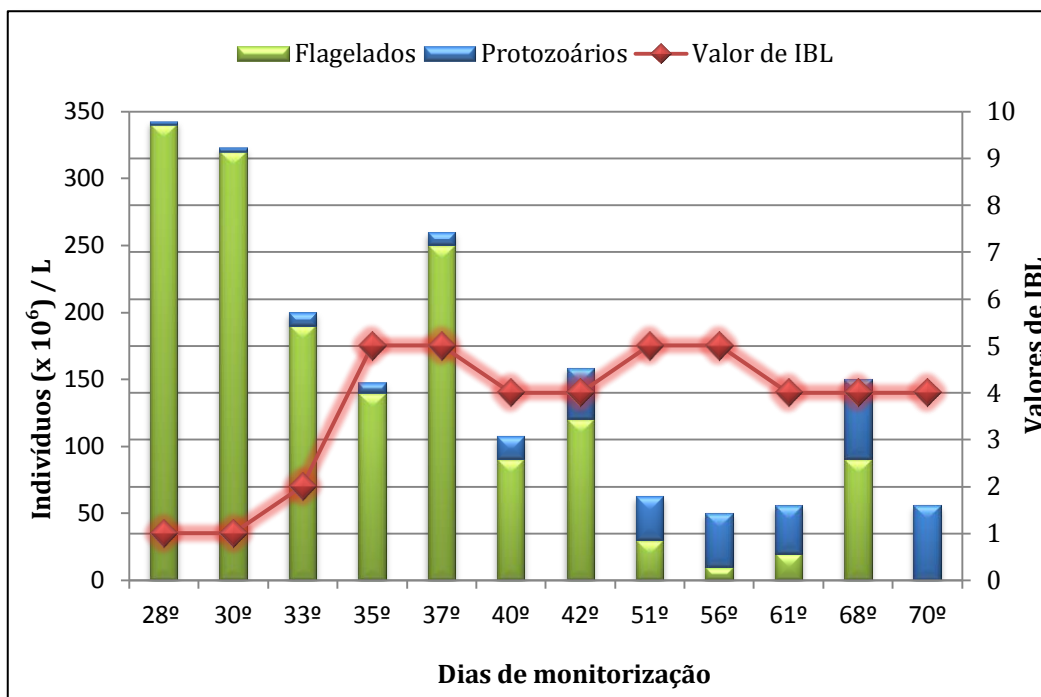


FIGURA 3.14 – EVOLUÇÃO DA QUANTIDADE DE FLAGELADOS E PROTOZOÁRIOS EXISTENTES, POR LITRO E VALOR DE IBL, AO LONGO DO TEMPO.

A quantidade de pequenos flagelados, a partir do dia 10 de Abril, dia em que houve um surgimento imprevisto destes microrganismos, foi sempre diminuindo. Repare-se que o valor do IBL está diretamente relacionado com a quantidade dos flagelados existentes no reator. Se o aparecimento destes microrganismos indica fraca eficiência no tratamento, o IBL não pode ter valores elevados. Desta forma, para os 3 primeiros dias de contagem o valor de IBL não ultrapassou o valor de 2, correspondendo à classe IV, seguindo o cálculo proposto no Capítulo 2, Tabela 2.2. Nos restantes dias de amostragem deparamos com uma diminuição de flagelados e o número do IBL começou a aumentar, representando a Classe III. Ambas as classes referidas anteriormente representam uma eficiência depuradora baixa a medíocre, respetivamente, e uma atividade biológica muito baixa a insuficiente, respetivamente, mas para sistemas de tratamento clássicos. Embora o valor do IBL tenha aumentado com o tempo, não chegou a atingir valores que correspondessem a lamas colonizadas e com boas atividades

Caracterização Microbiológica de Reatores SBR para Produção de PHA

Universidade de Aveiro

depuradoras. Tal situação poderá estar relacionada com o facto de estarmos a impor condições ao reator, para seleccionar uma cultura produtora de PHA, eliminando os microrganismos que mais influenciam o aumento do valor de IBL, como sejam os ciliados móveis de fundo. Estes ciliados móveis de fundo não estão em elevadas quantidades no reator, uma vez que dependem da carga orgânica. Uma elevada carga orgânica faz com que estes indivíduos se extingam. É também evidente, através da Figura 3.14 que a quantidade de protozoários veio a aumentar bastante ao longo do tempo de amostragem referido, com a consequente diminuição de flagelados.

3.1.2.4. COLORAÇÃO DE GRAM

Durante o período de monitorização do SBR 2 foi também realizada coloração de Gram. Na Figura 3.15 estão imagens obtidas de algumas amostras preparadas, segundo o método descrito na secção 2.4.

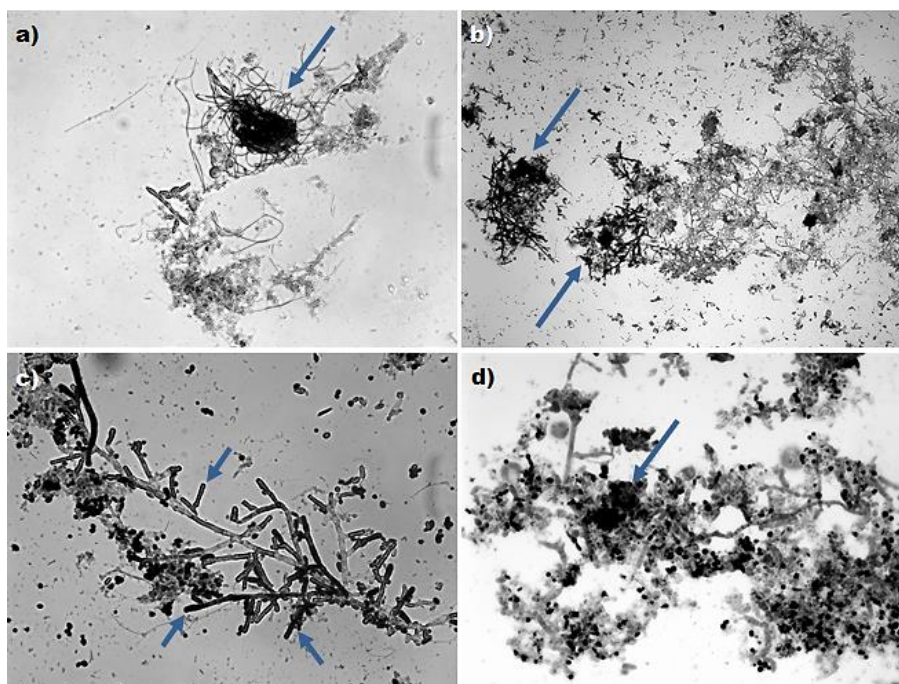


FIGURA 3.15 – IMAGENS RETIRADAS NO DIA: A) E B) 2º DIA (AMPLIAÇÃO 100X); C) 7º DIA (AMPLIAÇÃO 400X) E D) 40º DIA (AMPLIAÇÃO 400X), IDENTIFICANDO ALGUMAS BACTÉRIAS FILAMENTOSAS GRAM-POSITIVAS (SETAS AZUIS).

No início do reator foram coradas as amostras para ver qual o tipo de bactérias que predominavam no inóculo. Os microrganismos predominantes foram os Gram-negativos, com existência de alguns, mas em menor quantidade, Gram-positivos. A Figura 3.15 a) representa

a filamentosa *Microthrix parvicella* corada de púrpura. Este microrganismo, Gram-positivo, foi um dos mais abundantes, conjuntamente com Nocardioformes, também Gram-positivos, identificados na Figura 3.15 b). Apesar dos Nocardioformes serem Gram-positivos, a Figura 3.15 c) mostra uma destas filamentosas com as ramificações exteriores coradas a púrpura e o seu interior corado a vermelho. Portanto devem ser denominadas de Gram-variáveis, uma vez que combinam as duas colorações (Spigoni *et al.*, 1992). Tal acontecimento deve-se ao facto de existirem outras bactérias sésseis em torno do filamento, que impedem o corante de penetrar completamente. O mesmo se verifica na Figura 3.15 d). A identificação da presença deste tipo de bactérias filamentosas ao longo do tempo de operação do reator explica a contínua presença de espuma à superfície do SBR 2. Outro caso de filamentosas que se apresentam como Gram-negativas devido à presença de bactérias sésseis à sua volta é a filamentosa do tipo 0041, como mostra a Figura 3.16. Nesta mesma figura, em b), está representada uma bactéria filamentosa, Gram-negativa: a *Haliscomenobacter hydrossis*.

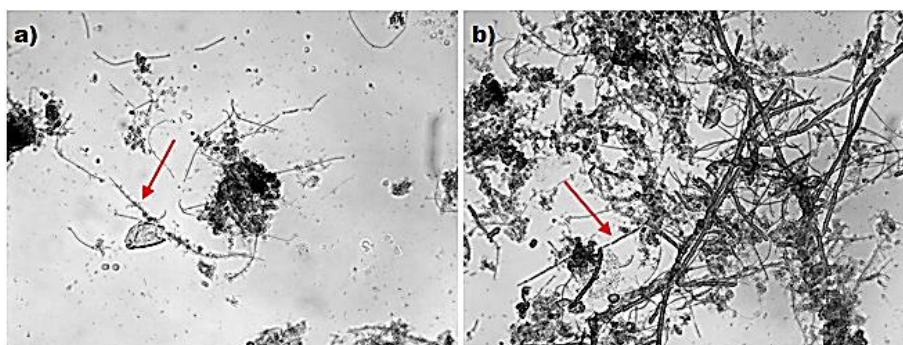


FIGURA 3.16 – IMAGENS RETIRADAS NO 2º DIA, IDENTIFICANDO BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS: A) TIPO 0041 (AMPLIAÇÃO 100X) E B) *HALISCOMENOBACTER HYDROSSIS* (AMPLIAÇÃO 400X).

Ao longo da monitorização da biodiversidade, utilizando o método de coloração de Gram, detetou-se que houve sempre uma dominância das bactérias Gram-negativas face às Gram-positivas. É de igual importância referir que não foram observadas, em nenhum momento da monitorização, quantidades excessivas de um grupo dominante de bactérias filamentosas.

Relativamente aos flocos, estes eram Gram-negativos, em todas as amostras observadas. O que é importante referir é que nas fotos onde há presença de flocos corados, estes aparecem sob forma de manchas negras, parecendo evidenciar coloração púrpura, pelo que não foram colocadas imagens da coloração dos flocos.

3.1.2.5. AZUL DO NILO

Para ir ao encontro do grande objetivo desta dissertação, que se prende com a acumulação de PHA por culturas microbianas mistas, foi realizado, continuamente, o método com o corante Azul do Nilo, para identificar grânulos de PHAs no interior das células, método esse descrito na secção 2.5. A Figura 3.17 apresenta uma evolução temporal da acumulação intracelular de grânulos de PHA no reator SBR 2.

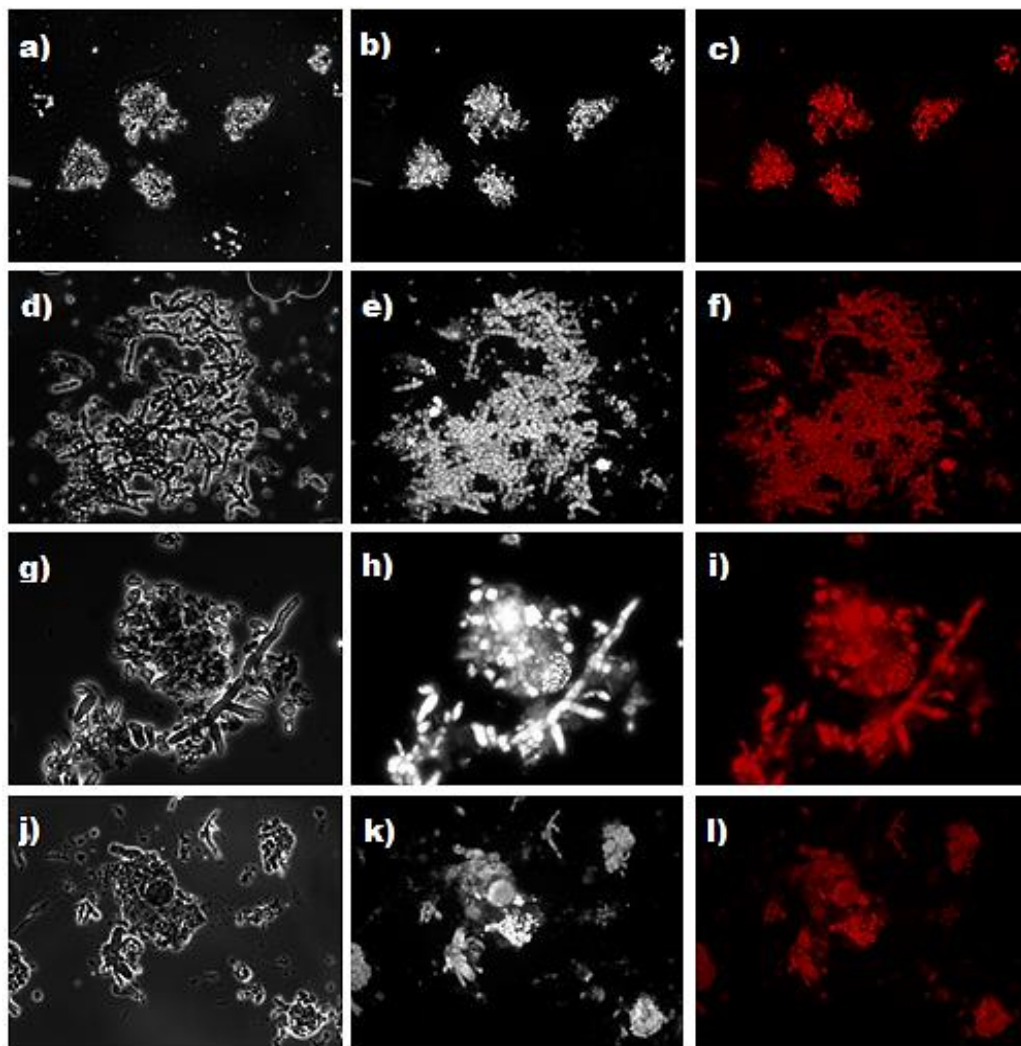


FIGURA 3.17 – IMAGENS DE GRÂNULOS DE PHA OBSERVADOS POR MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCÊNCIA APÓS COLORAÇÃO COM AZUL DO NILO, AO LONGO DO TEMPO: A), B) E C) 12º DIA; D), E) E F) 26º DIA; G), H) E I) 40º DIA E J), K) E L) 56º DIA (AMPLIAÇÃO 400x).

No início da aplicação da coloração de Azul do Nilo para a monitorização da presença de grânulos de PHA no interior das células não foram detetadas grandes quantidades de fluorescência, uma vez que nesta etapa a cultura estava numa fase de adaptação às condições impostas ao reator. Apesar das imagens apresentadas apresentarem grandes áreas vermelhas, apenas os pontos mais fortes são pontos de fluorescência, daí a necessidade de

colocar as três imagens em diferentes visualizações, percebendo melhor desta forma quais os pontos que representam grânulos de PHA.

Com os repetidos ciclos de “fome”/“fartura” ao longo do tempo, os grânulos de PHA no interior das células foram sendo cada vez em maior número, como é visível na Figura 3.17 c), f) e i). No entanto, nas últimas visualizações as amostras parecem não ter grandes quantidades de grânulos. Desde o dia 22 de Abril até ao dia 8 de Maio houve uma diminuição na intensidade de fluorescência. Esse período, como foi visto na Figura 3.14, coincidiu com a diminuição dos pequenos flagelados existentes nas amostras e com o grande aumento dos protozoários. Esta tendência poderá ser indicadora de que a cultura não estava estável e não estavam a ser selecionados os microrganismos produtores de PHA. Para confirmar este resultado seria necessário recorrer à cromatografia de gás, que permitiria determinar a concentração de biopolímero existente na biomassa do reator. Tal teste ainda não foi feito até à data por falta de equipamento específico.

3.1.2.6. PRESENÇA DE EPS

A análise da presença de EPS apenas foi realizada nos primeiros dias de operação ao reator, pelo que as imagens apresentadas não são representativas da evolução temporal.

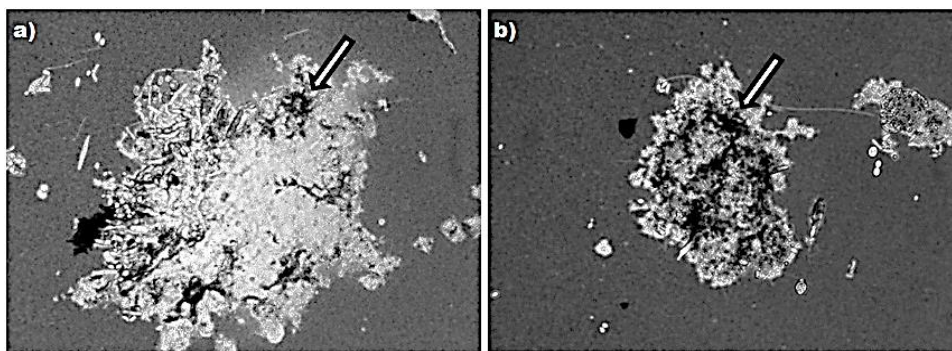


FIGURA 3.18 – IMAGENS RETIRADAS NO DIA: A) 5º DIA E B) 42º DIA, APÓS COLORAÇÃO COM TINTA-DA-CHINA (AMPLIAÇÃO 100X).

Efetuada o método de coloração referido na secção 2.6 foi possível obter as imagens microscópicas da Figura 3.18. Como o corante ultrapassou as fronteiras dos flocos e penetrou-os, podemos afirmar que não havia produção de EPS no momento da amostragem. Caso as bactérias estivessem a produzir tal polímero, este estaria em torno do floco impedindo a entrada das moléculas de carbono, originando uma auréola à sua volta, rodeado pelo corante, como é mostrado na Figura 1.11, da secção 1.4.6 do presente documento.

3.1.2.7. AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO MICROBIOLÓGICO

Relativamente aos resultados descritos anteriormente pode-se afirmar que o reator SBR 2 funcionou durante tempo suficiente para se retirarem algumas considerações conclusivas. A cultura presente no reator, Gram-negativa na sua quase totalidade, apresentou grande variedade de microrganismos e uma grande evolução na maturidade da cultura, onde se destacou o tamanho dos flocos nos últimos dias de monitorização. Neste reator não foi detetável a presença de EPS, mas foram detetáveis grânulos de PHA no interior das células. A evolução crescente não foi contínua, uma vez que a partir do 40º dia de monitorização do reator a intensidade de fluorescência foi diminuindo, indicando que a cultura não estava a ser devidamente selecionada. No entanto seriam necessários métodos cromatográficos para confirmar se de facto, a população estaria a produzir pouco biopolímero. Ainda assim foram realizados ensaios de acumulação com esta cultura microbiana.

3.1.3. AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE SELEÇÃO DE CULTURAS

Face aos resultados da fase de seleção de cultura, nas condições impostas, podemos referir algumas semelhanças e algumas diferenças no comportamento dos dois reatores estudados. Quer o reator SBR 1 como o SBR 2 apresentaram uma grande diversidade de microrganismos que se demonstraram importantes para as várias fases do processo de seleção. No entanto no reator SBR 2 foi visualizada maior diversidade, uma vez que este também esteve ativo durante muito mais tempo. A evolução da maturidade dos flocos foi visualizada em ambos de um modo semelhante. Relativamente às bactérias filamentosas observadas ao microscópio, a espécie *Microthrix parvicella* foi detetada em ambos os reatores, sendo uma espécie muito comum. A coloração de Gram permitiu definir que em ambos os reatores os microrganismos existentes eram Gram-negativos na sua maioria, pelo que se pode constatar que a diferente alcalinidade imposta em cada um dos reatores não interferiu no tipo de células que se desenvolveram. Apesar do reator SBR 1 ter operado durante pouco tempo, conseguiu-se visualizar alguma evolução na quantidade de grânulos de biopolímero intracelular. Pelo contrário, no reator SBR 2 a evolução da quantidade de grânulos intracelulares não foi sempre crescente, tendo-se notado uma diminuição perto da fase final de monitorização. Portanto, a cultura presente no primeiro reator parecia estar mais selecionada ou em melhores condições para o processo de produção de PHA. Quanto à presença de EPS, também não foi influenciada pela alcalinidade imposta a cada reator, pelo que não se visualizou, em nenhuma amostra de nenhum dos reatores, substância polimérica extracelular. De modo a

finalizar esta avaliação, caso o SBR 1 tivesse permanecido ativo, poder-se-ia dizer que este possuía uma cultura melhor selecionada para potencializar o processo de produção de PHA.

3.2. ACUMULAÇÃO DE PHAS EM REATORES *BATCH*

Os ensaios *Batch* (descontínuos) são independentes do funcionamento contínuo dos reatores SBR. Foram realizados em datas diferentes e tiveram como finalidade potencializar a acumulação de PHA, a partir da cultura mista previamente selecionada nos reatores SBR.

3.2.1. *BATCH 1*

O primeiro reator de acumulação, *Batch 1*, ocorreu no dia 13 de Maio (Tabela 2.2). A alimentação foi introduzida de uma única vez, deixando que os microrganismos utilizassem o substrato da forma mais espontânea possível, esperando pela resposta destes, através da monitorização ao longo do tempo. É importante referir que este ensaio foi o primeiro a ser concretizado e por conseguinte, para além de fornecer alguns resultados, também serviu para testar o seu funcionamento e ajudar a perceber qual o melhor procedimento para efetuar estes ensaios.

3.2.1.1. *OBSERVAÇÃO DIRETA*

A observação direta da amostra retirada no momento inicial do reator *Batch* apresentava características idênticas à população existente no reator de seleção (SBR 1). Verificou-se a existência de flocos bastante densos e regulares, algumas bactérias filamentosas, alguns protozoários e inexistência de pequenos flagelados. Na Figura 3.19 estão duas imagens obtidas da amostra inicial do *Batch 1*.

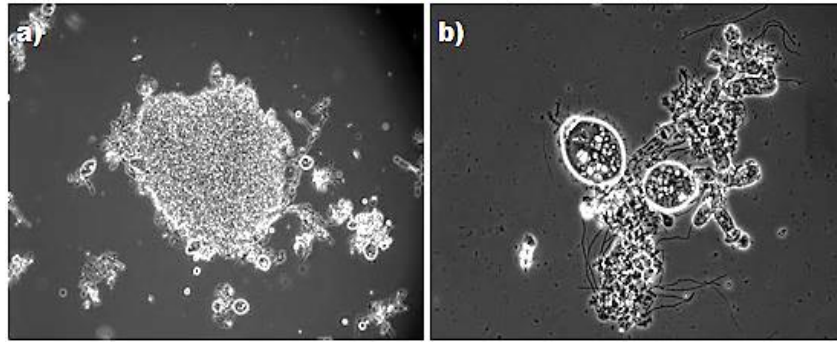


FIGURA 3.19 – IMAGENS CAPTADAS NO DIA 13 DE MAIO (1º ENSAIO *BATCH*), POR OBSERVAÇÃO DIRETA DA AMOSTRA: A) FLOCO BASTANTE ESTRUTURADO (AMPLIAÇÃO 100x) E B) PROTOZOÁRIOS E FILAMENTOSAS (AMPLIAÇÃO 400x).

A estrutura madura destes flocos (Figura 3.19 a)) reflete uma cultura desenvolvida, muito provavelmente no início de uma fase estável de desenvolvimento e com potencial para acumular PHA. Quanto aos protozoários e restantes microrganismos presentes neste reator são microrganismos resistentes aos ciclos de “fome” e “fartura”, que foram impostos na fase de seleção. Foram identificadas espécies de *Opercularia sp.*, *Nocardioformes* e filamentosas do Tipo 0092, para além das bactérias formadoras dos flocos.

3.2.1.2. AZUL DO NILO

A visualização com coloração Azul do Nilo permitiu identificar grânulos de PHA no interior dos microrganismos produtores do biopolímero. A Figura 3.20 mostra a evolução de fluorescência entre o momento da alimentação (Figura 3.20 a), b) e c)) e após 5h de funcionamento do ensaio descontínuo (Figura 3.20 d), e) e f)).

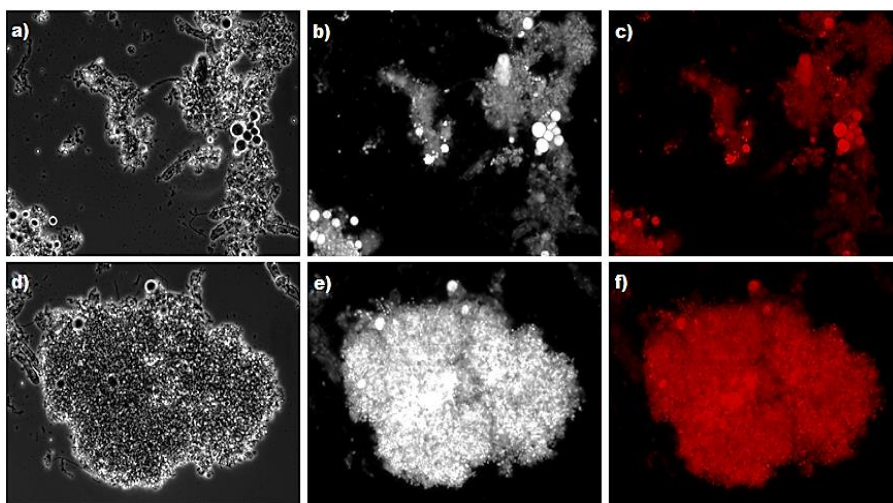


FIGURA 3.20 – IMAGENS DE GRÂNULOS DE PHA OBSERVADOS POR MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCÊNCIA APÓS COLORAÇÃO COM AZUL DO NILO: A), B) E C) MOMENTO DA ALIMENTAÇÃO E D), E) E F) 5H DEPOIS DA ALIMENTAÇÃO, REFERENTES AO *BATCH* 1 (AMPLIAÇÃO 400x).

No momento após ter sido introduzida toda a alimentação (Figura 3.20 a), b) e c)) é evidente a quantidade reduzida de pontos fluorescentes. Na imagem que representa a população do reator 5h depois da alimentação (Figura 3.20 d), e) e f)) é perceptível que a quantidade de grânulos de PHAs aumentou. Esta evolução é normal e era a esperada, uma vez que à medida que as bactérias vão consumindo o substrato introduzido no reator, vão acumulando reservas intracelulares e, desta forma, à medida que aumenta o tempo maior será a quantidade de polímero acumulado. Caso se deixe que o substrato seja totalmente utilizado, é de esperar que o PHA acumulado seja consumido pelos microrganismos, de modo a que estes sobrevivam à falta de fonte de carbono, pelo que é desejável fazer a extração do polímero antes que isso aconteça.

3.2.2. BATCH 2

O ensaio com o reator *Batch 2* ocorreu no dia 22 de Maio, em simultâneo com os reatores *Batch 3* e *Batch 4* (Tabela 2.2). A imagem seguinte (Figura 3.21) representa os três reatores *Batch* a funcionar em simultâneo. No *Batch 2* foram introduzidas lamas frescas (retiradas no mesmo dia do ensaio), enquanto no *Batch 3* e *4* foram introduzidas lamas que foram sendo guardadas de dias anteriores. Estes dois últimos são assim réplicas um do outro.

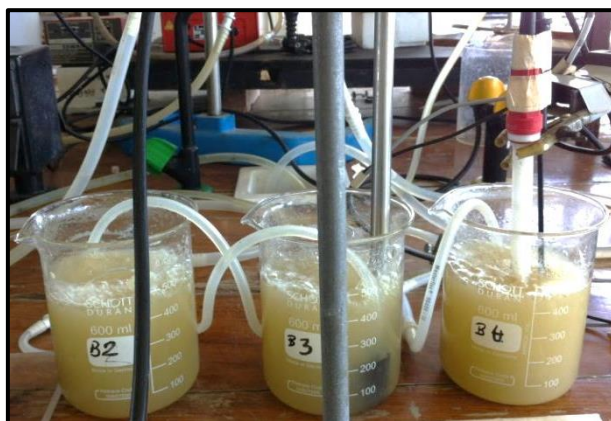


FIGURA 3.21 – IMAGEM TIRADA NO INÍCIO DOS ENSAIOS *BATCH 2*, *3* E *4*, NO DIA 22 DE MAIO.

Tal como no *Batch 1*, a alimentação no *Batch 2* foi introduzida de uma única vez. As lamas inoculadas neste reator eram lamas que foram retiradas do SBR 2 nesse mesmo dia em que o ensaio ocorreu.

3.2.2.1. OBSERVAÇÃO DIRETA

A observação direta das amostras retiradas ao reator ao longo do tempo (Figura 3.22) apresentou uma diminuição do tamanho dos flocos. Enquanto na 1ª amostra se apresentavam com uma forma idêntica aos flocos visualizados no reator SBR 2, nas restantes amostras os flocos eram pequenos e foram diminuindo de tamanho ao longo do tempo. Os aglomerados bacterianos podem ter sido destruídos por excesso de arejamento no reator *Batch*, que fez com que houvesse desagregação dos flocos.

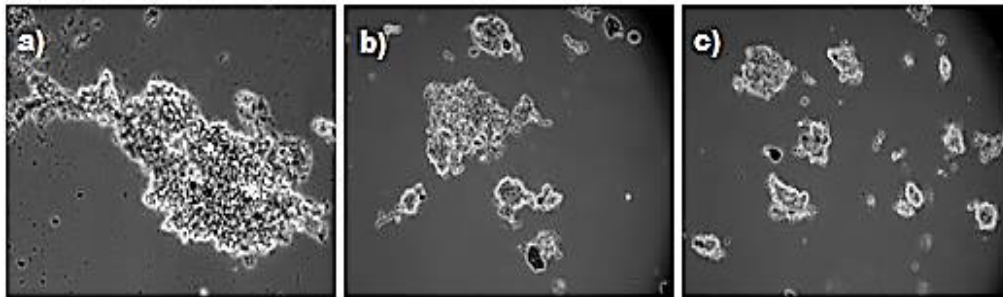


FIGURA 3.22 – IMAGENS OBSERVADAS AO MICROSCÓPIO REFERENTES AO *BATCH* 2, EM DIFERENTES PERÍODOS DO ENSAIO: A) 0,5H; B) 2,5H E C) 4,5H.

3.2.2.2. AZUL DO NILO

A visualização com coloração de Azul do Nilo permitiu identificar grânulos de PHA no interior dos microrganismos produtores do biopolímero. As fotos referentes ao início do processo de acumulação não são apresentadas pois houve um problema no programa instalado no computador acoplado ao microscópio e que permite gravar as imagens observadas e por isso não são apresentadas. No entanto dava para ver o reduzido número de pontos fluorescentes. Após 5h do início do ensaio foi perceptível verificar que a quantidade de grânulos de PHA era elevada. Esta evolução é normal e era a esperada, uma vez que à medida que as bactérias vão consumindo o substrato introduzido no reator, vão acumulando reservas intracelulares na forma de PHA.

3.2.3. BATCH 3

O ensaio descontínuo com o *Batch* 3 ocorreu em simultâneo com o *Batch* 2 e *Batch* 4, como mostra a Figura 3.21, com a única diferença de que as lamas introduzidas neste reator não eram lamas frescas, mas sim lamas que tinham vindo a ser guardadas dois dias antes do ensaio ter sido realizado.

3.2.3.1. OBSERVAÇÃO DIRETA

Pela observação direta das amostras retiradas ao reator ao longo do tempo foi possível detectar alguma diversidade de bactérias filamentosas (Figura 3.24) e a diminuição progressiva dos flocos, tal como aconteceu no *Batch 2*.

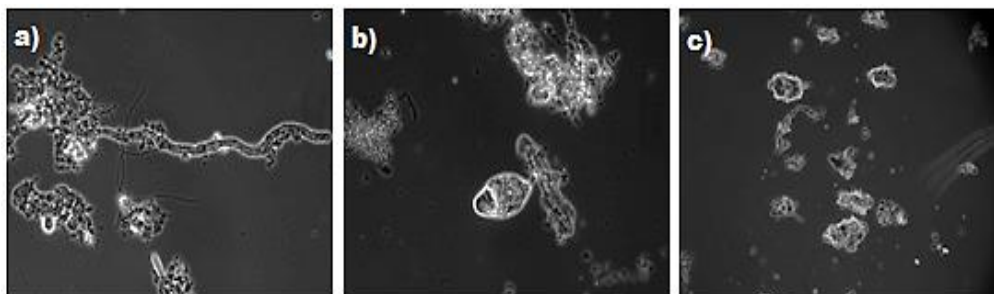


FIGURA 3.23 - IMAGENS OBSERVADAS AO MICROSCÓPIO REFERENTES AO *BATCH 3*, EM DIFERENTES PERÍODOS DO ENSAIO: A) 0,5H; B) 2,5H E C) 4,5H.

3.2.3.2. AZUL DO NILO

A visualização das amostras previamente coradas com Azul do Nilo permitiu identificar grânulos de PHAs no interior dos microrganismos produtores do biopolímero. A Figura 3.25 mostra a evolução de fluorescência entre o momento da alimentação e após 5h de operação.

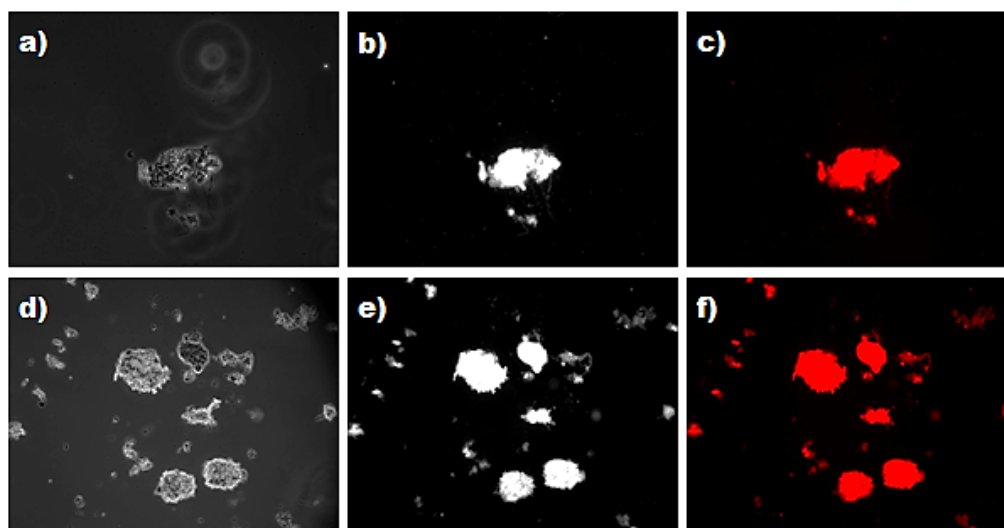


FIGURA 3.24 – IMAGENS DE GRÂNULOS DE PHA OBSERVADOS POR MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCÊNCIA APÓS COLORAÇÃO COM AZUL DO NILO: A), B) E C) NO PRIMEIRO MOMENTO DE AMOSTRAGEM, D), E) E F) NO ÚLTIMO MOMENTO DE AMOSTRAGEM, REFERENTES AO *BATCH 3*.

Inicialmente (Figura 3.24 a), b) e c)) é evidente a quantidade mais reduzida de pontos fluorescentes, comparativamente com as imagem d), e) e f). Na imagem que representa a população do reator 5h depois da alimentação é perceptível que a quantidade de grânulos de

PHA é elevada. Esta evolução expectável demonstra que os ensaios de acumulação de PHA a partir de soro acidificado foram bem-sucedidos.

3.2.4. BATCH 4

3.2.4.1. OBSERVAÇÃO DIRETA

O ensaio com o reator *Batch 4* foi análogo ao ensaio *Batch 3*, referido anteriormente. Pela observação direta das amostras retiradas ao reator ao longo do tempo foi possível detetar também bastante variedade de microrganismos, tal como no *Batch* anterior.

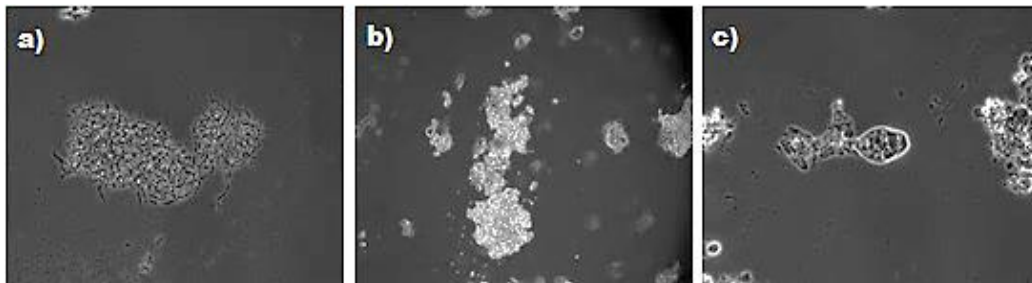


FIGURA 3.25 - IMAGENS OBSERVADAS AO MICROSCÓPIO REFERENTES AO *BATCH 4*, EM DIFERENTES PERÍODOS DO ENSAIO: A) 0,5h; B) 2,5h E C) 4,5h.

3.2.4.2. AZUL DO NILO

A visualização com coloração com Azul do Nilo permitiu identificar grânulos de PHA intracelular. No entanto as imagens não são apresentadas, pelo mesmo motivo que as imagens do ensaio no reator *Batch 2*.

No início era evidente a quantidade mais reduzida de pontos fluorescentes, mas 5h após a alimentação era notória a quantidade de grânulos de PHA, no interior das células.

3.2.5. AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE ACUMULAÇÃO DE PHA

Pelos resultados referentes aos ensaios de acumulação de PHA podemos dizer que a quantidade de sólidos (biomassa) que distingue os reatores *Batch 1* dos *Batch 2, 3 e 4* não foi importante nos ensaios, uma vez que tal como para o *Batch 1* também para o *Batch 2* foram obtidos resultados semelhantes no que diz respeito à quantidade de fluorescência observada. O facto das lamas serem frescas ou estarem a ser guardadas para posterior utilização também não demonstrou interferir nos resultados. Portanto realizar os ensaios *Batch* após a retirada

RESULTADOS / DISCUSSÃO

de lamas dos reatores SBR não traz vantagens face ao polímero acumulado. Importante será dizer que a quantidade de ar introduzido aquando dos ensaios de acumulação interfere na estabilidade dos flocos existentes. Face à avaliação da acumulação de PHA ambas as culturas previamente selecionadas poderiam ser utilizadas para produzir PHA, no entanto a cultura do reator SBR 1 aparentou ser de maior potencial, uma vez que a fluorescência visualizada no primeiro ensaio de acumulação (Batch 1) mostrou ser a de maior quantidade e intensidade.

4. CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

Esta dissertação teve como objetivo principal a caracterização da população de microrganismos presentes em reatores SBR, relacionando a presença dos diferentes indivíduos com os parâmetros físico-químicos impostos.

Usando culturas mistas provenientes de estações de tratamento de águas residuais, foi possível complementar o controlo do processo de seleção de uma cultura produtora de PHA utilizando a monitorização microbiológica, a partir de várias técnicas de microscopia simples, que permitiram identificar os microrganismos presentes nas amostras. Foi avaliado o comportamento da população microbiológica na operação de dois reatores SBR para a fase de seleção da cultura com capacidade de produção de PHA e realizados quatro ensaios de acumulação de biopolímeros.

- Seleção de culturas

Para a caracterização microbiológica das populações presentes nos reatores SBR e para a visualização de grânulos de PHA foram implementadas técnicas microscópicas rápidas e simples, que se mostraram importantes no âmbito deste trabalho.

Foi possível visualizar o aumento com o tempo de operação do tamanho e da densidade dos flocos nas culturas mistas, dando a noção das várias fases de maturidade da população.

O Índice Biótico de Lamas, IBL, apenas foi determinado para o reator SBR 2, apresentando inicialmente características de classe IV, passando em pouco tempo para a classe III e permanecendo nesta classe até ao final da monitorização da população. Os valores de IBL aumentaram com a diminuição do número de pequenos flagelados presentes no meio, denotando o aumento de maturação do meio.

A espécie de protozoários dominante numa fase mais avançada de seleção foi a *Opercularia* sp., em ambos os reatores, uma vez que, sendo uma espécie bastante resistente, conseguiu sobreviver às condições de stress impostas para o desenvolvimento de culturas produtoras de PHA.

A oscilação microbiológica de espécies detetada na cultura do SBR2, mesmo em fase mais avançada de maturação, foi consequência da variabilidade da quantidade relativa dos ácidos orgânicos voláteis presentes na alimentação dada aos microrganismos, proveniente da fase acidogénica antecedente, uma vez que a quantidade de cada tipo de ácidos influencia a presença / ausência de uma determinada espécie.

Através da monitorização ao longo do tempo da população inoculada nos reatores SBR detetou-se o aumento da quantidade de grânulos intracelulares de PHA, detetando-se da mesma forma que esses mesmos grânulos eram acumulados principalmente pelas bactérias formadoras de flocos e Gram-negativas.

- Produção de PHA

Foi visível, por análise microscópica, o aumento da quantidade de grânulos de PHA ao longo do tempo em todos os ensaios de acumulação em reatores *Batch* e portanto conclui-se que a fase de seleção foi relativamente bem-sucedida, havendo bactérias a produzir biopolímero a partir de ácidos orgânicos presentes no soro de queijo acidificado.

Verificou-se a desagregação dos flocos maiores ao longo de alguns dos ensaios de acumulação nos reatores *Batch*, que pode ser devida a um excessivo caudal de ar fornecido pelo sistema de difusão.

5. TRABALHO FUTURO

TRABALHO FUTURO

Para que no futuro se possa ultrapassar os problemas que foram encontrados na realização deste trabalho experimental, são sugeridos os seguintes pontos:

- ✓ Operação de reatores SBR a diferentes condições físico-químicas tais como carga orgânica, TRS, concentração de substrato, entre outros;
- ✓ Aumento a periodicidade de monitorização, por forma a atuar mais eficazmente quando ocorrem problemas de funcionamento;
- ✓ Aumento do número de amostras retiradas e implementação de técnicas moleculares, que possam permitir a identificação exata das bactérias existentes e assim uma melhor caracterização da microfauna;
- ✓ Aplicação de técnicas moleculares, como FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) e DGGE (Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante), para identificação da população produtora de PHA dominante nos reatores SBR;
- ✓ Aplicar menor quantidade de ar nos ensaios Batch, de modo a evitar a desagregação dos flocos formados na fase de seleção;
- ✓ Utilizar condições de operação diferentes, nomeadamente razão F/M, nos ensaios de acumulação de PHA.
- ✓ Utilização de cromatografia de gás para quantificar a concentração de PHA acumulado pelas bactérias, para assegurar as conclusões retiradas através das imagens microscópicas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albuquerque M. G. E., Eiroa M., Torres C., Nunes B. R., Reis M. A. M., 2007. Strategies for the development of a side stream process for polyhydroxyalkanoate (PHA) production from sugar cane molasses. *Journal of Biotechnology*. Vol. 130 (4), 411-421.

Albuquerque M. G. E., Torres C. A. V., Reis M. A. M., 2010. Polyhydroxyalkanoate (PHA) production by a mixed microbial culture using sugar molasses: Effect of the influent substrate concentration on culture selection. *Water Research*. Vol. 44 (11), 3419-3433.

Álvarez-Chávez C. R., Edwards S., Moure-Eraso R., Geiser K., 2012. Sustainability of bio-based plastics: general comparative analysis and recommendations for improvement. *Journal of Cleaner Production*, 23(1), 47-56.

Anderson A. J., Dawes E. A., 1990. Occurrence, metabolism, metabolic role and industrial uses of bacterial PHA. *Microbiol Rev.*, 54, 450-472.

Becares E., 1991. Microfauna of an activated sludge pilot plant treating effluents from a pharmaceutical industry. Biological approach to sewage treatment process: current status and perspectives, Madoni P., *Centro Bazzucchi*. Perugia, 105-108.

Blackall L. L., Seviour E. M., Cunningham M. A., Seviour R. J., Hugenholtz P., 1994. "Microthrix parvicella" is a novel, deep branching member of actinomycetes subphylum. *System. Appl. Microbiol.*, 17, 513-518.

Bungay S., Humphries M., Stephenson T., 2007. Operating Strategies for variable flow sequencing batch reactors, *Wastewater and Environment Journal*, Journal Compilation CIWEM.

Charmot M., Roche N. Prost C., 1997. Influence of cyclic feeding on high strength wastewater treatment by activated sludge. *Rev. de L'Eau*. Vol. 10 (3), 376-394.

Chowdhury A. A., 1963. Poly- β -hydroxybuttersäure abbauende Bakterien und Exoenzyme. *Arch Mikrobiol*, 47, 167-200.

Chua Adeline S. M., Takabatake H., Satoh H., Mino T., 2003. Production of polyhydroxyalkanoates (PHA) by activated sludge treating municipal wastewater: effect of pH, sludge retention time (SRT), and acetate concentration in influent. *Water Research*, 37 (15), 3602-3611.

Cruds C. R., 1975. Protozoa. Ecological aspects of used water treatment, Cruds C. R., Hawes H. A. (ed), *Academic Press*. London, 203-268.

Cruds C. R., Cockburn A., 1970. Protozoa as indicators in the activated-sludge process. *RES, W. - Protozoa in biological sewage-treatment processes II*, 237-249.

Dai Z. W., Zou X. H., Chen G. Q., 2009. Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) as an injectable implant system for prevention of post-surgical tissue adhesion. *Biomaterials*, 30, 3075-3083.

Dias J. M., Lemos P. C., Serafim L. S., Oliveira C., Eiroa M., Albuquerque M. G., 2006. Recent Advances in Polyhydroxyalkanoate Production by Mixed Aerobic Cultures: From the Substrate to the Final Product. *Macromolecular Bioscience*. Vol. 6 (11), 885-906.

Dionisi D., Majone M., Ramadori R., 2006a. Effect of Feed Length on Settability, Substrate Uptake and Storage in a Sequencing Batch Reactor Treating an Industrial Wastewater. *Environmental Technology*. Vol. 27 (8), 901 - 908.

Dionisi D., Majone M., Ramadori R., 2006c. Effect of the applied organic load rate on biodegradable polymer production by mixed microbial cultures in a sequencing batch reactor. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. 93 (1), 76-88.

- Estridge B. H., Reynolds A. P.**, 1999. Laboratório clínico: técnicas básicas. *Artes Médicas*. Porto Alegre.
- Formolo M. C., Duarte M. A. T., Schneider A. L., Furlan S. A., Pezzin A. P. T.**, 2003. Poliídrolxialcanoatos: biopoliésteres produzidos a partir de fontes renováveis. *Revista Saúde e Ambiente*. Vol. 4 (2), 14 – 21.
- Gerardi M. H.**, 2006. Wastewater Bacteria. Wiley-Interscience. *John Wilwy & Sons, Inc.*, Hoboken, New Jersey.
- Hui Y.**, 2005. Characterization on the metabolism in a sequencing membrane batch reactor with deteriorated enhanced biological phosphorus removal activity. *Civil Engeneering*. Master of Engineering.
- Jacquel N., Lo C. W., Wei Y. H., Wu H. S., Wang S. S.**, 2008. Isolation and purification of bacterial poly(3-hydroxyalkanoates). *Biochemical Engineering Journal*. Vol. 39 (1), 15-27.
- Jenkins D., Richard M. G., Daigger G. T.**, 1993. Manual on the causes and control of activated sludge bulking and foaming. *Second Edition, Lewis Publishers, Inc. Michigan*.
- Jenkins D., Richard M. G., Daigger G. T.**, 2004. Manual on the Causes and Control of Activated Sludge Bulking, Foaming, and Other Solids Separation Problems, *IWA Publishing*.
- Jenkins D., Richard M. G., Daigger G.**, 2003. Manual on the causes and control of activated sludge bulking, foaming and other solids separation problems. *Lewis publishing, Boca Raton, FL*.
- Johnson K., Jiang Y., Kleerebezem R., Muyzer G., van Loosdrecht M. C. M.**, 2009a. Enrichment of a Mixed Bacterial Culture with a High Polyhydroxyalkanoate Storage Capacity. *Biomacromolecules*. Vol. 10 (4), 670-676.
- Khanna S., Srivastava A. K.**, 2005. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry*. Vol. 40 (2), 607-619.
- Lee S. Y.**, 1996a. Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. 49 (1), 1-14.
- Lee S. Y.**, 1996b. Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. *Trends in Biotechnology*, Vol. 14 (11), 431-438.
- Lee S. Y., Chang H. N.**, 1995. Production of poly(hydroxyalkanoic acid). *Rev. Biotechnol.*, 52, 28-57.
- Lemoigne M.**, 1926. Products of dehydration and polymerisation of hydroxybutyric acid. *Bull Soc Chem. Biol.*, 8, 770-82.
- Lemos J. A., Nascimento M. M., Lin V. K., Abranches J., Burne R. A.**, 2008. Global regulation by (p)ppGpp and CodY in *Streptococcus mutans*, *J Bacteriol.*, 190, 5291-5299.
- Lenz R. W., Kim B. W., Ulmer H. W., Fritzsche K., Knee E., Fuller R. C.**, 1990. Functionalized poly- β -hydroxyalkanoates produced by bacteria. Dawes E. A. (ed) Novel biodegradable microbial polymers. Dordrecht, *Kluwer academic publishers*, 23-35.
- Liu L., Jiang C-Y, Liu X-Y, Wu J-F, Han J-G, Liu S-J**, 2007. Plant-microbe association for rhizoremediation of chloronitroaromatic pollutants with *Comamonas* sp. strain CNB-1. *Environmental Microbiology*, 9(2), 465-473.
- Madigan M. T., Martinko J. M., Parker J.**, 2000. Brock Biology of Microorganisms, *Prentice- Hall International Editions*, Upper Saddle River.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Madoni P.**, 1994a. A sludge biotic index (SBI) for the evaluation of the biological performance of activated sludge based on the microfauna analysis. *Wat. Res.* 28, 67-75.
- Madoni P.**, 1996. The sludge biotic index for evaluation of the activated-sludge plant performance: the allocation of the ciliate *Acinertia uncinata* to its correct functional group. *Acta Protozoa*, 35, 000-000.
- Madoni P.**, 2003. Protozoa as indicators of wastewater treatment efficiency. Handbook of water and wastewater microbiology. *Academic Press*. 819.
- Madoni P., Antonietti R.**, 1984. Colonization dynamics of ciliated protozoa population in an activated sludge plant. *Proceeding IV Ital. Symp. Popul. Dynam.*, 105-112.
- Madoni P., Davoli D., Guglielmi L., Stefanini C.**, 1996. Atlante Fotografico: Guida all'analisi microscópica del fango attivo. *AGAC Reggio Emilia*. Università degli Studi di Parma.
- Madoni**, 1981. I protozoa ciliate degli impianti biologici di depurazione, *CNr. AQ/ 1/ 167*, Rome, 1-34.
- Madrid R. E. and Felice C. J.**, 2005. Microbial biomass estimation, *Critical Reviews in Biotechnology*, Vol. 25 (3), 97-112.
- Majone M., Dircks K., Beun J. J.**, 1999. Aerobic storage under dynamic conditions in activated sludge processes. *The state of the art. Water Science and Technology*. Vol. 39 (1), 61-73.
- Meesters K.**, 1998. Production of poly-3-hydroxyalkanoates from waste streams. *Design Report*, Delft University of Technology.
- Mikova G., Chodak I.**, 2006. Properties and modification of poly(3-hydroxybutanoate). *Chem. Listy*, 100, 1075 -1083.
- Nicolau A., Martins M. J., Mota M., Lima N.**, 1999. Estudo da comunidade de protozoários exposta a tóxicos em estações de tratamento de águas residuais. *6ª Conferência Nacional sobre Qualidade do Ambiente. Lisboa (Ed.)* Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa. Plátano Editora, 659 - 668.
- Pagnotta R., Tommasi M.**, 1979. Applicazione di parametric biologici allo studio del fenomeno del bulking. *Inquinamento*, 21, 27-32.
- Pirra A. J. D.**, 2005. Caracterização e tratamento de efluentes vinícolas da região demarcada do Douro. *Vila Real: Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro*.
- Rainey F. A., Burghardt J., Kroppenstedt R. M., Klätte S., Stackebrandt E.**, 1995. Phylogenetic analysis of the genera *Rhodococcus* and *Nocardia* and evidence for the evolutionary origin of the genus *Nocardia* from within the radiation of *Rhodococcus* species. *Microbiology*, 141, 523-528.
- Ray Smith**, 2005. Biodegradable Polymers for Industrial Applications. *Queen Mary University*. London, 552.
- Reis M. A. M., Serafim L. S., Lemos P. C., Ramos A. M., Aguiar F. R., Van Loosdrecht, M. C. M.**, 2003. Production of Polyhydroxyalkanoates by Mixed Microbial Cultures. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 25, 377-385.
- Reusch R. N., Sparrow A. W., Gardiner J.**, 1992. Transport of poly-beta-hydroxybutyrate in human plasma. *Biochim Biophys Acta* 1123, 33-40.
- Richard M.**, 1989. Activated sludge microbiology. *The water pollution control federation*. Virginia.
-

Sasahara T., Ogawa T., 1983. Treatment of brewery effluent. Part VIII: protozoa and metazoan found in the activated sludge for Brewery effluent. *Monats. Brauwiss*, 11, 443-448.

Serafim L. S., Lemos P. C., Oliveira R., Reis M. A. M., 2004. Optimization of polyhydroxybutyrate production by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding conditions. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. 87 (2), 145-160.

Serafim L. S., Lemos P. C., Reis M. A. M., 2003. Produção de Bioplásticos por Culturas Microbianas Mistas. *Boletim de Microbiologia*, 76, 16-21.

Seviour R. J., Nielsen P. H., 2010. Microbial communities in activated sludge plants. *Microbial Ecology of Activated Sludge*. IWA Publishing, 643.

Sheng G. P., Yu H. Q., Li X. Y., 2006. Stability of sludge flocs under shear conditions: Roles of extracellular polymeric substances (EPS). *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. 93 (6), 1095-1102.

Sheng G. P., Yu H. Q., Li X. Y., 2008. Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: a review.

Soddell J. A., Seviour R. J., 1990. A review: microbiology of foaming in activated sludge plants. *J. Appl. Bacteriol.* 69, 145-176.

Spigoni G., Davoli C., Davoli D., 1992. I principali microrganismi filamentosi del fango attivo. *Quaderni tecnici dell'AGAC*.

Sudesh K., Abe H., Doi Y., 2000. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science*. Vol. 25 (10), 1503-1555.

Villano M., Beccari M., Dionisi D., Lampis S., Miccheli A., Vallini G., Majone M., 2010. Effect of pH on the production of bacterial polyhydroxyalkanoates by mixed cultures enriched under periodic feeding. *Process Biochemistry*. Vol. 45 (5), 714-723.

Wang X. M., Li X. Y., 2008. Accumulation of biopolymer clusters in a submerged membrane bioreactor and its effect on membrane fouling. *Water Res.* 42, 855-862.

Wanner J., 1993. Kinetic and metabolic selection in controlling the filamentous organisms in activated sludge systems. Prevention and control of bulking activated sludge. *D. Jenkins, R. Ramadori, L. Cingolani (ed)*, Centro Luigi Bazzuchi, Perugia, 17-42.

Wanner J., 1994. Activated sludge population dynamics. *Wat. Sci. Technol.*, 30, 159-169.

Weiner R. M., 1997. Biopolymers from marine prokaryotes. *Trends Biotechnol.*, 15, 390-394.

Zhang L., Xain M., He Y., Li L., Yang J., Yu S., Xu X., 2009. A Bronsted acidic ionic liquid as an efficient and environmentally benign catalyst for biodiesel synthesis from free fatty acids and alcohols. *Bioresource Technology*, 100, 4368 - 4373.