



**Rafael Alexandre Neto
da Silva**

**Produção de Biopolímeros por Culturas
Microbianas Mistas Seleccionadas**



**Rafael Alexandre Neto
da Silva**

**Produção de Biopolímeros por Culturas
Microbianas Mistas Seleccionadas**

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

Dedico esta dissertação à minha avó Maria, que mesmo após a sua morte nunca será esquecida.

“Don't judge each day by the harvest you reap but by the seeds that you plant.”

Robert Louis Stevenson

O Júri

Presidente

Professora Doutora Maria Helena Gomes de Almeida Gonçalves Nadais

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

Professor Doutor Cheng Chia-Yau

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

Professora Doutora Maria Isabel Aparício Paulo Fernandes Capela

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

AGRADECIMENTOS

Após um longo percurso académico, resta-me agradecer aos meus pais por todo o apoio que me deram e por acreditarem no meu sucesso até ao fim. Nem sempre o caminho tomado foi o mais fácil, mas sempre pude contar a sua ajuda em todas as situações.

Agradeço à minha avó Maria por todos os anos em que esteve presente, fornecendo uma ajuda preciosa para o meu crescimento e desenvolvimento como pessoa.

Aos meus tios Albertino e Emília por toda a ajuda e apoio que me deram nas diferentes fases da minha vida académica.

Às minhas primas Rita e Catarina, que considero como minhas irmãs, pela disponibilidade e companheirismo.

À minha Irmã por toda a preocupação e ajuda que me deu em todos estes anos.

Por fim, agradeço ao fantástico grupo que me acompanhou ao longo da realização da dissertação. À Rita Marinho por toda a ajuda e companheirismo ao longo de todo este tempo no qual me teve de aturar. À Ana Pedrosa e Cátia Couras por toda a disponibilidade e ajuda que me deram. Um especial agradecimento à Tânia Gameiro que, apesar de andar sempre atarefada, sempre arranjou disponibilidade para fornecer a sua preciosa ajuda, sabedoria e acima de tudo paciência no desenvolvimento do trabalho.

Palavras-chave Resíduos; FORSU; Efluentes; Digestão anaeróbia; ácidos orgânicos voláteis; AOV; Culturas mistas; bactérias; inóculo; CQO; Polihidroxialcanoatos; PHA;

Resumo Com a realização deste trabalho, pretendeu-se efetuar uma seleção de culturas mistas em reatores semi-descontínuos (SBR) com capacidade de acumulação de polihidroxialcanoatos (PHA). Para a seleção de culturas foram utilizados inóculos provenientes de diferentes Estações de Tratamento de Águas Residuais (ETAR) e ácidos orgânicos voláteis (AOV) como fonte de carbono. Foram testadas diferentes condições como a proveniência do inóculo, as cargas orgânicas aplicadas e a seleção de culturas utilizando soro de queijo. Verificaram-se elevadas remoções da CQO (acima de 90%) em grande parte dos ensaios realizados, apresentando uma acumulação de PHA por parte de algumas espécies de bactérias presentes. Ocorreu o aparecimento de microrganismos filamentosos com capacidade de acumulação de PHA em alguns ensaios, levando a serem testadas como culturas acumuladoras de PHA. A estabilidade das culturas mistas não foi atingida, mesmo havendo ensaios com 80 dias de operação. Efetuaram-se ensaios de acumulação de PHA em reatores descontínuos, utilizando as culturas selecionadas anteriormente em reatores SBR, com AOV provenientes da acidificação anaeróbia de diferentes resíduos (Fração Orgânica dos Resíduos Sólidos Urbanos - FORSU e Soro de Queijo). Verificou-se uma melhor acumulação por parte das culturas selecionadas com soro de queijo, na qual a quantidade de polímero acumulado triplicou.

Keywords

Waste; OFMSW; Effluents; Anaerobic digestion; Volatile organic acids; AOV; Mixed cultures; bacteria; inoculum; COD; polyhydroxyalkanoates; PHA;

Abstract

With this work, it was intended to make a selection of mixed cultures in sequencing batch reactors (SBR) with a capacity of polyhydroxyalkanoates (PHA) accumulation. For the selection, inoculums from different Wastewater Treatment Plant (WWTP) and volatile fatty acids (VFA) as a carbon source were used. Different conditions were tested, such as: the inoculum source, the applied organic loads and bacteria selection using cheese whey. There was high COD removal (above 90%) in most of the trials, with PHA accumulation by some species of bacteria. The appearance of PHA accumulative filamentous microorganisms occurred, leading to PHA cumulative cultures selection trials. The stability of mixed cultures was not achieved, even with 80 days of operation. PHA accumulation trials were carried out in batch reactors, using selected cultures from the previous SBR reactors, with AOV from the anaerobic acidification from different waste (Organic Fraction of Municipal Solid Waste - OFMSW and Cheese Whey). The PHA accumulation has been improved by the use of the cheese whey selected cultures, in which the amount of polymer accumulation tripled.

Índice

1. Introdução	3
Enquadramento	3
2. Revisão Bibliográfica.....	6
2.1 Gestão de Resíduos em Portugal.....	6
Valorização Orgânica	7
I. Compostagem.....	7
II. Digestão Anaeróbia (DA).....	8
2.2 Ácidos Orgânicos Voláteis (AOV).....	13
2.2.1 Estrutura e propriedades dos AOV	13
2.2.2 Aplicações de AOV.....	15
I. Bioenergia.....	15
II. Remoção de nutrientes.....	17
III. Polihidroxicanoatos.....	17
2.3 Polímeros e Biopolímeros.....	17
2.4 Polihidroxicanoatos (PHA)	19
2.4.1 Estrutura e propriedades dos PHA	19
2.4.2 Co-polímeros	21
2.4.3 Produção industrial e Aplicações dos PHA	21
2.5 Produção biológica de PHA	24
2.5.1 Microrganismos produtores de PHA	24
2.5.2 Culturas Puras Vs Culturas Mistas	26
2.6 Reatores para produção de PHA	27
2.6.1 Reatores semi-contínuos (SBR)	27
2.6.2 Regime Fartura/Fome.....	27
2.7 Fontes de carbono para produção de PHA	29
2.7.1 AOV como fontes de carbono para produção de PHA.....	29
2.7.2 Metabolismo de acumulação de PHA a partir de AOV	29
2.8 Objetivos.....	32
3. Metodologia	35

3.1	Reatores semi-descontínuos (SBR)	35
3.1.1	Instalação experimental	35
3.1.2	Inóculos	36
3.1.3	Condições de operação	37
3.1.4	Nutrientes e Meio Mineral	38
3.1.5	Medição de pH e Oxigênio Dissolvido	38
3.2	Reatores descontínuos	39
3.2.1	Inóculo, nutrientes e meio mineral	39
3.2.2	Condições de operação	39
3.3	Métodos analíticos	41
3.3.1	Sólidos	41
3.3.2	Carência Química de Oxigênio (CQO)	42
3.3.3	Quantificação de AOV	43
3.3.4	Carbono orgânico total (TOC)	44
3.3.5	Azoto total	45
3.3.6	Quantificação de PHA	45
3.4	Técnicas microscópicas	47
3.4.1	Observação direta das amostras	47
3.4.2	Coloração de Azul do Nilo	48
3.4.3	FISH	49
I.	Fixação das células	49
II.	Aplicação da amostra e desidratação	49
III.	Hibridização da sonda	50
IV.	Lavagem	50
V.	Montagem das lâminas	51
VI.	Visualização das lâminas ao microscópio	51
3.4.4	Coloração para observação de EPS	52
3.5	Cálculos	52
3.5.1	Remoção de CQO	52
3.5.2	Conteúdo de PHA	53
3.5.3	Biomassa ativa	54

3.5.4	Concentração de PHA	54
4.	Resultados e discussão	57
4.1	Ensaio de seleção de culturas acumuladoras de PHA	57
4.1.1	Influência do inóculo	57
4.1.2	Operação a longo prazo de reatores semi-contínuos	66
4.1.3	Influência da carga orgânica na seleção de cultura	76
4.1.4	Seleção de culturas utilizando soro de queijo fermentado	85
4.2	Ensaio de acumulação de PHA	89
4.2.1	Ensaio com FORSU fermentada	89
4.2.2	Ensaio com soro fermentado sem precipitação prévia de proteínas.....	91
4.2.3	Ensaio com soro fermentado com precipitação prévia de proteínas.....	95
5.	Conclusão.....	99
6.	Trabalhos Futuros	101
7.	Bibliografia.....	105
8.	Anexos	111

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Ácidos Orgânicos Voláteis de cadeia curta (Fonte: Adaptado de Madsen <i>et al.</i> , 2011).....	13
Tabela 2-Empresas investigadoras e produtoras de PHA a nível mundial (Fonte: Adaptado de Chen, 2009).....	22
Tabela 3 - Bactérias utilizadas para produção de PHA com diferentes substratos (adaptado de Chee et al., 2010).....	25
Tabela 4 - Inóculos utilizados nos ensaios SBR e sua caracterização em termos de sólidos.	36
Tabela 5 - Quadro resumo das condições de operação dos SBR.	37
Tabela 6 - Meio mineral e Micronutrientes utilizados nos reatores SBR.....	38
Tabela 7 – Condições de operação de reatores descontínuos.....	40
Tabela 8 - Condições de operação do cromatógrafo.	43
Tabela 9 - Estequiometria de oxidação de AOV a CQO.....	43
Tabela 10 – Condições de operação do cromatógrafo para quantificação de PHA.....	46
Tabela 11 - Quadro de inoculação de reatores SBR.	57
Tabela 12 - Inoculação dos SBR para avaliar a influência da carga orgânica na seleção de culturas.	76
Tabela 13 - Inoculação do SBR para seleção de culturas utilizando soro fermentado.	85
Tabela 14 - Caracterização do soro de queijo fermentado.....	86
Tabela 15 - Caracterização da FORSU fermentada.	89
Tabela 16 - Quantidade de Formamida e água MiliQ para preparar solução de hibridação.	112
Tabela 17 - Quantidade de NaCl e EDTA para preparar a solução tampão de lavagem...	113

Índice de Figuras

Figura 1- Destino final dos RUB em 2012 (Fonte: REA, 2013).....	3
Figura 2 - Esquema representativo do processo de digestão anaeróbia.....	9
Figura 3 - Potencialidades de utilização de AOV produzidos por fermentação acidogénica.	15
Figura 4 - Grânulos de PHA acumulados no interior de bactérias (Fonte: Serafim <i>et al.</i> , 2000).....	19
Figura 5 - Estrutura geral dos polihidroxicarboxilatos (adaptado de Khanna <i>et al.</i> , 2005)...	20
Figura 6 - Ciclo num reator SBR em regime Fartura/Fome (μ representa o crescimento celular) (Fonte: (Serafim <i>et al.</i> , 2000))	28
Figura 7 - Metabolismo de conversão de AOV a PHA (adaptado de Serafim <i>et al.</i> , 2008) .	30
Figura 8 - Esquema representativo da instalação experimental.....	36
Figura 9 - Imagem do microscópio Carl Zeiss usado no laboratório de microbiologia.	47
Figura 10 – Operação do reator SBR1.	58
Figura 11 – Concentração de sólidos totais e voláteis na fase de decantação do SBR1.	58
Figura 12 - Concentração de AOV discriminados na fase de decantação do reator SBR1..	59
Figura 13 - Operação do reator SBR2.	60
Figura 14 - Concentração de sólidos totais e voláteis na fase de decantação do SBR2.....	61
Figura 15 - Concentração de AOV discriminados na fase de decantação do reator SBR2..	61
Figura 16 - Amostra do SBR2 observada ao microscópio com a técnica de tinta-da-china para observação de EPS, no dia 31 de operação.....	62
Figura 17 - Observação microscópica utilizando a técnica de coloração Azul do Nilo sem fluorescência no dia 0 (a) dia 34 (c) e com fluorescência no dia 0 (b) dia 34 (d) do SBR1. 63	
Figura 18 - Observação microscópica utilizando a técnica de coloração Azul do Nilo sem fluorescência no dia 0 (a) dia 41 (c) e com fluorescência no dia 0 (b) dia 41 (d) do SBR2. 64	
Figura 19 - Microrganismos filamentosos presentes no reator SBR3 (a) e SBR4 (b) após 19 dias de operação.....	67
Figura 20 - Operação do reator SBR3.	68
Figura 21 - Concentração de sólidos totais e voláteis na fase de decantação do SBR3.....	69
Figura 22 - Concentração de AOV discriminados na fase de decantação do reator SBR3..	70
Figura 23 - Operação do reator SBR4.	70
Figura 24 - Concentração de sólidos totais e voláteis na fase de decantação do SBR4.....	71

Figura 25 - Concentração de AOV discriminados na fase de decantação do reator SBR4..	72
Figura 26 – Observação microscópica direta do SBR3 aos 70 dias de operação (a – ampliação 400x e b – ampliação 1000x); Observação microscópica com técnica do Azul do Nilo sem fluorescência (c) e com fluorescência (d) do SBR4 aos 19 dias de operação.	73
Figura 27 - Quantificação de polímero no ensaio do SBR3.	73
Figura 28 - Quantificação de polímero no ensaio do SBR4.	74
Figura 29 - Imagens de FISH recolhidas com dois diferentes filtros de fluorescência (a. com sondaBET42a (vermelho) e EUB338mix (verde); b. sondas DECL585 (vermelho) e EUB338mix (verde).....	75
Figura 30 - Operação do reator SBR5.	77
Figura 31 - Concentração de sólidos totais e voláteis na fase de decantação do SBR5.....	77
Figura 32 - Crescimento disperso de microrganismos e formação de microflocos de fraca sedimentabilidade (SBR5, dia 51).....	78
Figura 33 - Concentração de AOV discriminados na fase de decantação do reator SBR5..	79
Figura 34 - Observação microscópica com a técnica do Azul do Nilo sem fosforescência (a) e com fosforescência (b) do SBR5 (ampliação 400x).	79
Figura 35 - Operação do reator SBR6.	80
Figura 36 - Concentração de sólidos totais e voláteis na fase de decantação do SBR6.....	80
Figura 37 - Presença de microrganismos filamentosos no SBR6 (dia 40).	81
Figura 38 - Concentração de AOV discriminados na fase de decantação do reator SBR6..	81
Figura 39 - Quantificação de polímero no ensaio do SBR5.	82
Figura 40 - Quantificação de polímero no ensaio do SBR6.	83
Figura 41 - Operação do SBR7.	85
Figura 42 - Concentração de AOV discriminados na fase de decantação do reator SBR7..	86
Figura 43 - Observação microscópica direta do dia 0 (a) e 24 (b) de operação do SBR7. ..	87
Figura 44 - Concentração de sólidos na fase de decantação do reator SBR7.	87
Figura 45 - Quantificação de polímero no ensaio descontínuo 1.	90
Figura 46 - Concentração de AOV ao longo do ensaio descontínuo 1.....	90
Figura 47 - Quantificação de Polímero no ensaio descontínuo 2.	91
Figura 48 - Concentração de AOV ao longo do ensaio descontínuo 2.....	92
Figura 49 - Quantificação de Polímero no ensaio descontínuo 4.	92
Figura 50 - Concentração de AOV ao longo do ensaio descontínuo 4.....	93

Figura 51 - Observação microscópica de amostras do ensaio de acumulação 4 com a técnica de azul do Nilo no início do ensaio (a, b – 0h) e no final (c, d – 28h). Azul do Nilo sem fluorescência (a, c); Azul do Nilo com fluorescência (b, d).....	94
Figura 52 - Quantificação de Polímero no ensaio descontínuo 3.	95
Figura 53 - Concentração de AOV ao longo do ensaio descontínuo 3.....	96

Abreviaturas

Acetil-CoA Acetil Co-Enzima A

AOV Ácido Orgânico Volátil

APA Agência Portuguesa do Ambiente

APHA American Public Health Association

CBO Carência Bioquímica de Oxigénio

CE Comunidade Europeia

CoA Co-Enzima A

CQO Carência Química de Oxigénio

CQOs in Carência Química de Oxigénio solúvel da alimentação

CQOs out Carência Química de Oxigénio solúvel do efluente de descarga

EPS Exopolissacarídeo

ETAR Estação de Tratamento de Águas Residuais

FD Fator de Diluição (uma diluição de 1:5, FD = 5)

FF Fartura/Fome

FID Flame ionization detector

FISH Fluorescence in situ hybridization

FORSU Fração Orgânica de Resíduos Sólidos Urbanos

HB Hidroxibutirato

HV Hidroxivalerato

IUPAC International Union of Pure and Applied Chemistry

m_{HB} massa de hidroxibutirato

m_{PHB} massa de polihidroxibutirato

NADP⁺ Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato

NADPH Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato

NO Óxido de Azoto

P(3HB) Poly(3-hidroxi-butirato)

P(3HV) Poly (3-hidroxi-valerato)

PC Policarbonato

PERSU I Plano Estratégico para os Resíduos Sólidos Urbanos 1

PERSU II Plano Estratégico para os Resíduos Sólidos Urbanos 2

PET Politereftalato de Etileno

PGA Poliglicolatos

PHA Polihidroxi-álcanoato

PHB Polihidroxi-butirato

PLA Ácido Poliláctico

PP Polipropileno

PS Poliestireno

PU Poliuretano

PVC Policloreto de vinilo

RARS Responsabilização Alargada do Produtor de Resíduos

RNA Ácido Ribonucleico

RSU Resíduo Sólido Urbano

RU Resíduo Urbano

RUB Resíduos Urbanos Biodegradáveis

SBR Sequencing Batch Reactor

SST Sólidos Suspensos Totais

SSV Sólidos Suspensos Voláteis

TC Carbono Total

TIC Carbono Inorgânico Total

TOC Carbono Orgânico Total

TOC out Carbono Orgânico Total do efluente de descarga

v/v Volume por Volume

Introdução

1. Introdução

Enquadramento

Com o crescimento da população, o consumo e o uso de materiais não biodegradáveis, como é o caso dos plásticos, contribuíram para um aumento do volume de resíduos produzidos, transformando a gestão de resíduos uma das problemáticas mais importantes do século XXI (Lee *et al.*, 2014).

Atualmente a capitação média nacional de resíduos situa-se em 1,24 kg/hab.dia que, perfaz um valor considerável de Resíduos Sólidos Urbanos (RSU) produzidos diariamente. Até 2006, a maioria destes resíduos eram encaminhados para aterros sanitários, não havendo qualquer aproveitamento dos resíduos biológicos com potencial de valorização, tornando-os num dos grandes problemas ambientais atuais. No entanto, nesse ano, surgiu em Portugal um Plano Estratégico para os Resíduos Sólidos Urbanos (PERSU II), no qual estão definidas metas para reduzir a quantidade de Resíduos Urbanos Biodegradáveis (RUB) que são depositados em aterro através da sua valorização (Dias *et al.*, 2013). A Figura 1 apresenta os resultados de destino final de resíduos apresentados no Relatório do Estado do Ambiente 2013 (REA, 2013).

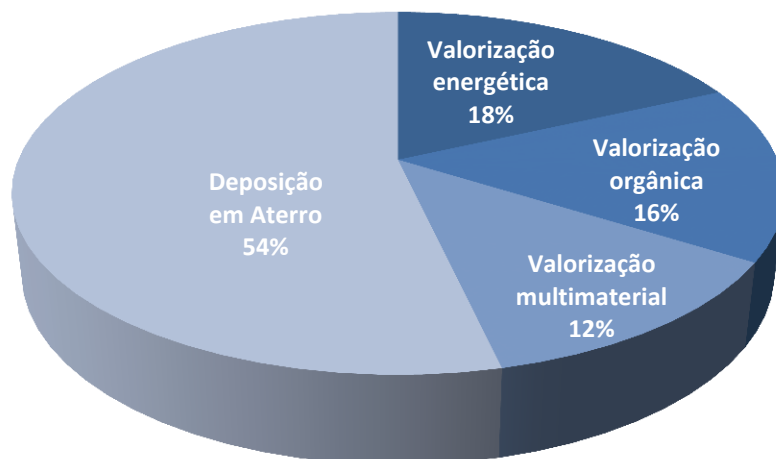


Figura 1- Destino final dos RUB em 2012 (Fonte: REA, 2013)

Por outro lado, a sociedade atual apresenta uma elevada dependência na utilização de plásticos derivados de combustíveis fósseis. O consumo de matérias não biodegradáveis apresenta um grave problema a nível de contaminação ambiental (contaminantes persistentes), sendo necessário longos períodos de tempo para que estas sejam degradadas. Contudo, apesar da sua baixa biodegradabilidade, este tipo de material tem elevada resistência química e maleabilidade, tornando-se numa matéria-prima preferencial em vários setores industriais como na eletrónica, indústria automóvel e saúde (Serafim *et al.*, 2000).

Com o aumento dos preços e a escassez do petróleo, urge a necessidade da procura de novos materiais passíveis de os substituir. Entre esses encontram-se os plásticos derivados do petróleo, que apresentam uma elevada necessidade de ser substituídos por outros menos prejudiciais ao ambiente. Estes plásticos não são recicláveis devido à dificuldade de identificar e separar os diferentes tipos de plásticos que existem, assim como a presença de diferentes materiais e aditivos (Madkour *et al.*, 2013). Os plásticos, ao serem compostos orgânicos, também podem ser utilizados como fonte de energia através da incineração. No entanto, a incineração descontrolada ou mal gerida pode resultar em emissões perigosas (Yates *et al.*, 2013).

A indústria química, a maior produtora de plásticos até à atualidade, para além de continuar com a produção de plásticos ditos convencionais, tem desenvolvido também uma vasta gama de plásticos biodegradáveis. Estes bioplásticos são produzidos como alternativas viáveis aos convencionais, pois podem ser degradados por microrganismos, um fator que tem ganho cada vez mais relevância nas últimas décadas (Madkour *et al.*, 2013). A utilização de plásticos biodegradáveis pode reduzir em aproximadamente 20% o volume total de resíduos produzidos e em 10% o peso total de resíduos a eliminar (Dias *et al.*, 2006).

Nos dias de hoje, a principal preocupação é a obtenção de polímeros com as mesmas características dos plásticos convencionais. Polímeros como os polihidroxicanoatos (PHA), polilactidos (PLA) ou polissacarídeos podem ser utilizados para as mesmas aplicações dos plásticos convencionais (Reddy *et al.*, 2003). Apesar dos avanços efetuados, a produção de polímeros biodegradáveis em grande escala, como os

PHA, é mais onerosa que a dos plásticos provenientes da indústria petroquímica (Jacquel *et al.*, 2008). A otimização dos processos de fermentação e extração, a procura de substratos de baixo custo e a melhoria das propriedades físicas dos biopolímeros representam alguns dos esforços para tornar os PHA economicamente mais atrativos (Verlinden *et al.*, 2007).

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Gestão de Resíduos em Portugal

A Comunidade Europeia (CE), com o objetivo de reduzir a produção de resíduos e melhorar o desempenho da sua gestão, lança a diretiva-quadro sobre resíduos (Diretiva 2008/ 98/ CE). Um dos principais mecanismos de gestão que surgiu da diretiva foi a Responsabilização Alargada do Produtor de Resíduos (RARS), levando a uma necessidade dos produtores de desenvolverem um sistema para organizar e gerenciar a recolha e valorização de resíduos específicos, sem fins lucrativos (Niza *et al.*, 2014). A estratégia RARS foi um dos pilares no desenvolvimento da política de gestão de resíduos em Portugal (Niza *et al.*, 2014), levando à criação do Plano Estratégico de Resíduos Sólidos Urbanos (PERSU I), em 1997 (APA, 2014).

O PERSU I apresentou como principais diretrizes o encerramento de mais de 300 lixeiras inventariadas, a construção de infraestruturas para o tratamento de Resíduos Urbanos (RU) e o reforço acentuado da recolha seletiva e da reciclagem multimaterial, preconizando metas específicas para os horizontes de 2000 e 2005, bem como objetivos qualitativos para 2010. Em 2007 surgiu a necessidade de formar um novo PERSU (PERSU II), através da Portaria n.º 187/2007, de maneira a dar continuidade à política dos resíduos, tendo em conta as alterações a nível nacional e comunitário ao longo dos anos. As principais alterações à política de resíduos focaram a redução de resíduos urbanos biodegradáveis a depositar em aterro (APA, 2014).

A presença de Resíduos Urbanos Biodegradáveis (RUB) em aterro pode levar a curto/longo prazo a vários problemas ambientais, tais:

- Produção de biogás e compostos com impactes ao nível de efeito de estufa
- Produção de odores
- Riscos de explosão
- Produção de lixiviados com elevada carga orgânica
- Ocupação de volume em aterro

O desvio de RU da deposição em aterro é possível de ser realizado através da valorização de recursos seletivos e indiferenciados, com um tratamento mecânico, procedido de um tratamento biológico em unidades de digestão anaeróbia ou de compostagem. A valorização energética em unidades de incineração com recuperação de

energia e a reciclagem de papel e cartão também são processos relevantes para o cumprimento dos objetivos do PERSU II.

Além dos RSU, também existem outros tipos de resíduos, como os efluentes de indústrias alimentares, que necessitam de uma progressiva preocupação. A crescente competição entre indústrias para a obtenção de um produto de melhor qualidade leva a uma procura constante de matérias-primas como novos ingredientes. A utilização de novas matérias-primas pode levar ao aparecimento de compostos orgânicos complexos com propriedades refratárias, podendo comprometer os processos de tratamento biológico já existentes nas estações de tratamento de águas residuais (ETAR) e, conseqüentemente, o cumprimento dos requisitos legais para a descarga de águas residuais (Arroja *et al.*, 2012).

Valorização Orgânica

Os resíduos urbanos provenientes da recolha indiferenciada não são recicláveis, mas são objeto de valorização orgânica. Como o nome indica, os resíduos orgânicos são utilizados para efetuar uma valorização sob a forma de composto (compostagem) ou uma valorização energética (digestão anaeróbia) através da produção de metano ou Ácidos Orgânicos Voláteis (AOV).

I. Compostagem

O processo de compostagem é realizado por várias fases, ocorrendo o desenvolvimento de variados microrganismos nas diferentes fases do processo, sobretudo devido à temperatura (processo fortemente exotérmico).

Numa fase inicial a temperatura varia entre 20 e 40 °C (fase mesófila) e ocorre a degradação microbiológica de compostos de carbono mais simples (açúcares, compostos solúveis, ácidos orgânicos) na presença de fungos mesófilos e termotolerantes. Posteriormente, o aumento da temperatura para valores entre 40 e 60 °C (fase termófila), promove o desenvolvimento de bactérias termotolerantes, actinomicetes e fungos, ao

mesmo tempo que inativa os microrganismos mesófilos. As temperaturas acima de 60 °C representam uma redução considerável da população microbiana, onde a degradação se processa praticamente na totalidade, excetuando-se os compostos de lenhina e celulose.

Após o primeiro ciclo de metabolização da matéria orgânica dá-se um decréscimo de temperatura (arrefecimento), o que provoca um repovoamento do material da compostagem. Segue-se a fase da maturação, onde se dá a decomposição de compostos como a lenhina, hemicelulose, celulose, amido e outros polímeros.

A compostagem é um processo biológico que depende de vários fatores que possam afetar os microrganismos, tais como arejamento, humidade, temperatura, pH entre outros. Esta apresenta inúmeras vantagens, e quando ocorre em condições favoráveis os resultados são bastante positivos. Este processo pode efetuar-se em pilhas expostas ao ar, embora o uso de contentores ajude a manter a temperatura e as pilhas limpas.

Em termos ambientais, a compostagem não apresenta impactes negativos, uma vez que quando controlado representa uma solução eficaz para a componente orgânica, com a vantagem de produzir um produto com aplicação na agricultura. Através deste processo consegue-se uma valorização dos resíduos a baixo custo, sem grandes exigências de espaço ou grandes investimentos, sendo economicamente viável, permitindo a redução da produção de lixiviados e biogás em aterro.

II. Digestão Anaeróbia (DA)

A digestão anaeróbia é um processo microbiológico complexo que envolve vários grupos tróficos que interagem de maneira coordenada e equilibrada (Alves *et al.*, 2007). Trata-se de uma plataforma de tecnologia versátil, que pode servir muitos propósitos na indústria e na sociedade. Por exemplo, os processos de tratamento das águas residuais geram grandes quantidades de lamas que é dispendioso para depositar em aterro ou incinerar. O volume de lamas pode efetivamente ser reduzido por meio de digestão anaeróbia, havendo a recuperação de bioenergia sob a forma de biogás (dióxido de

carbono (CO_2) e metano (CH_4)), permitindo abater os custos de operação (Madsen *et al.*, 2011).

O processo de digestão anaeróbia é particularmente adequado a substratos húmidos, como lamas, resíduos alimentares, resíduos agrícolas/dos animais, permitindo efetuar uma valorização de resíduos. Esta valorização permite reduzir o volume de resíduos a depositar em aterro, através da sua decomposição, para a produção de AOV ou biogás (Figura 2).

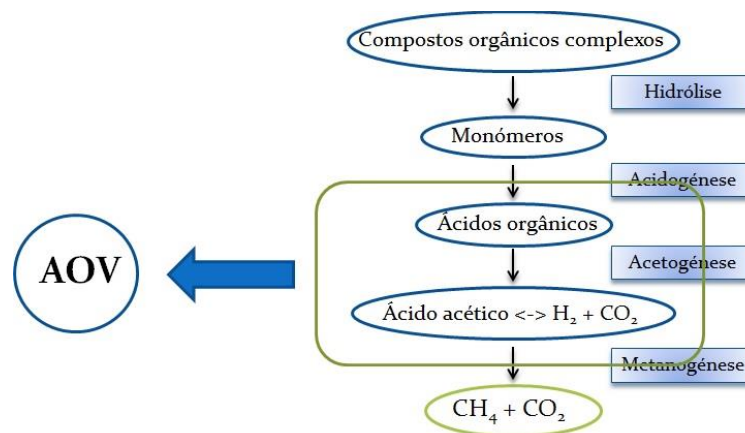


Figura 2 - Esquema representativo do processo de digestão anaeróbia.

Como se encontra representado na Figura 2, a digestão anaeróbia é dividida em quatro grandes fases de degradação: Hidrólise, Acidogénese, Acetogénese e Metanogénese.

A **Hidrólise** é um processo lento que consiste na conversão da matéria orgânica em suspensão (proteínas, hidratos de carbono e lípidos) em monómeros (aminoácidos, açúcares e ácidos gordos de cadeia longa, respetivamente), através de enzimas extracelulares.

Na **Acidogénese**, os produtos obtidos da hidrólise da matéria orgânica são convertidos em produtos intermédios (ácidos orgânicos e álcoois), dióxido de carbono e hidrogénio (H_2). A população microbiana acidogénica apresenta períodos reduzidos de duplicação, tornando esta fase mais rápida.

Na etapa de **Acetogénese**, os produtos obtidos na fase anterior são convertidos em acetato, dióxido de carbono e hidrogénio, por ação de bactérias homoacetogénicas e sintróficas (também designadas por produtoras obrigatórias de hidrogénio). As bactérias homoacetogénicas produzem acetato a partir de H_2/CO_2 ou de compostos orgânicos multicarbonados (ácidos orgânicos). As espécies sintróficas estão envolvidas na degradação dos ácidos gordos de cadeia longa, devido à incapacidade das bactérias acidogénicas de o fazer.

Por fim, na **Metanogénese**, as bactérias metanogénicas degradam apenas um número limitado de substratos com baixos números de carbono, nomeadamente acetato, metanol, metilaminas, formato e hidrogénio. Esta etapa é muitas vezes o passo limitante do processo global (Alves *et al*, 2007).

Do processo de digestão anaeróbia obtém-se uma qualidade de biogás que é dependente do substrato utilizado (composição e biodegradabilidade). Em média a produção de metano situa-se entre os 55-70%, 30-45% de dióxido de carbono e uma pequena fração de sulfureto de hidrogénio (H_2S) que pode variar entre 200 e 4000 ppm (Alves *et al*, 2007).

❖ FORSU

A FORSU é um dos principais constituintes dos resíduos depositados em aterro responsável pela emissão de maus odores, gases de efeito de estufa e formação de lixiviados. A aplicação da digestão anaeróbia à FORSU permitiu controlar a emissão de odores e lixiviados, diminuindo o volume de resíduos a depositar em aterro. Esta tecnologia tem sido aplicada para a estabilização das lamas biológicas excedentárias produzidas nas estações de tratamento de águas residuais, reduzindo organismos patogénicos e maus odores (gerados pela presença de H_2S e NH_3) antes de poderem ser usadas como fertilizantes (Flor *et al.*, 2002).

❖ **Soro de queijo como resíduo industrial**

Soro de queijo é um subproduto da fabricação de queijo rico em lactose, representando cerca de 85 - 95% do volume de leite processado, retendo 55% dos nutrientes do leite. A utilização de nutrientes de soro de queijo como substratos de valor acrescentado permite reduzir os custos de eliminação e a problemática da poluição. Apesar do desenvolvimento tecnológico na transformação do soro de queijo em outros produtos vantajosos, a utilização ou eliminação do soro de queijo ainda é um dos problemas mais importantes enfrentados pela indústria de laticínios. A elevada carga orgânica, combinada com uma baixa capacidade tampão, torna o tratamento anaeróbio em reatores de alta carga difícil, apresentando uma elevada capacidade de acidificação (Arroja *et al.*, 2012). Estudos como Arroja *et al.* (2012) exploram o elevado poder de acidificação do tratamento anaeróbio de soro de queijo com o objetivo de obter os ácidos orgânicos como produto, ao invés de recorrer a um tratamento convencional com metanização.

❖ **Fatores que influenciam a digestão anaeróbia**

Existem alguns fatores que podem influenciar a ação das bactérias na digestão anaeróbia, tais como:

➤ **Temperatura**

Tem uma forte influência na velocidade do processo de degradação anaeróbia, podendo-se trabalhar em condições mesófilas (30 a 38 °C) ou termófilas (49 a 57 °C).

➤ pH

É importante que exista no digestor uma capacidade tampão para os ácidos produzidos, pois:

- ✓ As bactérias metanogénicas são sensíveis ao pH (gama pH de 6,5 a 7,5)
- ✓ As bactérias não metanogénicas são mais tolerantes ao pH (gama de pH de 6 a 8,3)

Quando o sistema não é auto-tamponizante é necessário adicionar um corretor de pH (alcalinidade), de modo a garantir que em qualquer ponto do reator exista suficiente capacidade tampão para permitir neutralizar os AOV formados durante o processo de acidogénese, mantendo o pH dentro da gama desejada, para a produção de biogás.

➤ Presença de inibidores ou tóxicos

Podem-se distinguir diferentes tipos de toxicidade:

- ✓ Metabólica – inibição competitiva de um processo metabólico, geralmente reversível após a remoção do tóxico (como é o caso dos sais e azoto amoniacal).
- ✓ Fisiológica – destrói componentes subcelulares (membrana, enzimas). Os compostos fenólicos são importantes inibidores fisiológicos.
- ✓ Bactericida – toxicidade aguda que destrói as células (elevada concentração de ácidos gordos de cadeia longa).

Vários tipos de indicadores para avaliar a evolução do processo de DA têm sido sugeridos nas últimas décadas. Alguns autores consideram os AOV bons parâmetros de controlo, uma vez que são elementos indicativos da evolução da digestão (representado na Figura 2). Caso se verifique uma acumulação de AOV podem-se formular duas hipóteses: o reator tem uma carga orgânica muito elevada ou os microrganismos metanogénicos foram inibidos por algum fator. Existem alguns AOV cuja importância é ainda desconhecida, mas a maioria dos AOV de cadeia curta têm sido alvos de vários estudos e são já usados nas mais diversas aplicações (Metcalf *et al.*, 2003).

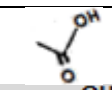
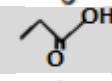
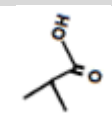
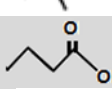
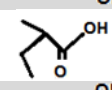
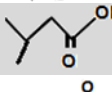
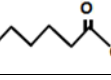
2.2 Ácidos Orgânicos Voláteis (AOV)

Há alguns anos atrás, a abordagem de gestão de resíduos convencionais era um tratamento orientado que se concentrava principalmente em atender as normas ambientais. Esse gênero de abordagem negligência o potencial de desviar os resíduos como matéria-prima para a produção de produtos químicos de valor acrescentado. Atualmente, a gestão de resíduos é efetuada de uma forma mais esclarecida, o que permite a minimização simultânea de resíduos e geração de produtos de valor acrescentado. Um dos produtos com grande potencial de utilização são os AOV obtidos a partir da digestão anaeróbia de resíduos orgânicos e efluentes industriais ricos em carbono (Lee *et al.*, 2014).

2.2.1 Estrutura e propriedades dos AOV

Os AOV são compostos constituídos no máximo por seis carbonos (ácidos orgânicos de cadeia curta) (Tabela 1 - Ácidos Orgânicos Voláteis de cadeia curta (Fonte: Adaptado de Madsen *et al.*, 2011)), comercialmente produzidos pela via química. Contudo, a necessidade de reduzir a dependência de combustíveis fósseis, devido à sua escassez e elevado preço, renova o interesse da obtenção de AOV pela via biológica.

Tabela 1 - Ácidos Orgânicos Voláteis de cadeia curta (Fonte: Adaptado de Madsen *et al.*, 2011)

Nomenclatura IUPAC	Fórmula	Estrutura
Ácido acético	CH_3COOH	
Ácido propiónico	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$	
Ácido i-Butírico	$\text{CH}_3\text{CH}(\text{CH}_3)\text{COOH}$	
Ácido n-Butírico	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$	
Ácido i-Valérico	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{COOH}$	
Ácido n-Valérico	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$	
Ácido n-Capróico	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$	

Para a produção de AOV, pela via biológica, são comumente usados açúcares puros, tais como glucose e sacarose. No entanto, a utilização destes compostos na produção de compostos químicos levanta questões do foro ético, as quais a comunidade científica tenta contornar, utilizando outros compostos como fonte de carbono. Uma possível solução para o problema passa pelo aproveitamento de resíduos orgânicos, como a Fração Orgânica dos Resíduos Sólidos Urbanos (FORSU), lamas excedentárias de Estações de Tratamento de Águas Residuais ou Efluentes Industriais ricos em carbono (Arroja *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2014).

Para garantir uma boa acidificação dos resíduos é necessário o controlo dos parâmetros de operação do reator, como pH, tempo de retenção, carga orgânica e temperatura, de maneira a evitar que ocorra a fase metanogénica, onde o carbono é convertido a biogás (Arroja *et al.*, 2012).

2.2.2 Aplicações de AOV

Os AOV apresentam uma vasta gama de aplicações, nomeadamente, a síntese de PHA por parte de bactérias para a produção de bioplásticos, a remoção de nutrientes de efluentes e a produção de bioenergia (Figura 3) (Lee *et al.*, 2014).

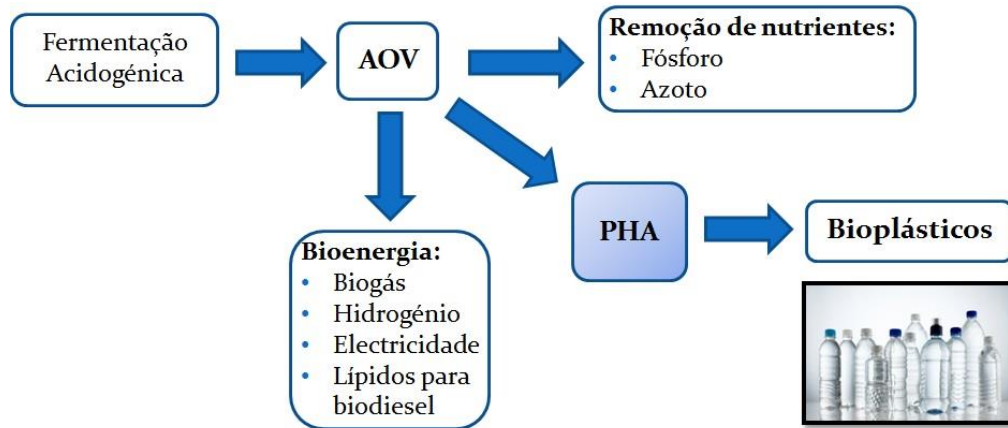


Figura 3 - Potencialidades de utilização de AOV produzidos por fermentação acidogénica.

I. Bioenergia

Existem vários processos para a produção de bioenergia através de AOV, desde a produção direta de eletricidade na digestão anaeróbia de AOV à produção de combustíveis como biogás, hidrogénio e biodiesel.

✓ Eletricidade

A energia elétrica é produzida através da utilização de células microbianas, nas quais os microrganismos aproveitam as propriedades químicas do substrato orgânico. Em muitos casos a operação destes sistemas não necessita de resíduos pré-tratados, podendo ser utilizados no seu estado bruto, tornando esta tecnologia economicamente atrativa.

✓ **Biogás**

Existem dois processos para a produção de biogás, ambos através de digestão anaeróbia, variando apenas o número de fases impostas. A digestão anaeróbia de uma fase, na qual os AOV são utilizados como um produto intermédio para a produção do biogás, não é o melhor processo para a produção de biogás, pois como foi visto anteriormente na secção 2.1, a produção de AOV e de biogás têm condições ótimas diferentes. Assim, para otimizar ambos os processos, são efetuadas duas fases distintas de digestão anaeróbia, uma inicial para otimizar a produção de AOV e uma segunda para garantir uma boa conversão dos AOV em biogás (preferencialmente em CH₄). Este segundo processo, composto por duas fases, permite aumentar em 25% a quantidade de energia produzida através da queima do biogás.

✓ **Hidrogénio**

O hidrogénio pode obter-se como um subproduto da fermentação acidogénica (acidogénese e acetogénese) no processo de digestão anaeróbia. Ao longo deste processo, se houve a adição de radiação solar ocorrerá uma foto fermentação que potencia a produção de hidrogénio.

✓ **Biodiesel**

O biodiesel é um éster metílico de ácidos gordos de cadeia longa que pode ser produzido a partir de lípidos por meio de processo de transesterificação. Embora o biodiesel seja uma fonte renovável de energia, a sua comercialização tem sido impedida pelo elevado custo de produção atribuído à utilização de matéria-prima cara que representa 70-75% do custo total. A síntese de lípidos microbianos a partir AOV surge como uma boa alternativa, pelo que o lípido sintetizado tem teores em ácidos gordos semelhantes ao óleo de soja, tornando-o adequado para a produção de biodiesel.

II. Remoção de nutrientes

Os AOV são um substrato de carbono importante para auxiliar a remoção biológica (desnitrificação) de azoto e fósforo a partir de águas residuais, uma vez que ocorrem situações em que o substrato de carbono presente em águas residuais por vezes é insuficiente para manter uma remoção biológica de nutrientes estável.

III. Polihidroxialcanoatos

Os PHA são polímeros biodegradáveis que podem ser sintetizados por microrganismos, utilizando recursos renováveis como AOV. Os PHA têm uma ampla gama de aplicações em diversos setores industriais e são bons substitutos dos plásticos convencionais de origem petroquímica.

2.3 Polímeros e Biopolímeros

A palavra, polímero, vem do grego *polumeres*, que quer dizer “ter muitas partes”. Os polímeros são moléculas extensas constituídas pela repetição de pequenas e simples unidades químicas, denominadas de monómeros (do grego “mono” – um). Os polímeros são materiais orgânicos ou inorgânicos, naturais ou sintéticos, de alto peso molecular e podem dividir-se em 4 categorias: termoplásticos, termorrígidos, elastómeros (borrachas) e biopolímeros.

Os **Termoplásticos** são plásticos que constituem a maior parte dos polímeros comerciais. São exemplo de termoplásticos os Poliestirenos (PS), Policloreto de vinilo (PVC), poliuretano (PU), Politereftalato de etileno (PET), Polipropileno (PP) e Policarbonato (PC). A principal característica desses polímeros é poderem ser fundidos diversas vezes e, em alguns casos, também poderem ser dissolvidos em vários solventes. Estas características são desejáveis nos materiais, uma vez que permite a reciclagem dos mesmos. As propriedades mecânicas variam conforme o plástico, podendo à temperatura ambiente ser maleáveis, rígidos ou mesmo frágeis.

Os **Termorrígidos** apresentam grande estabilidade a variações de temperatura, podendo apresentar características rígidos e frágeis. Estes polímeros, ao contrário dos termoplásticos, dificilmente são recicláveis. O aquecimento do polímero a altas temperaturas promove a decomposição do material antes da sua fusão.

Os **Elastómeros (Borrachas)** são uma classe intermediária entre os termoplásticos e os termorrígidos, apresentando uma elevada elasticidade. O processo de reciclagem também é complicado devido à sua incapacidade de fusão.

Com a necessidade de procurar substitutos viáveis para os polímeros já existentes, derivados de combustíveis fósseis, tem sido cada vez maior o estudo de novas hipóteses. Os biopolímeros surgiram como uma potencial alternativa nas últimas décadas.

Os **Biopolímeros** são materiais poliméricos classificados estruturalmente como polissacarídeos, poliésteres ou poliamidas, produzidos por seres vivos. A matéria-prima principal para a sua produção é uma fonte de carbono renovável. Apresentam uma importância estratégica para o futuro por serem biodegradáveis e biocompatíveis, o que lhes conferem uma vasta gama de aplicações. Existem atualmente 3 tipos de biopolímeros a serem comercializados: polilactato (PLA), polihidroxicanoatos (PHA) e poliglicolatos (PGA) (Hottle *et al.*, 2013).

2.4 Polihidroxialcanoatos (PHA)

2.4.1 Estrutura e propriedades dos PHA

Em 1925, o poli-3-hidroxibutirato (PHB) foi o primeiro membro dos PHA a ser descoberto, como corpos de inclusão citoplasmático em *Bacillus megaterium*, quando o rácio glucose/azoto da cultura era elevado (Chee *et al.*, 2010). Desde 1960 desenvolveu-se um maior interesse na investigação de PHA, devido às suas propriedades e biossíntese (Madkour *et al.*, 2013).

Os PHA são sintetizados e armazenados na forma de grânulos intracelulares como reserva de carbono e energia (Figura 4) por uma vasta gama de géneros procariotas, utilizando vários substratos renováveis, tais como hexoses, pentoses, amido, sacarose, lactose, maltose, lípidos e álcoois (Koller *et al.*, 2013). A síntese do polímero ocorre em condições de excesso de carbono e deficiência de nutrientes (azoto, fósforo ou alguns microcomponentes) (Saharan *et al.*, 2014).

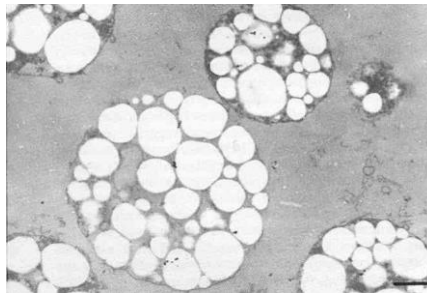


Figura 4 - Grânulos de PHA acumulados no interior de bactérias (Fonte: Serafim *et al.*, 2000).

Os PHA são termoplásticos totalmente biodegradáveis, biocompatíveis e renováveis (Serafim *et al.*, 2008), que apresentam propriedades semelhantes aos plásticos derivados do petróleo (Albuquerque *et al.*, 2010). Podem substituir vários dos plásticos convencionais existentes como o polietileno e o polipropileno, apresentando uma melhor resistência à radiação UV do que o polipropileno (Laycock *et al.*, 2014).

Cada vez mais são reconhecidos os potenciais para aplicações biotecnológicas e biomédicas devido à biocompatibilidade e biodegradabilidade deste tipo de biopolímero. Com a exploração das propriedades gerais dos PHA na combinação com outros materiais

surgiu uma vasta gama de aplicações em biotecnologia e medicina, desde a purificação de proteínas ao desenvolvimento de sistemas para libertação controlada de fármacos (Grage *et al.*, 2009).

Existem mais de uma centena de monómeros de PHA, capazes de serem acumulados em diferentes bactérias, sendo o polihidroxiбутирато (PHB - poli[3-hidroxiбутирато]) o mais comum e o mais bem caracterizado (Serafim *et al.*, 2000). O fator determinante que influencia a composição e as propriedades dos PHA é a natureza do substrato utilizado para alimentar os microrganismos (Reis *et al.*, 2003). Na Figura 5 encontra-se representada a estrutura química geral dos PHA, com alguns exemplos de polímeros obtidos com diferentes radicais.

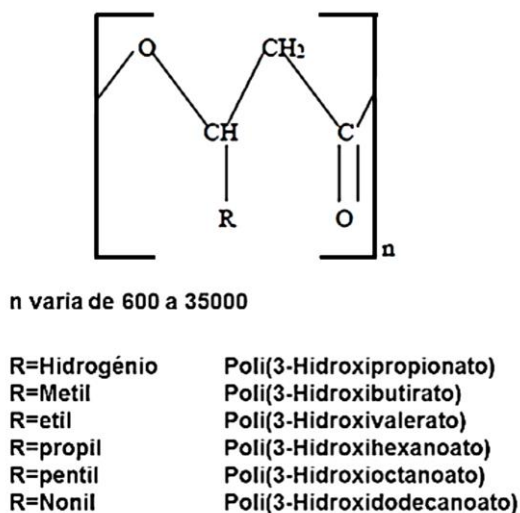


Figura 5 - Estrutura geral dos polihidroxiálcanoatos (adaptado de Khanna *et al.*, 2005)

Os PHA podem ser divididos em 2 grupos principais. No primeiro grupo são incluídos polímeros de cadeia monomérica curta, constituídos por monómeros com 3 a 5 átomos de carbono, como o PHB. O segundo grupo, também designado por co-polímeros, são polímeros com monómeros de cadeia média constituída por 6 a 18 átomos de carbono, sendo o Poli (3-hidroxiбутирато-co-3-hidroxi valerato) (P(3HB-co-3HV)) o mais comum (Laycock *et al.*, 2014). A diferença entre os grupos deve-se, na maior parte das vezes à especificidade do substrato utilizado na síntese dos PHA, que pode utilizar monómeros de diferentes gamas de comprimento (Khanna *et al.*, 2005).

2.4.2 Co-polímeros

O PHB, apesar de ser o PHA mais bem estudado e caracterizado, apresenta uma elevada cristalinidade, dificultando o seu processamento. O baixo intervalo entre a temperatura de decomposição (270 °C) e o ponto alto de fusão (180 °C) dificulta a sua utilização para várias técnicas de processamento. Uma maneira de ultrapassar esse problema passa pela interrupção da matriz cristalina de PHB através da adição de diferentes monómeros de PHA, nomeadamente o 3-hidroxicaproato (3HV) ou com uma cadeia quiral, como o 4-hidroxibutirato (4HB). Obtêm-se assim co-polímeros que permitem obter uma melhoria das propriedades mecânicas dos materiais para uma maior gama de aplicações (Arroja *et al.*, 2012; Koller *et al.*, 2013).

O tipo de PHA produzido pode ser determinado através da composição do substrato fornecido. Por exemplo, na presença de acetato é produzido preferencialmente o homopolímero P(3HB), enquanto que na presença de propionato é formado um co-polímero P(3HB-co-3HV) ou um terpopolímero sintetizado por 3HB, 3HV e 2-metil-3-hidroxicaproato (2M3HV), o P(3HB-co-3HV-co-2M3HV) (Serafim *et al.*, 2008).

2.4.3 Produção industrial e Aplicações dos PHA

No início da década de 80 várias empresas tentaram produzir PHA, a uma escala piloto ou industrial, na expectativa de haver um aumento do preço do petróleo devido à sua exaustão como recurso. Contudo, antes do ano 2001 não houve um aumento significativo do preço do petróleo, levando ao encerramento de projetos relacionados com PHA em várias empresas. Após 2001 o preço do barril de petróleo teve um aumento vertiginoso (103€/barril em 2008), incentivando o desenvolvimento de plásticos independentes do petróleo (Chen, 2009).

Atualmente são várias as empresas que produzem polímeros biodegradáveis, nomeadamente de polihidroxialcanoatos (PHA) (Tabela 2), polilactato (PLA) e poliglicolatos (PGA) (Serafim *et al.*, 2000), com diversas aplicações.

Os PHA apresentam um interesse maior para além das suas propriedades de biopolímero, pois podem ser utilizados como um biocombustível, uma base sólida para produtos da indústria química e, pelo facto de serem biocompatíveis, na medicina (Chen, 2009; Serafim *et al.*, 2000).

Tabela 2-Empresas investigadoras e produtoras de PHA a nível mundial (Fonte: Adaptado de Chen, 2009)

Companhia	Tipos de PHA	Escala de produção (t/a)	Período	Aplicações
ICI, Reino Unido	PHBV	300	1980s a 1990s	Embalagens
Chemie Linz, Áustria	PHB	20-100	1980s	Embalagens e Farmacêutica
btF, Áustria	PHB	20-100	1990s	Embalagens e Farmacêutica
Biomers, Alemanha	PHB	Incerto	1990s até ao presente	Embalagens e Farmacêutica
BASF, Alemanha	PHB, PHBV	Escala piloto	1980s a 2005	Mistura com Ecoflex
Metabolix, EUA	PHA variados	Incerto	1980s até ao presente	Embalagens
Tepha, EUA	PHA variados	PHA implantes médicos	1990s até ao presente	Implantes Biomédicos
ADM, EUA (com a Metabolix)	PHA variados	50000	2005 até ao presente	Matérias-primas
Meredian, EUA	PHA variados	10000	2007 até ao presente	Matérias-primas
Kaneka, Japão (com a P&G)	PHA variados	Incerto	1990s até ao presente	Embalagens
Bio-On, Itália	PHA (incerto)	10000	2008 até ao presente	Matérias-primas
Zhenjiang Tian An, China	PHBV	2000	1990s até ao presente	Matérias-primas
Jiangmen Biotech Ctr, China	PHBHHx	Incerto	1990s	Matérias-primas
Yikeman, Shandong, China	PHA (incerto)	3000	2008 até ao presente	Matérias-primas
Tianjin Northern Food, China	PHB	Escala piloto	1990s	Matérias-primas
Shantou Lianyi Biotech, China	PHA variados	Escala piloto	1990s a 2005	Embalagens e Medicina
Jiang Su Nan Tian, China	PHB	Escala piloto	1990s até ao presente	Matérias-primas
Shenzhen O'bioer, China	PHA variados	Incerto	2004 até ao presente	Incerto
Tianjin Green Bio-Science (+DSM)	P3HB4HB	10000	2004 até ao presente	Matérias-primas e Embalagens
Shandong Lukang, China	PHA variados	Escala piloto	2005 até ao presente	Matérias-primas e Medicina

Na medicina os PHA, nomeadamente PHB, PHBV, P3HB4HB, P4HB, P3HO (poli-(R)-3-hidroxiocetanoato) e PHBHHx (Chen, 2009) são frequentemente investigados para o fabrico de fios de sutura cirúrgica e produtos farmacêuticos utilizados em cirurgia, transplantes, engenharia de tecidos e farmacologia. É necessário um elevado nível de biocompatibilidade para que materiais estranhos possam ser incorporados no corpo humano. Recentemente tem sido estudada a aplicação de PHA como filme absorvente de óleos de cosméticos. Por estes serem biocompatíveis, podem ser produtos adequados para o tratamento cutâneo (Chee *et al.*, 2010).

Apesar das características atraentes dos PHA, a sua utilização para embalagem de alimentos, biomédicas e outras aplicações de maior volume ainda é limitada a pequenas quantidades, uma vez que ainda é dispendioso produzir este tipo de biopolímeros (Madkour *et al.*, 2013).

O rendimento de produção microbiana de PHA depende de vários fatores, incluindo a densidade final das células, a taxa de crescimento bacteriano, o percentual de PHA na célula de peso seco, o tempo necessário para atingir alta densidade celular final, o substrato para a eficiência de transformação do produto, preço de substratos e um método barato e conveniente para extrair e purificar o PHA (Chen, 2009).

Grande parte dos custos de produção de PHA é atribuída ao uso de substratos ricos em carbono (Koller *et al.*, 2013), não descurando também o tipo de processo e rendimento, e a eficiência de extração do polímero a partir das células (Serafim *et al.*, 2008).

Os produtores industriais estão a tentar encontrar soluções para reduzir o preço de produção ao aumentar a sua capacidade de produção, melhorando as suas tecnologias de processamento. A utilização de culturas microbiológicas mistas permite a aplicação de substratos de menor qualidade, uma vez que a população microbiana facilmente se adapta a alterações no substrato, não necessitando de condições estéreis (Reis *et al.*, 2003).

2.5 Produção biológica de PHA

2.5.1 Microrganismos produtores de PHA

A síntese de PHA por parte dos microrganismos é importante, uma vez que estes são responsáveis por desempenhar funções biológicas importantes. Funcionam principalmente como reservas intracelular de energia e de carbono, quando as bactérias se encontram expostas a um meio com limitações de nutrientes (normalmente azoto) (Verlinden *et al.*, 2007), que podem ser reutilizados em condições de limitação de carbono. São cruciais para a regulação do fluxo de energia intracelular, reencaminhando os compostos de carbono para as vias metabólicas e atuando como fatores de proteção contra as pressões ambientais, como choques osmóticos, radiação UV, dessecação, calor e stress oxidativo (Koller *et al.*, 2013).

Os PHA são uma família de polímeros que servem como armazém de carbono/energia para mais de 300 espécies de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, bem como uma grande variedade de bactérias do domínio Archaea (Laycock *et al.*, 2014). Na Tabela 3 podemos observar algumas estirpes características produtoras de PHA para diferentes tipos de substratos.

Tabela 3 - Bactérias utilizadas para produção de PHA com diferentes substratos (adaptado de Chee et al., 2010)

Estirpes	Tipo de PHA	Substratos
<i>Alcaligenes Latus</i> DSM 1124	P(3HB)	Resíduos de Soja, resíduos de malte
<i>Bacillus megaterium</i>	P(3HB)	Melaço de Beterraba, xarope de tâmaras
<i>Burkholderia sp.</i> USM (JCM 15050)	P(3HB)	Derivados de óleo de palma, ácidos gordos, glicerol
<i>Comamonas testosteroni</i>	MCL-PHA	Óleo de ricínio, óleo de coco, óleo de mostarda, óleo de algodão, óleo de amendoim, azeite, óleo de sésamo
<i>Ralstonia eutropha</i>	P(3HB)	Hidrolisados de bagaço
<i>Ralstonia eutropha</i> H16	P(3HB-co-3HV)	Óleo de sementes de palma bruto, azeite, óleo de girassol, óleo de sementes de palma, óleo de cozinha, óleo de palma refinado, óleo de palma bruto, óleo de coco com propionato de sódio
<i>Ralstonia eutropha</i> DSM 545	P(3HB)	Resíduos de Glicerol
Recombinante <i>Ralstonia eutropha</i>	P(3HB-co-3HHx)	Óleo de sementes de palma, óleo de palma refinado, óleo de palma bruto, óleo de palma acidificado
Recombinante <i>Escherichia coli</i>	P(3HB-co-3HHx-co-3HO)	Óleo de sementes de soja
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IFO3934	MCL PHA	Óleo de palma
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NCIB 40045	MCL PHA	Resíduos de óleo de cozinha
<i>Pseudomonas guezennei</i> biovar. <i>Rikehau</i>	MCL PHA	Óleo de coco concentrado
<i>Thermus thermophilus</i> HBS	P(3HB-co-3HV)	Soro de queijo

MCL – Medium Chain Length

2.5.2 Culturas Puras Vs Culturas Mistas

Atualmente a produção de PHA a nível comercial é feita a partir de culturas microbiológicas puras (culturas constituídas por uma única estirpe bacteriana). Essas culturas são capazes de acumular PHA até 90% do peso seco da célula (Serafim *et al.*, 2008). Contudo, é necessário trabalhar em condições estéreis, o que torna o processo de produção oneroso a nível energético e de equipamentos a usar (Marang *et al.*, 2013).

Os substratos utilizados nos processos de produção industrial são açúcares puros (glucose e sacarose) ou derivados (milho), que têm um elevado valor comercial, fazendo com que os biopolímeros não apresentem preços competitivos (8€/kg polihidrobutilato [PHB] contra 1€/kg plásticos fósseis) (Reis *et al.*, 2003; Serafim, Lemos and Reis, 2000).

A utilização de substratos ricos em carbono de menor qualidade permite reduzir os custos envolvidos no processo de produção de PHA. No entanto, isso apenas é possível utilizando culturas microbianas mistas pois estas apresentam vantagens importantes, como a capacidade de adaptação a alterações de substrato/operação, a robustez da cultura, além de não necessitarem de condições estéreis (Pardelha *et al.*, 2013; Valentino *et al.*, 2013).

Ao utilizar culturas mistas, é imposta uma forte pressão seletiva sobre as bactérias presentes, havendo a proliferação e competição de bactérias com capacidade de acumular PHA. Assim é possível obter uma cultura praticamente pura, com a vantagem de não necessitar de condições estéreis (Johnson *et al.*, 2009). Estima-se que o custo de produção ronde o 3 - 4 €/kg PHA (Akaraonye *et al.*, 2010). Esta redução de custos é impulsionada principalmente pela redução dos custos de substrato (85% menor) e os custos de capital para investimentos (50% inferior) (Reis *et al.*, 2003).

Um possível problema que surge com a utilização de culturas mistas é a estabilidade que estas possam apresentar. No entanto, Johnson *et al.* (2009) afirma que foi possível manter uma cultura estável durante 4 anos, assim como Serafim *et al.* (2008), durante quase 2 anos.

2.6 Reatores para produção de PHA

2.6.1 Reatores semi-contínuos (SBR)

A otimização da produção de PHA tem de passar necessariamente pela seleção da configuração de reator e das condições de operação que conduzam à obtenção de rendimentos e produtividades elevadas (Albuquerque *et al.*, 2012). A configuração de reator mais utilizado para estudar a produção de PHA através de culturas mistas, seguindo o regime de “Fartura e Fome” (FF), é o reator descontínuo sequencial (SBR). Os SBR são reatores ideais para selecionar populações microbianas com elevada capacidade de acumulação de PHA, porque a biomassa cresce em condições transientes. Este tipo de reator é fácil de controlar e é altamente flexível, permitindo a alteração rápida dos ciclos de operação (duração da alimentação e extensão do ciclo) (Serafim, Lemos and Reis, 2000).

Estudos efetuados por Johnson *et al.* (2009) demonstram que é possível obter culturas com elevada acumulação de PHA utilizando condições de Fartura/Fome em SBR, usando reduzidos número de ciclos por cada tempo de retenção de sólidos.

2.6.2 Regime Fartura/Fome

Majone, em 1996, foi o primeiro a propor o conceito de Fartura/Fome, permitindo que nas últimas décadas muitos autores pudessem operar SBR). Sob condições de FF os microorganismos que armazenarem mais rapidamente o substrato têm uma vantagem competitiva, permitindo que ocorra a seleção de culturas enriquecidas em organismos com maior capacidade de armazenamento de PHA (Albuquerque *et al.*, 2012).

O regime FF, como o nome indica apresenta duas fases distintas de operação do SBR. A fase de Fartura, na qual é fornecido um excesso de carbono no meio da cultura, permite que esta consuma o carbono e o acumule sob a forma de PHA. Nesta altura a quantidade de enzimas ou RNA necessário para o crescimento celular é reduzido, tornando o fenómeno de acumulação dominante no período de alimentação. Caso a fase de Fartura apresentasse um período de tempo longo, poderia haver uma adaptação

fisiológica por parte dos microrganismos, tornando o processo de crescimento celular dominante.

A fase de Fome terá de ser obrigatoriamente maior, pois é a fase que determina quais as espécies capazes de acumular PHA como reserva de carbono e energia, permitindo sobreviver, conferindo uma vantagem competitiva sobre as restantes, tornando-as dominantes. A ausência de substrato durante um longo período de tempo causa a diminuição da quantidade de componentes intracelulares (RNA e enzimas) necessárias para o crescimento celular (Saharan *et al.*, 2014).

Na Figura 6 é possível observar a operação de um ciclo num reator SBR. Na fase de Fartura ocorre um declínio da concentração de carbono, assim como um aumento na síntese de PHA. Verifica-se que após a exaustão do substrato inicia-se a fase de Fome, levando ao consumo gradual do PHA acumulado pelas bactérias.

É importante compreender o regime Fartura/Fome, para se obter uma otimização das condições de operação do reator e conseguir alcançar uma cultura mista com elevada capacidade de acumulação de PHA (Serafim *et al.*, 2008; Serafim *et al.*, 2000).

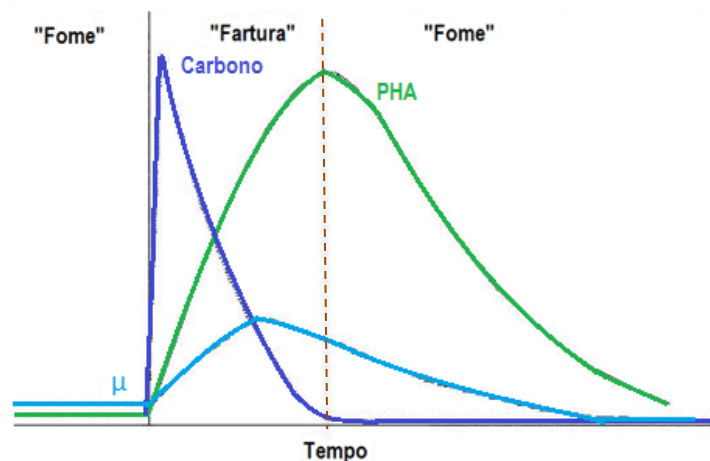


Figura 6 - Ciclo num reator SBR em regime Fartura/Fome (μ representa o crescimento celular) (Fonte: (Serafim *et al.*, 2000))

2.7 Fontes de carbono para produção de PHA

2.7.1 AOV como fontes de carbono para produção de PHA

Anualmente há descargas de elevadas quantidades de resíduos ricos em carbono por parte de indústrias agrícolas e de processamento alimentar. Estes resíduos apresentam um grande potencial como matéria-prima rica em carbono para a produção de PHA, permitindo reduzir o custo de substratos e economizar o custo de eliminação de resíduos (Chee *et al.*, 2010).

Um dos objetivos ao utilizar culturas mistas para produção de PHA é a substituição de substratos puros (glicose e sacarose) por efluentes/resíduos orgânicos ricos em carbono. Contudo, culturas mistas sujeitas a um regime de FF não conseguem processar compostos açucarados, havendo a necessidade de haver um tratamento anaeróbio prévio, convertendo os compostos em AOV para servir como substrato (Serafim *et al.*, 2008).

Os AOV podem ser facilmente armazenados como PHA por culturas mistas, razão pela qual grande parte dos estudos efetuados sobre culturas mistas utilizem ácidos orgânicos voláteis como substrato (Laycock *et al.*, 2014).

2.7.2 Metabolismo de acumulação de PHA a partir de AOV

O metabolismo para a síntese de PHA está bem estabelecido para culturas microbianas puras, enquanto apenas alguns estudos metabólicos foram relatados para culturas mistas. Supõe-se que, para o mesmo substrato, o metabolismo de PHA em culturas mistas seja semelhante ao conhecido para culturas puras (Serafim *et al.*, 2008). É importante conhecer os mecanismos envolvidos na síntese de PHA, uma vez que estes permitem determinar quais os tipos de polímeros que poderão emergir utilizando diferentes substratos (Pardelha *et al.*, 2012).

Os substratos preferenciais para a produção de PHA são ácidos orgânicos e/ou açúcares. No caso dos AOV (acetato, propionato, butirato, valerato), estes atravessam a membrana celular e são convertidos a coenzimas-A (acetil-CoA ou propionil-CoA).

Na Figura 7 encontra-se representado esquematicamente o metabolismo de conversão de AOV em PHA. Podemos observar que o acetato condensa duas moléculas de acetil-CoA para acetoacetil-CoA. O produto obtido é convertido em (R)-3-hidroxi-3-butil-CoA, devido à redução do NADPH a NADP⁺, sintetizando posteriormente o polímero poli-3-hidroxi-3-butilato (P(3HB)) através de enzimas. O propionato pode sintetizar dois tipos de polímeros diferentes: a condensação de duas moléculas de propionil-CoA originam 3-hidroxi-2-metilvaleril-CoA, o precursor do co-polímero poli-3-hidroxi-2-metilvalerato (P(3H2MV)), e pode ocorrer a descarboxilação da propionil-CoA a acetil-CoA, e daí surgir a síntese de homopolímero PHB.

Caso suceda a mistura de substratos, em que ocorra a quebra do acetil, a mistura das moléculas de acetil e propionil-CoA podem produzir os precursores poli-3-hidroxi-3-butilato (P(3HB)) ou poli-3-hidroxi-2-metilbutirato (P(3H2MB)). O butirato e valerato podem produzir diretamente P(3HB) e P(3HV). Estes quatro polímeros de cadeia curta são os que se formam com maior frequência.

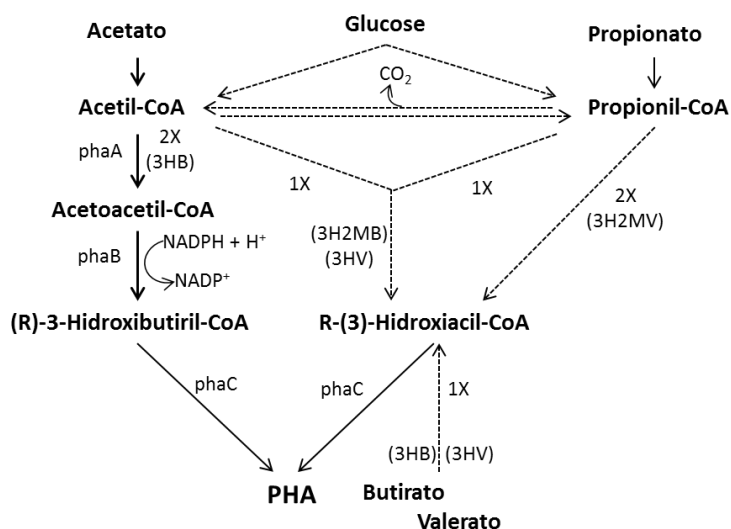


Figura 7 - Metabolismo de conversão de AOV a PHA (adaptado de Serafim *et al.*, 2008)

A formação de um co-polímero contendo unidades de 3HB e 3HV altera as propriedades do material, conduzindo a uma diminuição da cristalinidade e da temperatura de fusão, obtendo-se um polímero menos rígido e mais resistente, que proporciona melhores condições de processamento (Albuquerque *et al.*, 2011). Conseqüentemente, as propriedades do co-polímero podem ser ajustadas variando a composição relativa dos ácidos orgânicos presentes no meio de cultura. Torna-se importante perceber o metabolismo de conversão de múltiplos AOV para garantir uma otimização da racionalização dos substratos de alimentação e produção do tipo de polímero desejado.

2.8 Objetivos

A realização deste trabalho teve por objetivo a obtenção de culturas acumuladoras de PHA a partir de um substrato de resíduos orgânicos acidificados. Este processo permite a valorização de efluentes e resíduos sólidos urbanos através da utilização de ácidos orgânicos voláteis, obtidos por fermentação acidogénica de efluentes e resíduos orgânicos. Esses AOV obtidos na fase acidogénica (trabalho não constante nesta tese) foram utilizados como substrato para culturas microbianas mistas para produção de PHA, em reatores SBR e ensaios descontínuos para maximização da concentração de polímero acumulado.

Foram testadas várias condições para a otimização da acumulação de PHA, por parte das bactérias. Testaram-se inóculos (lamas ativadas) provenientes de três estações de tratamento de águas residuais diferentes, sendo dois de ETAR municipais (SimRia Norte e Sul) e um de ETAR industrial (Prio Energy). Variou-se a carga orgânica aplicada a nível do substrato entre 1 e 4 g/L e testaram-se substratos da FORSU e Soro de Queijo para ensaios de acumulação em reatores descontínuos.

Metodologia

3. Metodologia

Neste estudo foram operados dois tipos de reatores com finalidades diferentes. Inicialmente foi utilizado um reator semi-descontínuo (SBR) para se proceder à seleção de culturas acumuladoras de PHA, procedendo-se, após a seleção, a uma acumulação de PHA em reatores descontínuos.

3.1 Reatores semi-descontínuos (SBR)

3.1.1 Instalação experimental

Para proceder à selecção de culturas mistas acumuladoras de PHA foram utilizados reatores SBR (*Sequencing Batch Reactor*) em acrílico, com volume útil de 5L. Os SBR foram inoculados com lamas (biomassa) existentes em Estações de Tratamento de Águas Residuais de sistemas de lamas ativadas. O arejamento do reator foi efetuado a partir de difusores colocados na base do reator, de maneira a proporcionar uma melhor agitação da biomassa e facilitar as transferências de oxigénio.

Cada reator operou em ciclos de 24h, que se iniciavam com a adição de 1L de substrato (duração de 25 min), seguido de um período de arejamento de 23h05min, de maneira a garantir a selecção de cultura acumuladoras de PHA segundo um regime Fatura/Fome. Cada ciclo finaliza com um período de sedimentação de 30 min e uma decantação de 25 min, na qual é removido 1L de efluente do reator para um sedimentador colocado ao lado do reator.

No topo do reator SBR encontravam-se mergulhados os eléctrodos de pH e de oxigénio, tal como representado na Figura 8. O controlo de pH foi feito por um sistema automático, que adicionava ácido clorídrico (1M) quando o pH ultrapassava valores de 7,9; esta adição de ácido era efetuada com auxílio de uma bomba peristáltica previamente calibrada. Os eléctrodos encontravam-se ligados a um sistema que permitia efectuar a gravação dos dados de oxigénio dissolvido e pH adquiridos ao longo do tempo.

A alimentação do SBR foi efetuada através de uma bomba peristáltica (Watson-Marlow 101UR), previamente calibrada para o caudal desejado. Ao longo dos ensaios em

SBR efectuados foram realizadas análises de controlo da qualidade do efluente à saída do reator. Os parâmetros analisados foram os sólidos suspensos totais e voláteis, a Carência Química de Oxigénio (CQO) total e solúvel, a concentração de AOV e do carbono orgânico total (TOC). O conteúdo do reator foi analisado periodicamente em termos dos sólidos suspensos totais e voláteis, CQO solúvel e concentração de AOV. Na alimentação foram efetuadas análises para a determinação das concentrações de CQO (total e solúvel) e da concentração de AOV.

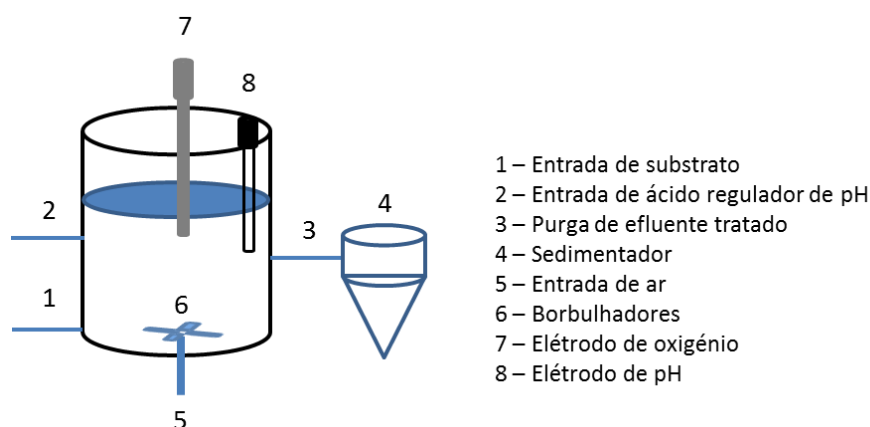


Figura 8 - Esquema representativo da instalação experimental.

3.1.2 Inóculos

No decorrer deste trabalho foram testados diferentes inóculos para avaliar aquele onde seria obtida a melhor seleção de culturas produtoras de PHA. Os inóculos utilizados foram provenientes de três Estações de Tratamento de Águas Residuais: ETAR Norte SimRia, ETAR Sul SimRia e ETAR da empresa Prio Energy. Na Tabela 4 são apresentadas as caracterizações referentes a cada inóculo, no que diz respeito à concentração de sólidos.

Tabela 4 - Inóculos utilizados nos ensaios SBR e sua caracterização em termos de sólidos.

ETAR	SST [g/L]	SSV [g/L]	% SSV
SimRia Norte	2,88	2,73	95
Prio Energy	7,30	6,79	93
SimRia Sul	14,58	12,49	86

3.1.3 Condições de operação

O tempo de retenção de sólidos (TRS) imposto foi de 10 dias e o tempo de retenção hidráulico (TRH) foi de 5 dias. O funcionamento dos ciclos de cada reator foi monitorizado por temporizadores que permitiam controlar o caudal hidráulico ao longo do período de operação. Os reatores operaram com um caudal de 1 L/d, apresentando uma decantação de 1 L num período de tempo de 25 min. Após esse período de decantação ocorria uma nova entrada de substrato de 1L também com uma duração de 25 min. A purga dos reatores SBR é precedida por um período de sedimentação de 30 min.

Um período de alimentação curto com um baixo número de ciclos diários serve para garantir a selecção de microrganismos formadores de flocos e um baixo índice de volume de lama (Tandoi *et al.*, 2006). O ciclo imposto apresenta uma duração de 24h, operando segundo um regime de Fatura/Fome.

As cargas orgânicas impostas foram na maioria dos casos iguais, variando apenas nos últimos SBR operados, de maneira a verificar a influência de diferentes cargas orgânicas na acumulação de PHA por parte das bactérias. Na Tabela 5 encontram-se expostas as condições aplicadas a cada reator SBR.

Tabela 5 - Quadro resumo das condições de operação dos SBR.

Ensaio	Carga [g _{CCO} /L.d]	TRS [d]	Q [L/d]	TRH [d]	Ciclo [h]	Sedimentação [min]	Decantação [min]	Alimentação [min]
SBR1	2	10	1	5	24	30	25	25
SBR2	2	10	1	5	24	30	25	25
SBR3	2	10	1	5	24	30	25	25
SBR4	2	10	1	5	24	30	25	25
SBR5	4	10	1	5	24	30	25	25
SBR6	1	10	1	5	24	30	25	25
SBR7	1	10	1	5	24	30	25	25

3.1.4 Nutrientes e Meio Mineral

A alimentação continha uma mistura de AOV, nomeadamente ácido propiónico, butírico e acético (com uma proporção de 1:1:1). Além da fonte de carbono, adicionada em concentração conhecida, foram adicionadas soluções para suplementação de fósforo, azoto, micronutrientes e macronutrientes. A constituição das soluções de micro e macro nutrientes encontra-se na Tabela 6. As soluções stock de fósforo e azoto continham 100 g/L de KH_2PO_4 e 100 g/L de NH_4Cl , respetivamente e foi adicionada uma quantidade definida de cada solução, por forma a manter o rácio C:N:P de 100:7:1.

Tabela 6 - Meio mineral e Micronutrientes utilizados nos reatores SBR.

Meio Mineral		Micronutrientes	
Composto	[mg/L]	Composto	[mg/L]
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5000	H_3BO_3	150
EDTA	150	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	15
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2500	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	100
Tiourea	1000	ZnCl_2	50
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	100	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	25
		$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	5
		$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	10
		KI	15

3.1.5 Medição de pH e Oxigénio Dissolvido

O pH no interior do reator foi medido e controlado por um transmissor/controlador Alpha pH 1000 da Thermo Scientific™, usando um eletrodo de pH Polyclave.

O oxigénio dissolvido no meio de fermentação foi medido recorrendo a um transmissor Alpha DO 2000 da Thermo Scientific™ através de uma sonda de oxigénio Inpro 6800 Mettler-Toledo.

3.2 Reatores descontínuos

3.2.1 Inóculo, nutrientes e meio mineral

Os inóculos utilizados em cada ensaio descontínuo eram provenientes dos reatores SBR em funcionamento, após um período de funcionamento de pelo menos 15 dias. Antes do término de cada ciclo, foi recolhido 1 L de lamas do interior do reator, para a realização dos ensaios de acumulação, com uma concentração em SSV de aproximadamente 3 g_{SSV}/L.

Ao volume final foi adicionada a quantidade correspondente de fósforo, micro e macronutrientes (constituição na Tabela 6). Amónia não foi adicionada nestes ensaios de acumulação uma vez que nesta etapa se pretendeu maximizar a acumulação de polímero e não o crescimento da biomassa. A quantidade de amónia nestes ensaios era, assim, residual e apenas proveniente dos reatores de seleção (SBR).

Os ensaios em descontínuo foram monitorizados ao longo do tempo de realização, em intervalos de tempo entre 1 a 2 h. Ao longo do tempo foram efetuadas análises ao pH, concentração de AOV, concentração de PHA e CQO solúvel. No início e final de cada ensaio foram analisados, além dos parâmetros já referidos, os sólidos suspensos totais e voláteis e TOC. As análises microbiológicas, nomeadamente por observação direta e coloração de Azul do Nilo, foram efetuadas em todas as amostras retiradas ao longo dos ensaios descontínuos.

3.2.2 Condições de operação

As condições de operação em cada reator descontínuo apresentam-se na Tabela 7. Cada ensaio foi efetuado com 1 L de biomassa proveniente dos reatores SBR, em recipientes de volume útil de 2 L, suplementados com arejamento e agitação magnética durante todo o período de realização dos ensaios.

Tabela 7 – Condições de operação de reatores descontínuos.

Ensaio	Tipo de substrato	Origem da biomassa (reator SBR)	Concentração de substrato [g/L]	SSV [g/L]	pH inicial	Duração [h]	Nº de pulsos (de substrato)
1	FORSU fermentada	5	4	4,58	8,80	47	1
2	Soro de queijo fermentado	7	1	2,17	7,61	7,5	2
3	Soro de queijo fermentado sem proteínas	7	1	2,35	7,83	6,9	1
4	Soro de queijo fermentado	7	2	2,27	7,83	28,4	4

3.3. Métodos analíticos

3.3.1 Sólidos

Os filtros de fibra de vidro (Whatman Reeve Angel® *grade* 403) e cadinhos de porcelana a utilizar foram calcinados previamente numa mufla (Thermolab®) durante 1 hora a 550 °C e apenas foram pesados em balança analítica (Precisa® XB-120A) após o arrefecimento à temperatura ambiente num exsicador ($Massa_{\text{cadinho+filtro}}$). A quantificação dos Sólidos Suspensos Totais (SST) foi efetuada através da filtração de um determinado volume de uma amostra homogeneizada ($Volume\ de\ amostra$), recolhida à saída do reator. O filtro foi seco numa estufa (Binder®) a 105 °C, durante 24 horas, com posterior pesagem da amostra obtida ($Massa_{\text{após_estufa}}$) (método 2540D, APHA (2005)).

Para a quantificação dos Sólidos Suspensos Voláteis (SSV), os filtros obtidos anteriormente e depois da pesagem dos SST foram levados à mufla a 550 °C durante 2 horas, sendo pesados após arrefecimento até à temperatura ambiente ($Massa_{\text{após_mufla}}$) (método 2540E, APHA (2005)).

Os SSV representam a matéria orgânica em suspensão presente na amostra, ao passo que os SST correspondem à matéria orgânica e inorgânica em suspensão na amostra. As amostras foram sempre processadas com três réplicas. Para o cálculo dos SST e SSV recorre-se à Equação 1 e 2.

$$SST \left[\frac{g}{L} \right] = \frac{Massa_{\text{após_estufa}}[g] - Massa_{\text{cadinho+filtro}}[g]}{Volume\ de\ amostra\ [mL]} \times 1000 \quad (1)$$

$$SSV \left[\frac{g}{L} \right] = \frac{Massa_{\text{após_Mufla}}[g] - Massa_{\text{cadinho+filtro}}[g]}{Volume\ de\ amostra\ [mL]} \times 1000 \quad (2)$$

3.3.2 Carência Química de Oxigênio (CQO)

Este parâmetro permite quantificar a quantidade de oxigênio equivalente à fração orgânica da amostra, suscetível de ser oxidada por um oxidante químico, em condições controladas. Nesta análise, recorreu-se ao método de refluxo fechado e determinação em espectrofotometria (método 5520D descrito em APHA (2005)).

Efetuuou-se uma digestão das amostras durante 2 horas, a uma temperatura de 150 °C com dicromato de potássio (para a oxidação da matéria orgânica), ácido sulfúrico (para que o meio fosse ácido) e sulfato de prata, sendo estes reagentes responsáveis pela oxidação de álcoois e ácidos de cadeia longa, e sulfato de mercúrio que elimina a interferência de cloretos nas amostras. A solução é composta por 2,5 mL de amostra, 1,5 mL de dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) contendo sal de mercúrio ($HgSO_4$) e 3,5 mL ácido sulfúrico (H_2SO_4) com sulfato de prata (Ag_2SO_4).

Terminada a digestão das amostras, estas foram arrefecidas à temperatura ambiente, para posterior determinação por espectrofotometria da quantidade de dicromato de potássio que não reagiu.

As absorvâncias das amostras digeridas foram determinadas com um espectrofotómetro (marca Aqualytic, modelo PC023212), que permite a conversão direta das absorvâncias das amostras em concentração [$mg\ O_2/L$]. Para a leitura dos valores de CQO solúvel o processo foi análogo só que a amostra foi previamente filtrada com um filtro de fibra de vidro.

3.3.3 Quantificação de AOV

Neste trabalho foi realizada a determinação da concentração de ácidos orgânicos voláteis (acético, propiónico, iso-butírico, n-butírico, iso-valérico, n-valérico e n-capróico), tendo sido utilizado um cromatógrafo gás-líquido (marca PerkinElmer, modelo Clarus 480), com detetor de ionização de chama (FID), acoplado a um computador com *software* de integração TotalChom Navigator. Na Tabela 8, encontram-se as condições de operação do cromatógrafo. As amostras utilizadas para a análise dos AOV foram previamente filtradas e acidificadas com ácido fórmico (1:10 (v/v)) e armazenadas a 4 °C em tubos *ependorfs*, até serem analisadas.

Tabela 8 - Condições de operação do cromatógrafo.

Tipo de gases	Hélio (gás de arraste) Hidrogénio (gás da chama) Ar constituído (gás da chama)
Caraterísticas da coluna	SGE (25m X 0,53mm) ID-BPI 5,0µm
Temperaturas	Detetor (240 °C) Forno (70 °C) Injector (300 °C)
Software de Injeção	TotalChom Navigator
Volume de amostra	0,5 µL
Tempo de corrida	12,2 min

A curva de calibração foi obtida por injeções de padrões de ácido acético (Ac), ácido propiónico (Pr), ácido iso-butírico (i-Bu), ácido n-butírico (n-Bu), ácido iso-valérico (i-Val), ácido n-valérico (n-Val) e ácido n-capróico (n-Ca). As concentrações de AOV foram convertidas a CQO de acordo com a seguinte estequiometria de oxidação apresentada na Tabela 9.

Tabela 9 - Estequiometria de oxidação de AOV a CQO

Ac [mg _{CQO} /mg Ac]	Pr [mg _{CQO} /mg Pr]	i-Bu [mg _{CQO} /mg i-Bu]	n-Bu [mg _{CQO} /mg n-Bu]	i-Val [mg _{CQO} /mg i-Val]	n-Val [mg _{CQO} /mg n- Val]	n-Ca [mg _{CQO} /mg n- Ca]
1,067	1,514	1,818	1,818	2,039	2,039	2,207

O programa de temperaturas para análise de AOV utilizado foi o seguinte: arranque a 70 °C durante 1 minuto, após esta fase a temperatura subia 20 °C por minuto

até atingir a temperatura de 100 °C, e mantinha-se a essa temperatura durante 2 minutos. A temperatura sobe novamente 10 °C por minuto até aos 140 °C e assim permanecia durante 1 minuto e por fim a temperatura elevava-se 30 °C por minuto até aos 220 °C, totalizando 12.2min de tempo total de corrida.

3.3.4 Carbono orgânico total (TOC)

O Carbono Orgânico na água e em águas residuais é constituído por uma grande variedade de compostos orgânicos em vários estados de oxidação. Alguns destes compostos de carbono podem ser oxidados por processos biológicos ou químicos, podendo a sua fração ser calculada através da CQO e da CBO (Carência Bioquímica em Oxigénio).

O Carbono Orgânico Total (TOC) é uma análise muito mais direta para o cálculo do teor de carbono orgânico total do que a análise da CQO ou da CBO, apesar de não fornecer o mesmo tipo de informação.

Para a quantificação do TOC foi utilizado um analisador multi N/C 2100S analytikjena, com o *software* multiWin que fornece os dados obtidos no aparelho. A quantificação do carbono orgânico total é feita através de duas injeções por cada amostra, uma inicial para determinar o carbono inorgânico total (TIC) e uma segunda para determinação do carbono total (TC).

Inicialmente é detetado no aparelho o carbono inorgânico total (TIC) presente em hidratos de carbono, carbonatos e CO₂ livre. São injetados 200 µL de amostra diretamente numa câmara de combustão, que permite apenas a volatilização da amostra na forma de CO₂ (removendo a água ou outros resíduos que não contêm carbono), para posterior quantificação num detetor de carbono NDIR®.

Uma segunda injeção de 200 µL de amostra, numa fornalha de combustão, permite a determinação do carbono total presente na amostra, através de uma pirólise e oxidação com a ajuda de um catalisador (ácido fosfórico). Os carbonos estáveis e complexos da amostra são volatilizados na forma de CO₂, passando por um condensador

para a remoção de água e resíduos que não contenham carbono, permitindo a quantificação do carbono total sob a forma de CO₂, num detetor de carbono NDIR®.

A quantificação do TOC é efetuada através da diferença entre o valor de carbono total obtido e de carbono inorgânico, fornecidos diretamente pelo programa.

3.3.5 Azoto total

A quantificação de azoto total foi efetuada da mesma forma que o carbono orgânico total. Esta quantificação decorreu ao mesmo tempo de amostragem do TOC, utilizando o mesmo equipamento. A sua determinação acontece na segunda injeção de amostra no aparelho descrita em 3.3.3, passando pelos mesmos processos, sendo quantificado sob a forma de óxido de azoto (NO) num detetor de azoto, disponibilizando de imediato a quantidade de azoto presente na amostra.

3.3.6 Quantificação de PHA

A determinação da quantidade de PHA presente na biomassa fundamentou-se nos métodos desenvolvidos por Braunegg et al. (1978) e Comeau et al. (1988). Contudo, foram introduzidas pequenas alterações que englobam o tratamento prévio das amostras de biomassa para destruição das células, libertação do polímero intracelular e hidrólise das suas cadeias, e posterior metilação dos seus monómeros. Desta maneira, tornou-se viável a quantificação por cromatografia gasosa (cromatógrafo gás-líquido de marca PerkinElmer, modelo Clarus 480).

Recolheram-se 2 mL de amostra proveniente dos reatores SBR ou dos reatores descontínuos, que foram centrifugadas durante 5 minutos a 5000 rpm. O pellet obtido foi ressuspenso em NaCl 0,9% para lavagem da biomassa e novamente centrifugado. O líquido sobrenadante foi descartado enquanto a fase sólida foi congelada a -12 °C. Posteriormente, liofilizaram-se as amostras e foram preservadas num exsiccador.

A preparação das amostras foi efetuada seguindo os seguintes passos:

1) Introduziu-se um pellet de aproximadamente 2 mg num tubo de digestão, ressuspendido em metanol acidificado com 20% de ácido sulfúrico (H₂SO₄) (Fluka®);

2) Adicionou-se à amostra 1 mL de clorofórmio (Sigma®), cuja concentração de heptadecano (Sigma®) era de 0,6676 mg.mL⁻¹ (padrão-interno considerado para o método cromatográfico);

3) Durante 3 h 30 min, a amostra foi digerida a 100 °C num termobloco Seleta® DQ06. Após arrefecimento, adicionou-se 0,5 mL de água destilada e agitou-se em vórtex (VWR®) durante 60 s;

4) Aquando da separação das fases no interior do tubo, foi recolhido 1 mL da fase orgânica para o vial de cromatografia, cujos peneiros moleculares apresentavam um diâmetro de 0,3 mm (AlfaAesar®) para retenção da água remanescente no vial.

A curva de calibração foi obtida pela injeção de padrões contendo diferentes concentrações de PHB e PHV.

Tabela 10 – Condições de operação do cromatógrafo para quantificação de PHA

Tipo de gases	Hélio (gás de arraste)
	Hidrogénio (gás da chama)
	Ar (gás da chama)
Coluna Capilar	SGE (60 M X 0,32 mm) ID-BP20 5,0 µm
Temperaturas	Detetor (250 °C)
	Forno (50 °C)
	Injetor (250 °C)
Software de Integração	TotalChom Navigator
Volume de amostra	0,5 µL
Tempo de corrida	20 min

O programa de temperaturas utilizado para análise de PHA foi o seguinte: arranque a 50 °C, subindo a temperatura 16 °C por minuto até atingir a temperatura de 100 °C. A temperatura eleva-se novamente a 9 °C por minuto até aos 225 °C e assim permanecia durante 3 minutos, totalizando 20 min de tempo total de corrida.

O gás de arraste (Hélio) é mantido a uma pressão de 15 psi ao longo de todo o processo de quantificação de PHA.

3.4 Técnicas microscópicas

3.4.1 Observação direta das amostras

O método universal de observação direta ao microscópio é um método importante que permite ter uma primeira ideia do desempenho dos reatores (seleção de culturas microbianas com acumulação de PHA). Apesar de ser um método simples, é muito importante para identificar alguns dos microrganismos presentes 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, com ajuda de papel absorvente, para eliminar 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 óptico. Neste trabalho foi utilizado o microscópio Carl Zeiss Axio Imager A2, ligado a uma câmara Carl Zeiss AxioCam MRm (Figura 9) que por sua vez está ligada a um computador. Através do programa de *software* AxioVision Rel. 4.8. instalado no computador é possível obter imagens a preto e branco daquilo que se observa. Os filtros para esta observação são de contraste de fase e as objetivas utilizadas para observação da amostra são de ampliação 10x, 40x e 100x. A ocular tem um conjunto de lentes que ampliam mais 10x o material a ser observado.



Figura 9 - Imagem do microscópio Carl Zeiss usado no laboratório de microbiologia.

3.4.2 Coloração de Azul do Nilo

A técnica de coloração com o corante Azul do Nilo permite detetar grânulos de PHA no citoplasma das células selecionadas. 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) e emite coloração vermelha fluorescente. A coloração vermelha deve-se 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.

Em anexo encontram-se descritas as soluções usadas para este método de coloração.

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

3.4.3 FISH

Este método permite diferenciar populações microbianas específicas capazes de produzir PHA, de entre um conjunto tão vasto que existe numa cultura mista. Recorrendo a sondas de oligonucleótidos de elevada especificidade, complementares à cadeia 16S do rRNA das células, podemos visualizar diferentes fluorescências que nos permitem identificar até 7 diferentes populações, numa única amostra (Pernthaler *et al.*, [s.d.]

A análise FISH foi efectuada num laboratório externo à universidade, seguindo o seguinte protocolo.

I. Fixação das células

Em anexo encontram-se descritas as soluções usadas para este método de coloração.

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

- 1) Adicionar 3 volumes de paraformaldeído 4% para um volume de amostra;
- 2) Levar a 4 °C entre 1 a 3 horas;
- 3) Centrifugar a amostra a 10 000 rpm, durante 3 minutos;
- 4) Lavar as células do pellet com 1 mL de solução tampão fosfato salino (PBS) 1x; centrifugar; repetir a lavagem;
- 5) Ressuspender com 0,5 mL de PBS 1x;
- 6) Adicionar 1 volume de etanol absoluto a -20 °C; misturar;
- 7) Armazenar a -20 °C.

II. Aplicação da amostra e desidratação

- 1) Identificar as lâminas;
- 2) Aplicar a amostra em cada concavidade da lâmina (3 a 30 µL em cada);
- 3) Secar ao ar (preferencialmente) ou levar à estufa a 46 °C;
- 4) Desidratação em soluções de etanol (3 minutos em cada): 50%, 80% e 98%

Usar tubos de Falcon de 50 mL; máximo 2 lâminas por tubo durante a desidratação

- 5) Secar ao ar ou em ar comprimido.

III. Hibridização da sonda

- 1) Com um lenço de papel fazer uma "cama" dentro de um tubo de Falcon de 50 mL;
- 2) Preparar o tampão de hibridização num *ependorf* de 2 mL (concentrações finais – 0,9 M NaCl, 0,01% SDS, 20 mM Tris/HCl, pH de 7,2)
 - ✓ 360 µL de NaCl 5M
 - ✓ 40 µL TRIS – HCl 1M
 - ✓ Água mili-Q (ver Tabela 16 para a quantidade)
 - ✓ µL de SDS a 10% na tampa (o último a misturar - ao fechar a tampa, uma vez que pode interagir com NaCl e precipitar)
 - ✓ Formamida (ver Tabela 16 em Anexo para a quantidade)
- 3) Aplicar 8 µL em cada concavidade, sem tocar com a ponta na lâmina;
- 4) Aplicar o restante tampão no tubo de hibridização – para manter a câmara de hibridização num ambiente constante;
- 5) Aplicar em cada orifício 1 µL de sonda (sem tocar na lâmina; misturar suavemente a sonda com o tampão);
- 6) Colocar a lâmina no tubo de Falcon de 50 mL na posição horizontal;
- 7) Colocar o tubo de Falcon na estufa a 46 °C entre 1,5 a 3 horas.

IV. Lavagem

- 1) Preparar a solução de lavagem (volume total de 50 mL) num tubo de Falcon de 50mL
 - ✓ NaCl 5M (ver as quantidades na Tabela 17)
 - ✓ 1 mL de TRIS-HCl 1M
 - ✓ EDTA 0,5M (ver as quantidades na Tabela 17)
 - ✓ Perfazer até aos 50 mL com água MiliQ
 - ✓ 50 µL SDS 10% (adicionar em último para evitar a precipitação)
- 2) Colocar o tampão de lavagem no banho para alcançar 48 °C antes da lavagem das lâminas;

3) Lavar as lâminas: enxaguar suavemente o tampão de hibridização numa proveta com o tampão de lavagem quente, utilizando-se uma pipeta de *Pasteur*. Se as diferentes combinações de sondas forem aplicadas na mesma lâmina, certifique-se que não há contaminação cruzada. Colocar a lâmina no tubo com a solução de lavagem e em banho de 48 °C durante 10 a 15 minutos;

4) Retirar as lâminas para fora e lavar os orifícios e as lâminas (frente e verso) com água MiliQ a 4 °C;

5) Secar a lâmina rapidamente para remover cada gotícula individual da lâmina e ainda para impedir a dissociação da sonda (utilização de ar comprimido).

V. Montagem das lâminas

1) Aplicar algumas gotas de meio de montagem para fluorescência, *Vectashield*, nas lâminas secas;

2) Colocar a lamela e, suavemente, pressioná-la para cobrir todo o orifício;

3) Limpar o excesso com papel absorvente;

4) Aplicar verniz transparente nos bordos da lamela para impedir que esta se mova ao longo da lâmina e prevenir que o óleo de imersão se combine com o *Vectashield*;

5) Armazenar as lâminas a – 20 °C protegidas da luz.

VI. Visualização das lâminas ao microscópio

As lâminas são observadas ao microscópio de fluorescência, dotado de lâmpada de mercúrio e são utilizados filtros específicos de fluorescência. As imagens são capturadas a partir de uma câmara, ligada ao computador, que por sua vez possui um *software* de análise de imagem.

3.4.4 Coloração para observação de EPS

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

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

- 1) Adicionar 1 gota de tinta-da-china a 20 µL 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).

3.5 Cálculos

3.5.1 Remoção de CQO

Para conseguir determinar a remoção de CQO é necessário o cálculo da CQO de entrada (inicial) e da CQO de saída. Normalmente para a quantificação da CQO é necessário recorrer a diluições da amostra para posterior análise segundo o método referido em 3.4.2. Quando se efetuam diluições é necessário recorrer ao cálculo segundo a equação 3 para a quantificação da CQO efetiva da amostra.

$$CQO_{diluída} \left(\frac{mgO_2}{L} \right) \times FD = CQO_{efetiva} \left(\frac{mgO_2}{L} \right) \quad (3)$$

Concluída a determinação da CQO efetiva prossegue-se com o cálculo da remoção da CQO no ciclo de operação do reator SBR, efetuado segundo a equação 4.

$$\frac{CQO_{in} - CQO_{out}}{CQO_{in}} \times 100 = \% CQO_{removido} \quad (4)$$

3.5.2 Conteúdo de PHA

Utilizando o método apresentado em 3.4.5, foi possível obter retas de calibração para a quantificação de monómeros HB (Hidroxibutirato) (equação 5) e HV (Hidroxivalerato) (equação 6).

$$HB: y = 2,9041x + 0,0546; r^2 = 0,9964 \quad (5)$$

$$HV: y = 1,6364x + 0,0112; r^2 = 0,9799 \quad (6)$$

Sabendo a concentração de heptadecano ($[HD]$) e o volume de HD (V_{HD}) adicionado à amostra, é possível determinar a massa de HB (m_{HB}) acumulado num determinado período com a ajuda das retas de calibração obtidas (equação 7).

$$[HD] = 0,6676 \frac{mg \text{ HD}}{mL}$$

$$m_{HB} (mg \text{ HB}) = y \times [HD] \left(\frac{mg \text{ HD}}{mL} \right) \times V_{HD} (mL) \quad (7)$$

Com a determinação da massa de HB acumulado pelas células é possível obter a massa de PHB (m_{PHB}) total acumulada pelas bactérias seguindo a relação indicada pela equação 8, sendo os valores apresentados constantes de conversão.

$$m_{PHB} (mg \text{ PHB}) = \frac{m_{HB}}{104} \times 86 \quad (8)$$

Por fim, é possível obter a taxa de PHB acumulado pelas células presentes nas amostras analisadas, efetuando o cálculo indicado pela equação 9.

$$\% PHB = \frac{m_{PHB}}{m_{células}} \times 100 \quad (9)$$

O cálculo para a determinação da % PHV é efetuado do mesmo modo que foi calculado a % PHB (equação 9), utilizando a reta de calibração fornecida pela equação 6 e calculando a massa do monómero hidroxivalerato (m_{HV}) e a massa de polihidroxivalerato (m_{PHV}) seguindo as equações 7 e 8, respetivamente.

3.5.3 Biomassa ativa

A biomassa ativa presente no reator é fornecida pela análise de sólidos referido no 3.4.1, efetuando o cálculo indicado na equação 2, sendo o valor fornecido pelos SSV uma aproximação à biomassa ativa presente.

3.5.4 Concentração de PHA

A concentração de polímero presente nos ensaios é determinada segundo a equação 10, na qual se relaciona a quantidade de biomassa ativa e a taxa de monómeros acumulados nos ensaios.

$$[PHB] \left(\frac{g}{L} \right) = \frac{\% PHB}{100} \times SSV \quad (10)$$

Resultados e Discussão

4. Resultados e discussão

4.1 Ensaios de seleção de culturas acumuladoras de PHA

4.1.1 Influência do inóculo

O primeiro ensaio deste trabalho experimental englobou a operação de dois reatores semi-contínuos (SBR), utilizando dois inóculos distintos provenientes de diferentes ETARs. A inoculação dos reatores SBR encontra-se representada na Tabela 11. Os SBR foram operados segundo as condições referidas anteriormente na metodologia, utilizando um substrato de AOV puros constituído por ácidos acético, propiónico e n-butírico (numa proporção de 20:20:20 mL de cada ácido por cada litro de solução), apresentando uma carga orgânica de 2 g_{CQO}/L.d.

Tabela 11 - Quadro de inoculação de reatores SBR.

Reatores	Lamas utilizadas	Biomassa [g _{SSV} /L]	Volume do reator [L]
SBR1	ETAR Norte SimRia	2	5
SBR2	ETAR Prio Energy	2	5

O desempenho dos dois reatores SBR, nomeadamente no que diz respeito à evolução da CQO solúvel de entrada (CQOs in), do TOC, AOV e CQO de saída (TOC out, AOV out e CQOs out, respetivamente) e à percentagem de remoção da CQO (%Rem CQO), são apresentados na Figura 10 (SBR1). Verifica-se que o reator apresenta uma elevada remoção da CQO (cerca de 95% de remoção), durante todo o tempo de operação. A baixa concentração de ácidos orgânicos voláteis (inferior a 100 mg_{CQO}/L) no momento final de ciclo (fase de decantação) é indicativo de que o sistema operou em boas condições e que os microrganismos consumiram a maioria do carbono presente (aproximadamente 95% de remoção de AOV), apresentando o SBR um bom desempenho ao longo de um período de 34 dias (SBR1). Contudo, uma descida abrupta do pH no interior do reator para um valor muito baixo (pH inferior a 2,5), levou à morte da maioria das bactérias presentes, pelo que a sua operação teve de ser interrompida. Desconhece-se a razão para este sucedido.

De modo a aumentar a remoção da CQO, foi diminuída a carga a aplicar ao SBR no dia 27 para $1 \text{ g}_{\text{CQO}}/\text{L.d}$, podendo-se observar na Figura 10 que não houve melhoria da percentagem de remoção da CQO.

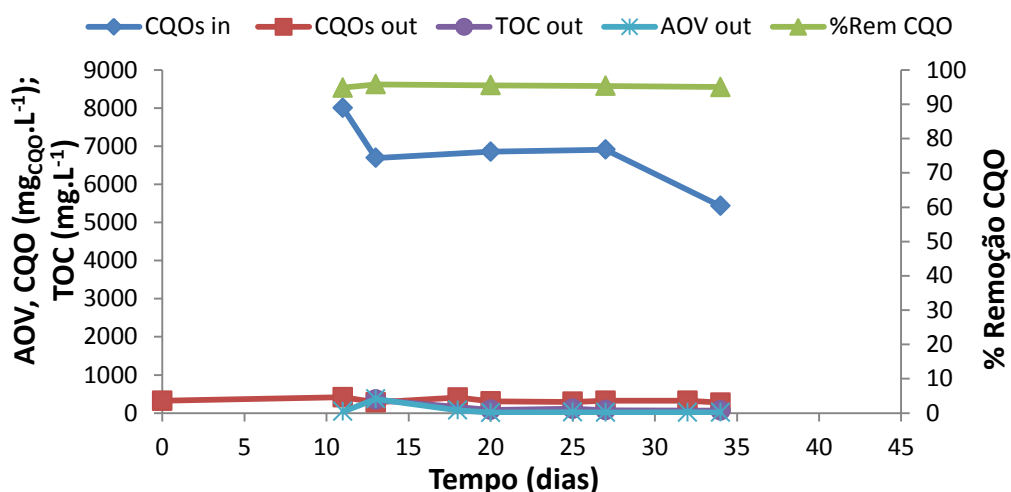


Figura 10 – Operação do reator SBR1.

Na Figura 11 observam-se dois picos mais elevados de concentração de sólidos no efluente tratado. Esta situação acontece devido ao crescimento das bactérias no reator SBR1, levando a que haja uma maior concentração de sólidos no reator. O excesso de sólidos presentes no reator é removido na fase de decantação do ciclo do SBR, de maneira a manter a concentração de biomassa no reator constante.

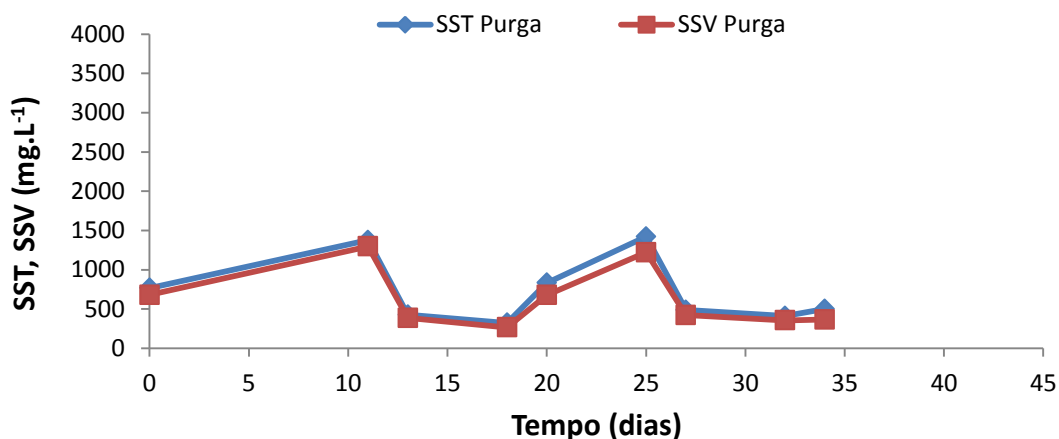


Figura 11 – Concentração de sólidos totais e voláteis na fase de decantação do SBR1.

Relativamente ao consumo de AOV por parte dos microrganismos nos diferentes inóculos utilizados nos reatores SBR, na Figura 12 podemos observar uma maior concentração de AOV no dia 13 (concentração mais elevada de AOV presente na fase de decantação do ciclo). Essa situação pode ser explicada pela saída de uma quantidade elevada de sólidos anteriormente a esse dia (Figura 11). Com esta maior saída de sólidos do reator ocorre uma diminuição da biomassa no interior do reator, levando a uma menor capacidade de degradação do substrato presente. Após o dia 20 o consumo de AOV é maior, apresentando concentrações de descarga inferiores a 50 mg_{CQO}/L.

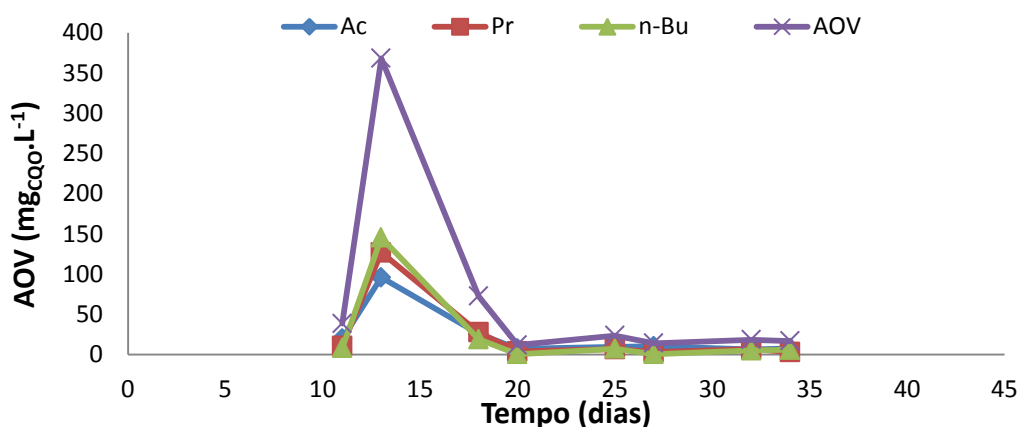


Figura 12 - Concentração de AOV discriminados na fase de decantação do reator SBR1.

Na operação do SBR2 foi efetuada a mesma diminuição de carga aplicada, verificando-se que também não houve aumento da percentagem de remoção da CQO.

Na Figura 13 podemos observar um pico da CQO solúvel de saída mais elevada no dia 20 da operação do reator. Esse facto pode ser explicado por haver uma síntese de exopolissacarídeos (EPS) por parte das bactérias provenientes da ETAR da Prio Energy, uma vez que o consumo dos AOV aparenta ser constante ao longo da operação do reator. Como o EPS sintetizado pelas bactérias é constituído por carbono, este é detetado nas análises da CQO solúvel efetuadas ao reator. Outro fator que pode refletir uma maior concentração da CQO solúvel no dia 20 é a elevada saída de sólidos (Figura 14 - Concentração de sólidos totais e voláteis na fase de decantação do SBR2.), decorrente da má

sedimentabilidade dos sólidos devido à formação de EPS, apresentando uma menor concentração de bactérias no interior do reator capazes de remover a CQO.

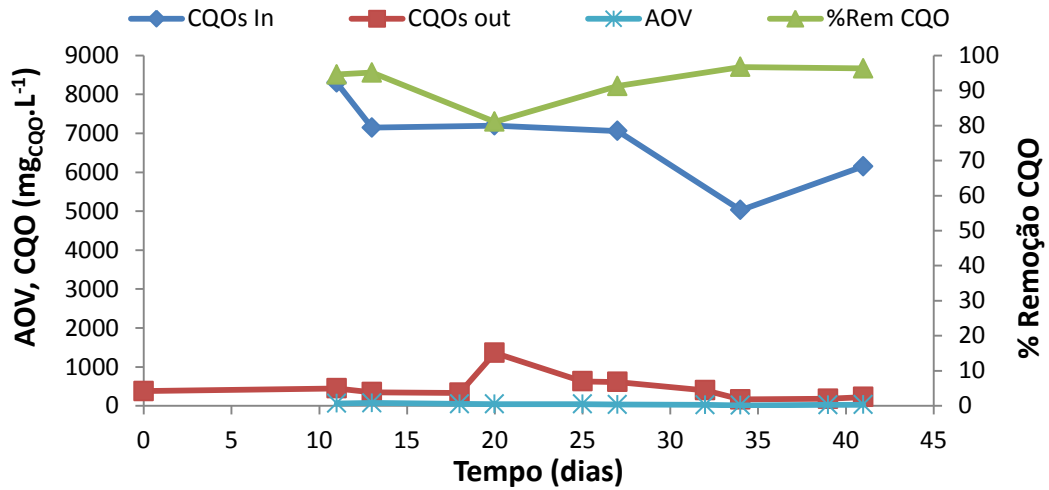


Figura 13 - Operação do reator SBR2.

No caso do reator SBR2, há uma elevada concentração de sólidos (Figura 14) relativamente ao SBR1. Essa elevada concentração de sólidos pode ser explicada pela produção de EPS (hidratos de carbono) por parte dos microrganismos. Podemos assim considerar que grande parte dos sólidos quantificados no reator diz respeito a substâncias poliméricas produzidas pelas bactérias, ocorrendo uma maior produção a partir do dia 20 de operação.

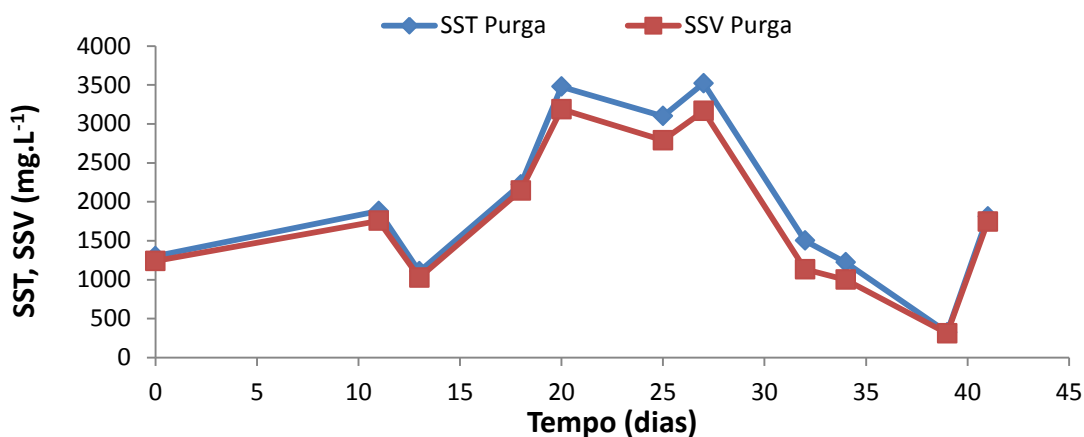


Figura 14 - Concentração de sólidos totais e voláteis na fase de decantação do SBR2.

O consumo de AOV no reator SBR2 aparenta ser uniforme com concentrações inferiores a 100 mg_{CCO}/L, não apresentando qualquer pico significativo.

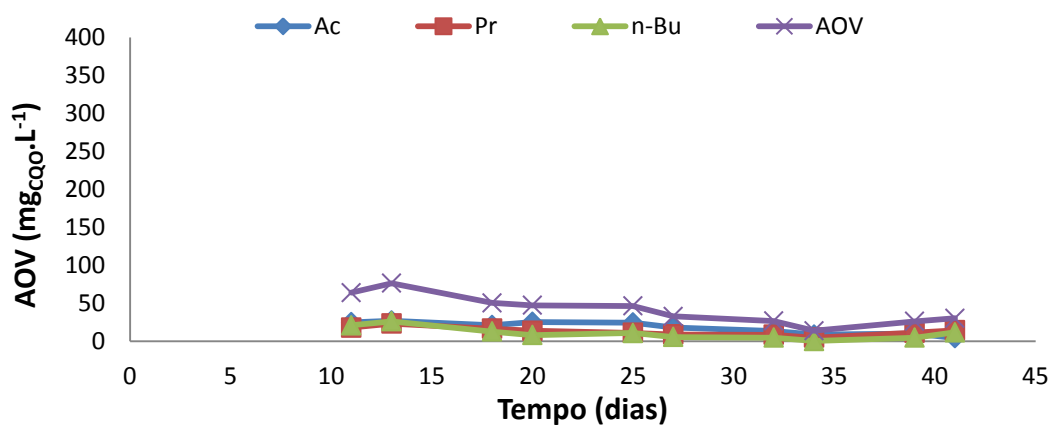


Figura 15 - Concentração de AOV discriminados na fase de decantação do reator SBR2.

A síntese de EPS serve como um mecanismo de defesa por parte dos microrganismos devido às adversidades encontradas no meio, explicando o facto de no dia no qual ocorreu uma maior formação de EPS por parte das bactérias coincidir com o dia do mês de Novembro onde se registaram as temperaturas mais baixas (10 °C no laboratório). Na Figura 16 é possível uma visualização ao microscópio da presença de EPS,

utilizando a técnica de tinta-da-china, uma vez que existem espaços nos flocos que a tinta-da-china não conseguiu alcançar, indicando a produção de EPS por parte dos microrganismos.

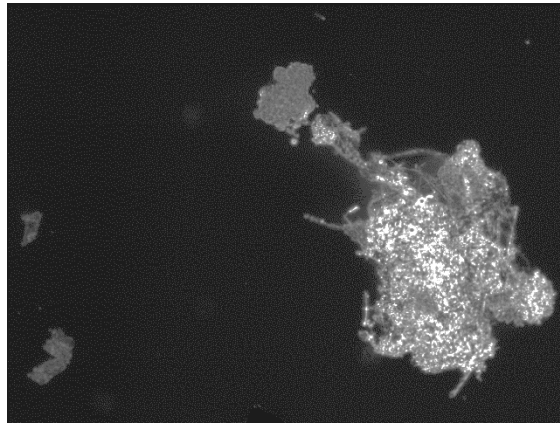


Figura 16 - Amostra do SBR2 observada ao microscópio com a técnica de tinta-da-china para observação de EPS, no dia 31 de operação.

Ao longo dos ensaios foram preparadas amostras para observação microscópica. Utilizaram-se técnicas como a coloração de Azul do Nilo, que permitiu identificar se de facto os microrganismos presentes nos SBR acumulavam PHA (grânulos brilhantes com a utilização de fluorescência). Na Figura 17 podemos observar a presença de flocos de pequenas dimensões no início do ensaio (a) e que a acumulação de PHA era praticamente inexistente (b). Com o decorrer da seleção de culturas foi possível observar a formação de flocos de maiores dimensões no SBR1 (c) e usando a técnica de Azul do Nilo é possível a distinção, por fluorescência, da presença de uma grande quantidade de polímero acumulado por parte das bactérias (d).

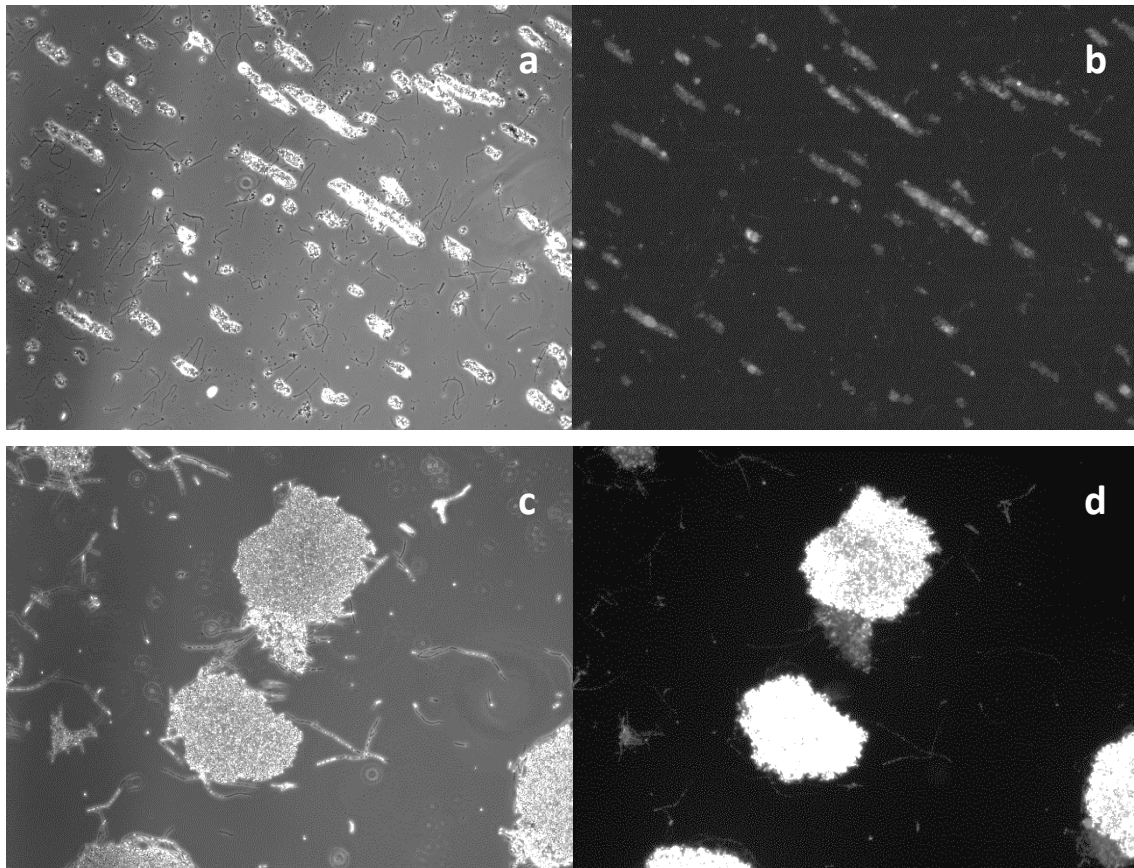


Figura 17 - Observação microscópica utilizando a técnica de coloração Azul do Nilo sem fluorescência no dia 0 (a) dia 34 (c) e com fluorescência no dia 0 (b) dia 34 (d) do SBR1.

O mesmo sucede com a observação microscópica do reator SBR2 sendo possível avaliar a evolução da acumulação de PHA em diferentes dias de operação. Na Figura 18b podemos observar que desde o início do ensaio existem bactérias acumuladoras de polímero, apesar de serem em número reduzido. Após 41 dias de operação verifica-se a presença de uma quantidade considerável de microrganismos acumuladores de polímero (Figura 18d), podendo concluir que se conseguiu efetuar uma boa seleção no decorrer do ensaio.

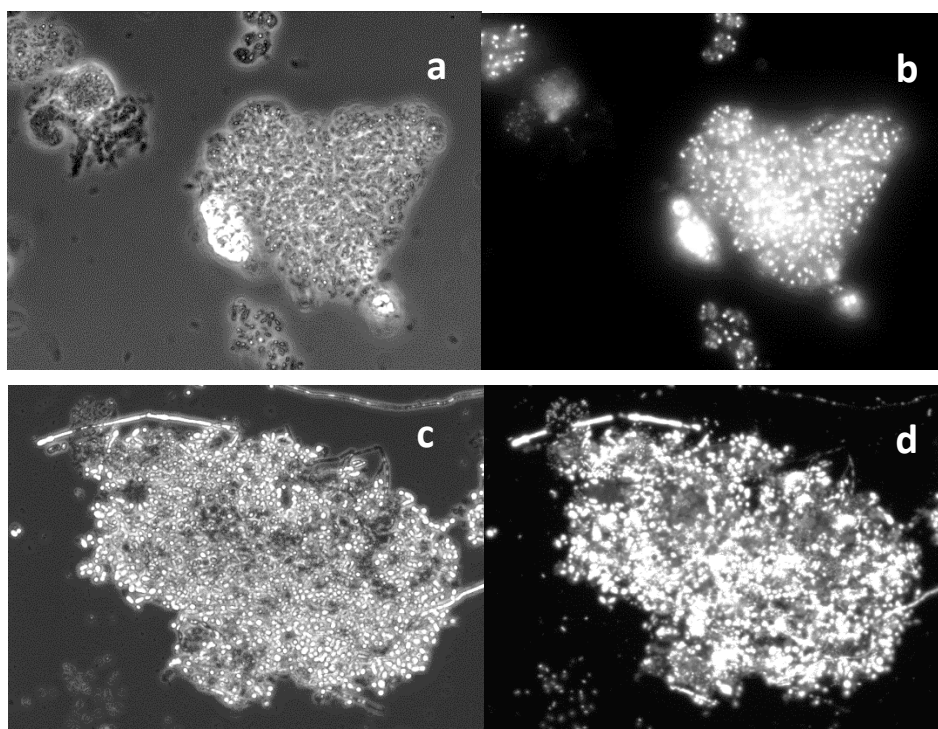


Figura 18 - Observação microscópica utilizando a técnica de coloração Azul do Nilo sem fluorescência no dia 0 (a) dia 41 (c) e com fluorescência no dia 0 (b) dia 41 (d) do SBR2.

Amostras dos reatores foram enviadas para um laboratório externo para análise FISH, seguindo a metodologia indicada em 3.5.3, para identificação das comunidades bacterianas presentes e acompanhar a sua evolução ao longo do período de operação. Foram identificados vários grupos bacterianos, nomeadamente: *Proteobactérias*, *Flavobactérias*, *Actinobactérias*, *Cloroflexi* e *Firmicutes*, com maior predominância de *Proteobactérias*.

Efetuada uma avaliação mais pormenorizada do SBR1, os grupos bacterianos principais presentes foram as *Proteobactérias*, *Flavobactérias* e *Firmicutes*. Numa amostragem inicial, ao grupo das *Proteobactérias* (grupo de bactérias gram-negativas predominantes), foi possível identificar 3 subgrupos: *Betaproteobactérias* (10% de hibridação), *Deltaproteobactérias* (10% de hibridação) e *Gamaproteobactérias* (5% de hibridação). Após decorridos 31 dias de operação do reator, foi possível verificar um aumento de 30% de *Betaproteobactérias* e de 10% de *Deltaproteobactérias*, perfazendo

um total de 65% de bactérias com capacidade de acumulação de PHA presentes no reator. Todavia, as *Gamabactérias* mantiveram-se constantes (5%) ao longo da operação do reator. Com o declínio do pH, foi feita uma última amostragem para análise FISH, obtendo valores de apenas 10% de hibridação de *Proteobactérias* e 5% de *Deltabactérias* e *Gamabactérias* (total de 20% de bactérias presentes), indicando uma elevada morte de microrganismo devido à descida de pH.

No SBR2 a cultura microbiana apresentava grupos bacterianos diferentes dos indicados no SBR1. A cultura era constituída por *Proteobactérias* (continuavam a ser o grupo com maior predominância), *Flavobactéria*, *Actinobactéria* (apenas no início da operação do reator, com uma reduzida concentração) e *Cloroflexi* (surgiu apenas perto do final da operação do reator). Os subgrupos de *Proteobactéria* identificados foram *Alphaproteobactérias*, *Betaproteobactérias* e *Gamaproteobactérias*. Numa identificação inicial (dia 0) de *Proteobactérias* à cultura verificou-se uma predominância de *Gamaproteobactérias* (40% de hibridação) e de 10% de *Betaproteobactérias*. As *Alphaproteobactérias* (5%) surgiram apenas após 13 dias de operação, mantendo-se constante no restante período do ensaio. No decorrer do ensaio ocorreu um aumento de *Betaproteobactérias*, obtendo um máximo de 40% de hibridação após 13 dias. Em contrapartida com o aumento das *Betaproteobactérias* ocorreu uma redução significativa de *Gamaproteobactérias* (30%), perfazendo um total de 55% de bactérias acumuladoras de PHA após 13 dias de operação. Com a produção de EPS verificou-se uma redução de 15% de hibridação das *Proteobactérias*, obtendo um total de 40% de hibridação (30% *Betaproteobactérias* e 5% de *Gamaproteobactérias* e *Alphaproteobactérias*) no final do ensaio.

Em conclusão, através das análises efetuadas no decorrer dos ensaios, podemos concluir que o inóculo proveniente da ETAR da SimRia Norte foi o que apresentou melhores resultados relativamente à seleção de culturas acumuladoras de PHA e de remoção da CQO. Através da análise FISH verifica-se que houve um máximo de 65% das culturas presentes no reator serem bactérias acumuladoras de PHA (com 31 dias de

operação), enquanto o ensaio com o inóculo da Prio Energy o máximo alcançado foi de 55% de culturas, diminuindo com a produção de EPS (40% de culturas).

4.1.2 Operação a longo prazo de reatores semi-contínuos

Realizaram-se novos ensaios em reatores SBR, utilizando os mesmos inóculos dos ensaios anteriores, e apresentando também uma inoculação segundo a Tabela 11. Com a realização destes novos ensaios pretendeu-se obter resultados análogos aos obtidos com os reatores SBR1 e SBR2, uma vez que apresentaram boas indicações (com um máximo de 65 e 55% de culturas com capacidade de acumulação de PHA), mantendo as mesmas condições de operação (carga orgânica de 2 g_{CQO}/L). A seleção de culturas foi efetuada tentando evitar que o pH sofresse alterações significativas que levassem à morte dos microrganismos, de modo a estas culturas poderem ser utilizadas nos ensaios posteriores de acumulação de PHA.

Ao longo dos ensaios realizados verificou-se o aparecimento de microrganismos filamentosos após alguns dias de operação dos reatores SBR3 e SBR4, conforme se pode verificar na Figura 19. Normalmente, as biomassas provenientes das ETARs apresentavam inicialmente uma elevada diversidade microbiana, desenvolvendo naturalmente microrganismos filamentosos, uma vez que a presença destes contribui para a agregação física de bactérias, obtendo flocos estáveis e com boa sedimentabilidade (Alves *et al.*, 2007). Neste caso verificou-se um maior desenvolvimento de microrganismos filamentosos, levando à sua predominância no meio.

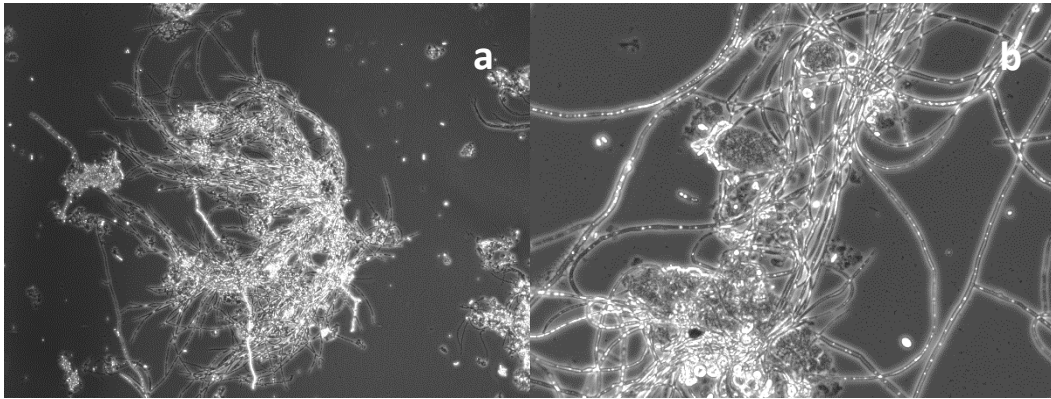


Figura 19 - Microrganismos filamentosos presentes no reator SBR3 (a) e SBR4 (b) após 19 dias de operação.

A presença de filamentosas num período próximo da iniciação dos ensaios pode ser explicado, em parte, pelas baixas temperaturas climáticas que se faziam sentir na altura (10 a 13 °C), inibindo o crescimento de bactérias formadoras de flocos e potenciando o desenvolvimento de filamentosas (Tandoi *et al.*, 2006).

Na Figura 20 são apresentados os resultados de operação do reator SBR3. Com o aparecimento de microrganismos filamentosos há uma baixa sedimentabilidade dos sólidos presentes no reator, ocorrendo uma maior saída de sólidos na descarga de efluente (Figura 21), influenciando a remoção da CQO (menor concentração de sólidos no reator, menor capacidade de degradação do substrato). Testou-se a adição de lamas frescas para inocular o reator de modo a diminuir a concentração em microrganismos filamentosos e assim tentar melhorar a sua taxa de remoção da CQO.

A adição de lamas foi efetuada por duas vezes, uma primeira no dia 11 de operação (fase inicial do aparecimento dos microrganismos filamentosos) e outra no dia 32 (linhas verticais amarelas representadas na Figura 20). Conforme se pode ver na Figura 20, houve uma melhoria significativa na taxa de remoção da CQO após a segunda adição de lamas, apresentando valores de remoção de 59 – 76% durante aproximadamente 30 dias. Após esse período voltou a ocorrer uma proliferação de microrganismos filamentosos e conseqüente diminuição da remoção da CQO para valores de 30%. Apesar da predominância de microrganismos filamentosos, observou-se por análise microscópica

uma acumulação de PHA por parte dos microrganismos filamentosos, tal como Bengtsson *et al.* (2008) referem, optando-se por manter o reator a operar nestas condições para comprovar se este tipo de microrganismos seria bom acumulador de PHA. Após 77 dias de operação a taxa de remoção da CQO apresentou um valor demasiado baixo (28%), a partir do qual se optou por dar a operação do reator por terminada. A análise de TOC apresenta um perfil semelhante à da CQO e da concentração de AOV, mas menos pronunciado (Figura 20).

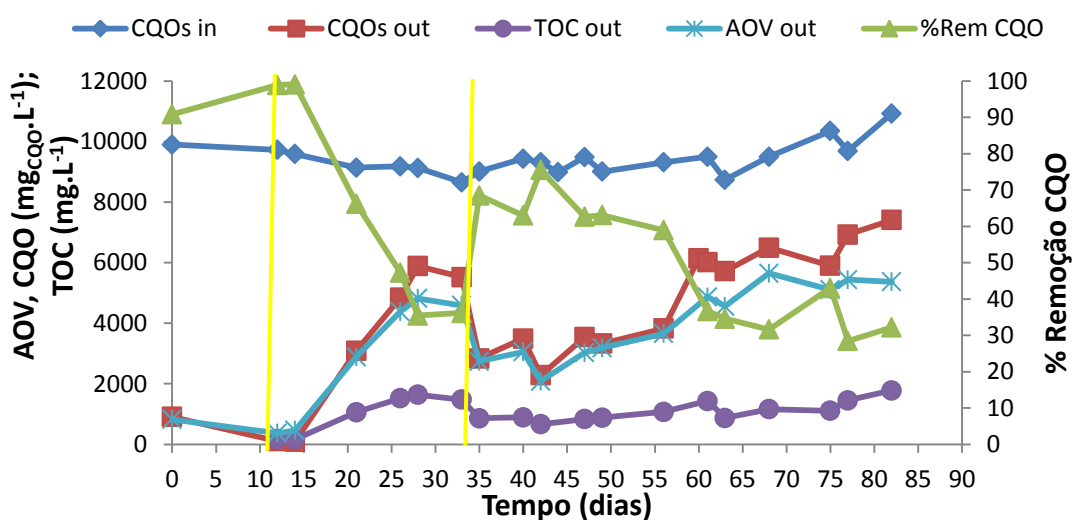


Figura 20 - Operação do reator SBR3.

Na Figura 21 é possível observar uma elevada concentração de sólidos descarregados do SBR3 após a adição de novas lamias. Esses valores elevados podem ser explicados pela presença de filamentosas, que não permitem que ocorra uma boa sedimentação. Verifica-se uma relação direta entre a concentração de sólidos no interior do reator e a remoção da CQO (Figura 20), apresentando uma maior remoção da CQO quando a quantidade de sólidos no reator é maior (menor concentração de sólidos no efluente descarregado). Após o dia 55 de operação (Figura 21) verificou-se uma estabilização dos sólidos descarregados. Por outro lado, a remoção da CQO apresentava valores mais baixos, indicando uma baixa concentração de bactérias presentes no reator

para degradação do substrato, tendo sido descarregadas devido à baixa sedimentabilidade dos sólidos no reator.

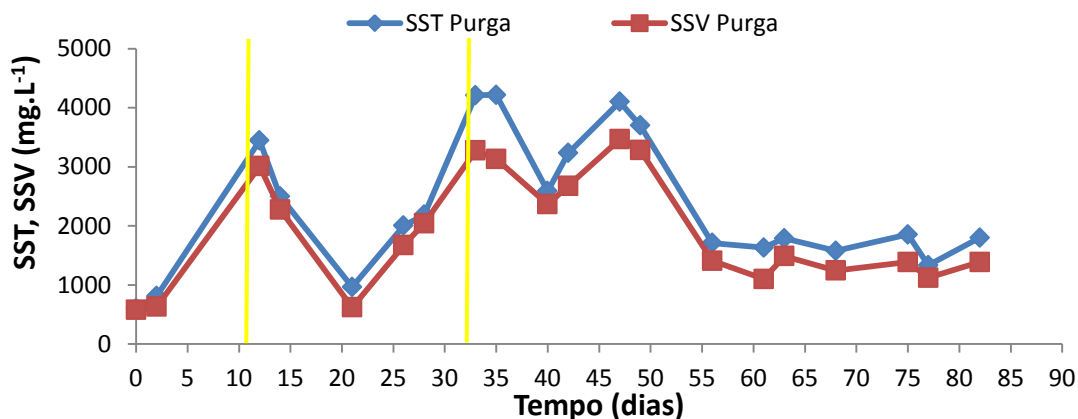


Figura 21 - Concentração de sólidos totais e voláteis na fase de decantação do SBR3.

No que diz respeito ao consumo de substrato, é possível identificar que o ácido acético foi o AOV consumido preferencialmente pelos microrganismos que se desenvolveram no reator SBR em análise (Figura 22). Na Figura 22 é possível observar que após a segunda adição de lamas novas no SBR3 ocorreu um maior consumo de AOV, indicando a presença de uma maior quantidade de bactérias com capacidade de degradar o substrato, elevando a percentagem de remoção da CQO (como é indicado na Figura 20). No decorrer do ensaio é possível observar que com o aparecimento dos microrganismos filamentosos o ácido acético é o substrato consumido preferencialmente, contrariando o que acontecia com os reatores SBR1 e SBR2, onde o consumo de AOV é feito de uma modo mais uniforme e cujas concentrações de AOV na descarga eram significativamente inferiores (inferiores a 50 e 100 mg_{CQO}/L respetivamente).

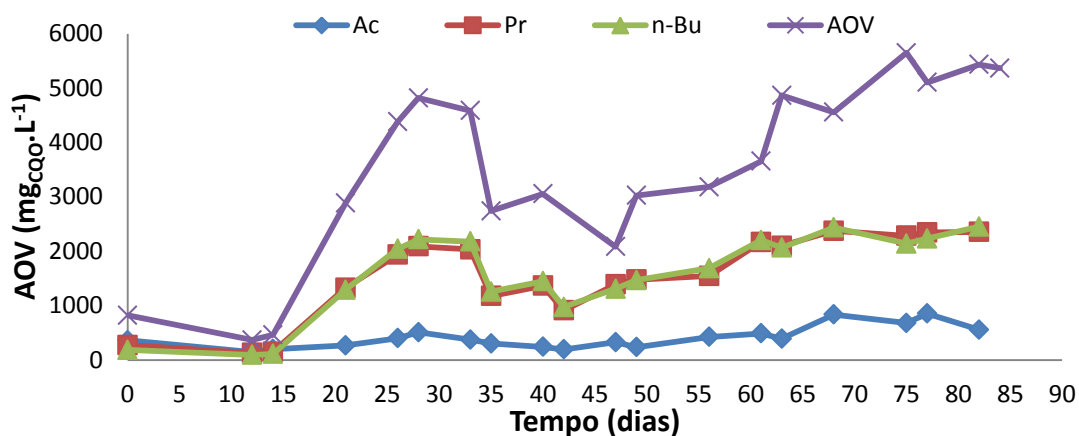


Figura 22 - Concentração de AOV discriminados na fase de decantação do reator SBR3.

O SBR4 apresentou uma taxa de remoção da CQO inferior a 50% após 12 dias de operação (Figura 23), coincidente também com o surgimento de microrganismos filamentosos. Este reator manteve a remoção da CQO numa média de 40% de remoção ao longo de 21 dias, apresentando uma redução acentuada após esse período (18% de remoção). Com base dos dados de remoção da CQO decidiu-se também terminar a operação deste reator, ao fim de 40 dias de operação.

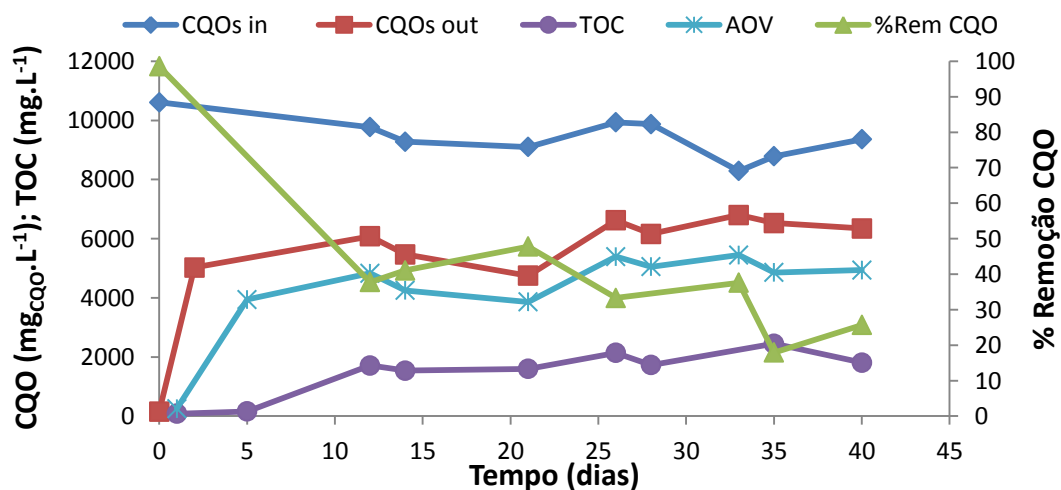


Figura 23 - Operação do reator SBR4.

O SBR4 apresenta uma elevada concentração de sólidos no efluente descarregado após 12 dias de operação, que pode também ser explicado pela síntese de EPS por parte das bactérias provenientes da ETAR da Prio Energy e pelo aparecimento dos microrganismos filamentosos, dificultando a sedimentação de sólidos. A conjugação destes dois fatores pode ter levado a uma redução da capacidade de remoção da CQO, devido à presença de uma menor concentração de bactérias para consumir o substrato no reator (Figura 23).

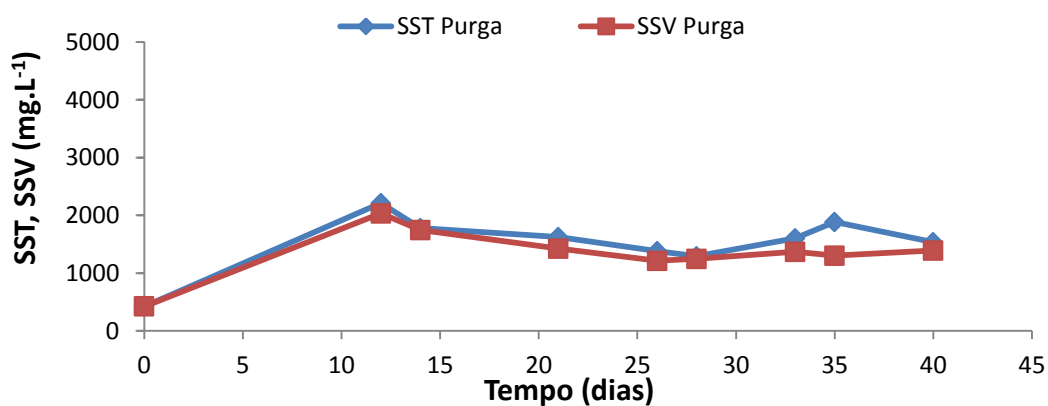


Figura 24 - Concentração de sólidos totais e voláteis na fase de decantação do SBR4.

Através da Figura 25 podemos verificar que com o aparecimento de microrganismos filamentosos (dia 5) houve um aumento da concentração de ácido propiónico e ácido n-butírico à saída do reator, ao passo que o consumo de acético se manteve praticamente igual ao longo do tempo. Esta situação vem corroborar a hipótese de os microrganismos filamentosos apresentarem uma preferência no consumo de ácido acético.

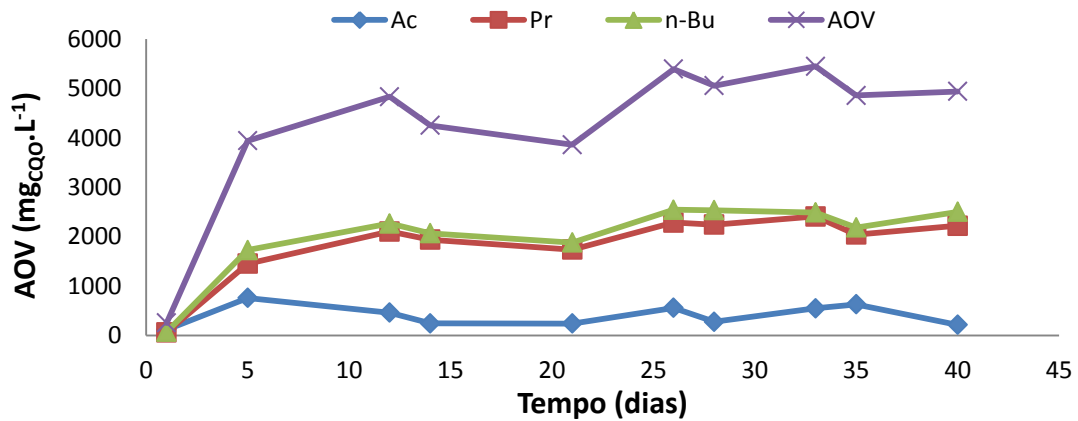


Figura 25 - Concentração de AOV discriminados na fase de decantação do reator SBR4.

Ao nível de microscopia foram observadas algumas amostras de diferentes dias de ambos os reatores, evidenciando o aparecimento de microrganismos filamentosos no decorrer da operação dos reatores. Na Figura 26a e Figura 26b é possível observar a formação do que se pensa ser pequenos grânulos de PHA em microrganismos filamentosos, indicando a capacidade destes de acumularem PHA, embora em pequena quantidade (reator SBR3).

Utilizando a técnica de Azul do Nilo é possível identificar que ocorreu uma acumulação de PHA por parte de microrganismos filamentosos no SBR4 (Figura 26c e 26d).

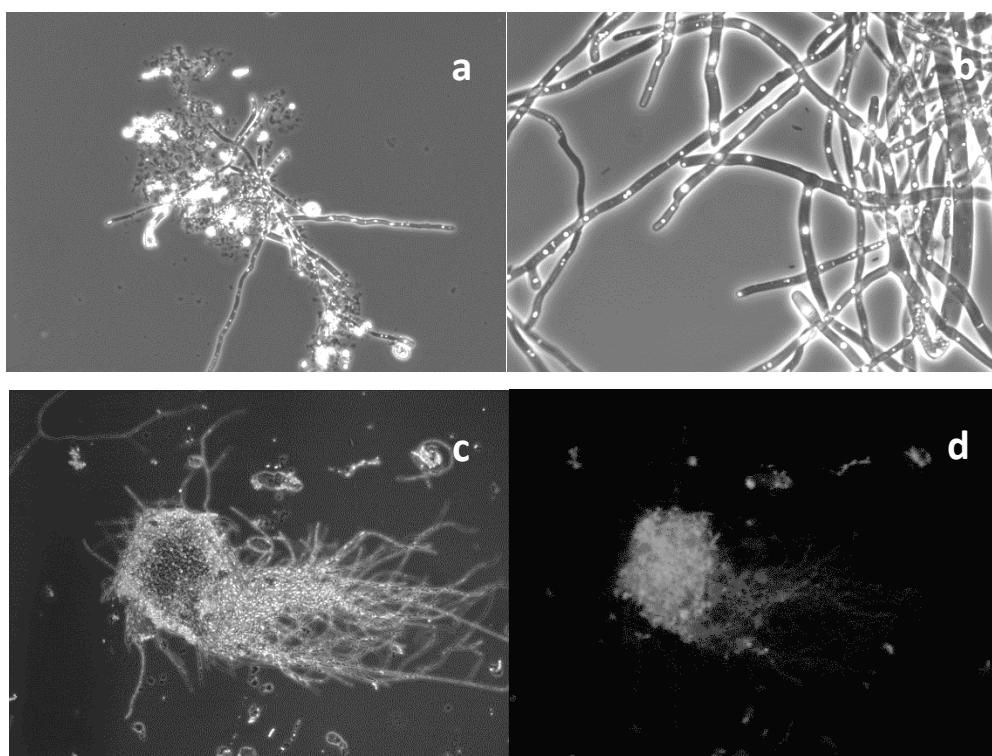


Figura 26 – Observação microscópica direta do SBR3 aos 70 dias de operação (a – ampliação 400x e b – ampliação 1000x); Observação microscópica com técnica do Azul do Nilo sem fluorescência (c) e com fluorescência (d) do SBR4 aos 19 dias de operação.

No decorrer dos ensaios foram guardadas várias amostras, que permitiram a quantificação de PHA ao longo do tempo. A acumulação máxima que se obteve foi de 9% do peso seco das células após 68 dias de operação para o SBR3 (Figura 27), enquanto no SBR4 houve uma acumulação máxima aproximada de 10% em 35 dias (Figura 28).

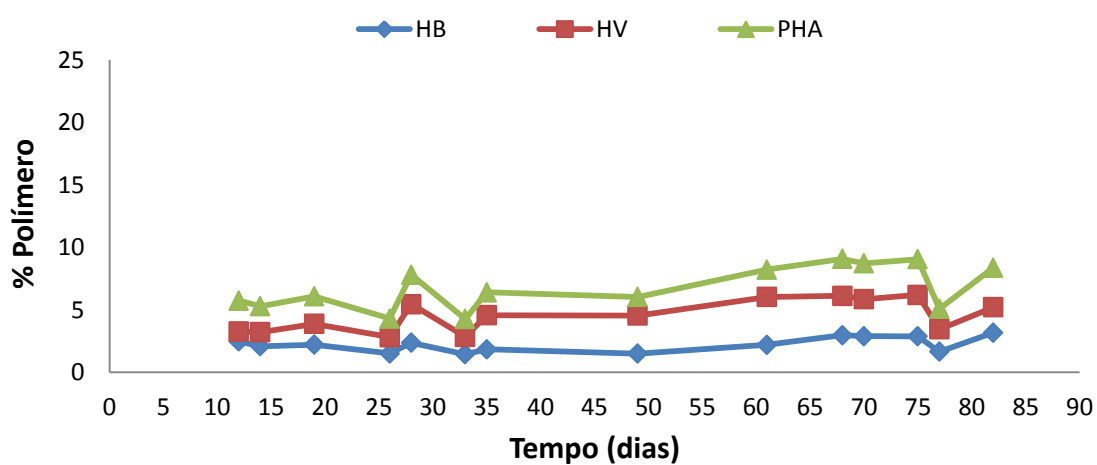


Figura 27 - Quantificação de polímero no ensaio do SBR3.

Em ambos os ensaios é possível verificar que ocorreu uma maior acumulação do monómero HV, apesar de as bactérias apresentarem uma preferência para o consumo de ácido acético, precursor direto do monómero HB. A presença de ácido propiónico na mistura de AOV que alimentou os reatores pode ter sido um fator essencial para a acumulação de um co-polímero constituído preferencialmente por monómeros HV (Bengtsson *et al.*, 2008). Como explica Pardelha *et al.* (2012), e como é mostrado na Figura 7 (secção 2.7.2), os diferentes AOV consumidos seguem vias metabólicas distintas e originam polímeros com composições monoméricas distintas.

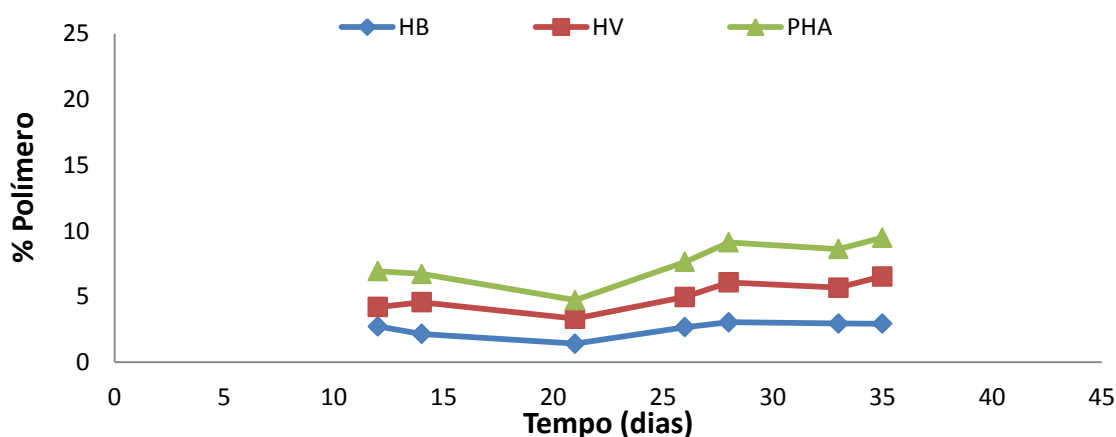


Figura 28 - Quantificação de polímero no ensaio do SBR4.

Os microrganismos filamentosos são constituídos maioritariamente por paredes celulares. Com a aglomeração dos microrganismos é possível que a quantificação de 9% e 10% de polímero acumulado não corresponda ao valor efetivo, uma vez que a sua extração é dificultada pela elevada quantidade de paredes celulares envolventes dos microrganismos.

Foram recolhidas amostras para análise de FISH para cada ensaio, no entanto apenas foi possível obter resultados das amostras iniciais. A amostra do reator SBR3 não apresentou hibridação com nenhuma sonda utilizada, inviabilizando a sua análise. Em contrapartida, com a amostra do SBR4 foi possível a identificação dos subgrupos

Betaproteobactéria, *Deltaproteobactéria* e *Gamaproteobactéria* do filo das *Proteobactérias*, apesar de ter ocorrido uma baixa hibridação (5% para cada subgrupo).

Na Figura 29 é possível ver uma hibridação de amostra com a utilização de diferentes sondas.

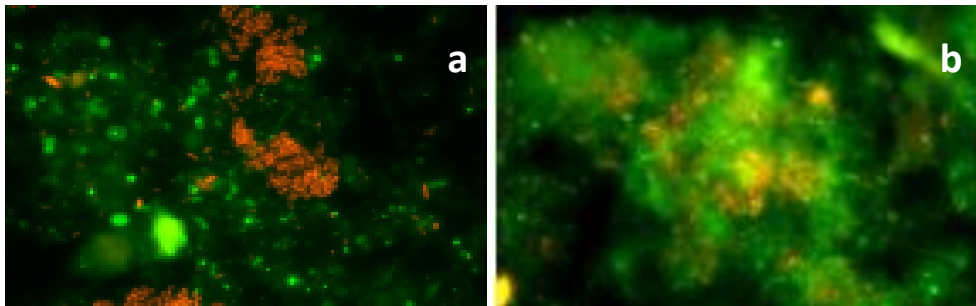


Figura 29 - Imagens de FISH recolhidas com dois diferentes filtros de fluorescência (a. com sonda BET42a (vermelho) e EUB338mix (verde); b. sondas DECL585 (vermelho) e EUB338mix (verde)).

Com os resultados obtidos, é possível concluir que o inóculo proveniente da Prio Energy apresentou os melhores resultados, na seleção de culturas de microrganismos filamentosos para acumulação de PHA, uma vez que melhores melhores percentagens de acumulação num menor período de tempo de operação. No entanto, com uma acumulação de PHA de 9 e 10% não se pode considerar viável a acumulação de PHA por microrganismos filamentosos, uma vez que a extração de polímero é difícil e o processo apresenta uma fraca remoção da CQO.

4.1.3 Influência da carga orgânica na seleção de cultura

Foi realizado um ensaio com dois reatores semi-contínuos (SBR), utilizando o mesmo inóculo (lamas da ETAR Sul da SimRia) e iniciado o processo de seleção nas mesmas condições de inoculação (Tabela 12), mas com diferente aplicação de carga. Com a realização deste ensaio pretendeu-se assim observar qual a influência de diferentes cargas orgânicas quer na seleção de culturas, quer no tipo de PHA acumulado pelos microrganismos.

Tabela 12 - Inoculação dos SBR para avaliar a influência da carga orgânica na seleção de culturas.

Reatores	Lamas utilizadas	Biomassa [g _{SSV} /L]	Volume do reator [L]	Carga orgânica [g _{CQO} /L.d]
SBR5	ETAR Sul SimRia	2	5	4
SBR6	ETAR Sul SimRia	2	5	1

No reator SBR5 foi aplicada uma carga orgânica mais elevada de 4 g_{CQO}/L. Este reator apresentou inicialmente uma boa taxa de remoção de CQO (97%), mas após 11 dias de operação esta começou a declinar, atingindo um mínimo de 71% no 26º dia de operação (Figura 30). Esta situação pode ser explicada pelo facto da elevada carga aplicada conduzir a grande crescimento de microrganismos formando pequenos flocos, o que dificulta a sua retenção no reator, levando à sua saída (Figura 31). Esta situação leva à variação da remoção CQO que é mais elevada na presença de maior número de microrganismos no reator (menor concentração no efluente tratado). Todavia, entre o dia 25 e 26 houve uma falha de energia elétrica no laboratório, por um período aproximado de 9h, devido a condições climáticas adversas, deixando de haver agitação/oxigenação e alimentação nesse período no reator. Após o restabelecimento desta situação verificou-se uma melhoria significativa na remoção da CQO (96%), voltando a ocorrer um declínio no dia 44 para um valor mínimo de 69%, para voltar a retomar uma boa remoção (94%).

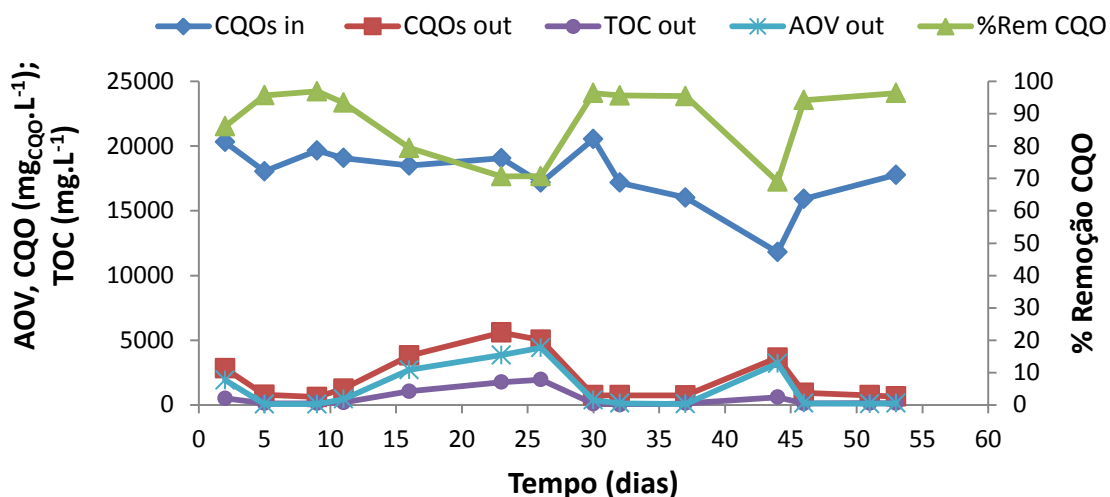


Figura 30 - Operação do reator SBR5.

As elevadas concentrações de sólidos no efluente tratado (Figura 31) levou à redução de sólidos presentes no reator e consequentemente a uma diminuição da eficiência de remoção nos primeiros 22 dias de operação. Todavia, o SBR5 apresentou um decréscimo de sólidos no efluente tratado no dia 26 (Figura 31). Essa situação pode ser explicada com a falha de energia elétrica nessa altura. Uma vez que não houve agitação/oxigenação os sólidos presentes no reator apresentaram um maior período de sedimentação, levando a uma compressão dos sedimentos, dificultando a sua ressuspensão. Após ser restabelecida a agitação/oxigenação no reator verificou-se uma concentração mais elevada de sólidos na fase de decantação.

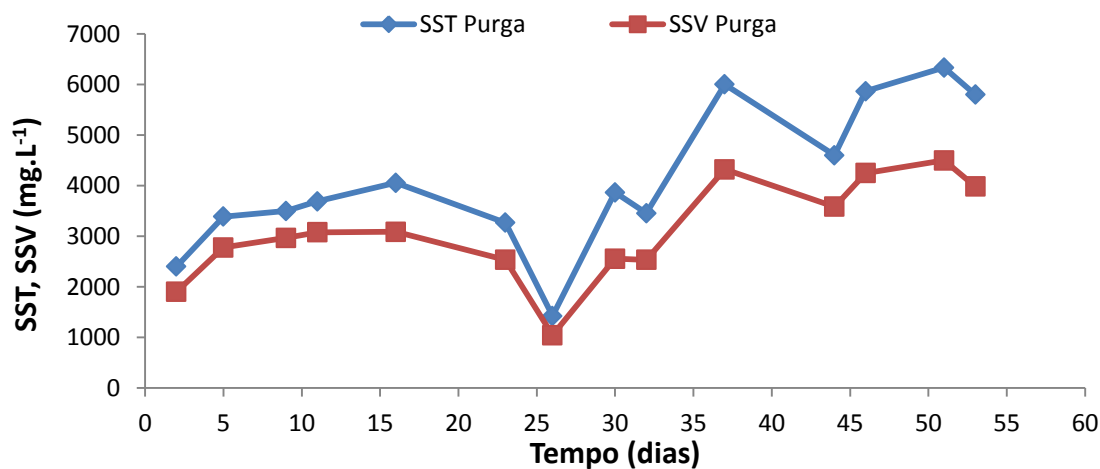


Figura 31 - Concentração de sólidos totais e voláteis na fase de decantação do SBR5.

A elevada concentração de sólidos pode ser explicada pelo crescimento disperso de bactérias (Figura 32) devido à carga orgânica elevada da alimentação, fazendo com que as bactérias deixassem de necessitar de produzir glicocálice (importante para a formação de uma matriz para aglomeração de flocos) sob estas condições (Tandoi *et al.*, 2006).

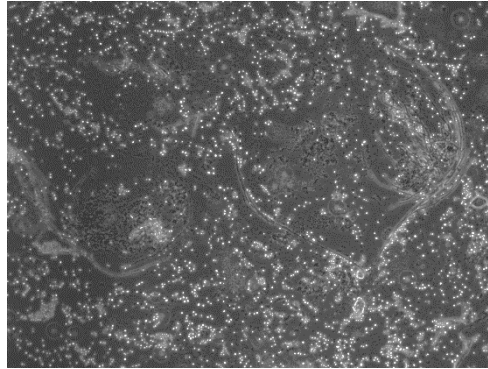


Figura 32 - Crescimento disperso de microrganismos e formação de microflocos de fraca sedimentabilidade (SBR5, dia 51).

É possível verificar que no período anterior à falha de energia elétrica ocorreu uma diminuição gradual da taxa de remoção da CQO, comprovada com o aumento crescente da concentração de AOV na fase de decantação do reator (Figura 33). A elevada concentração de AOV foi devido ao aumento da concentração de ácido propiónico e n-butírico, indicando que os microrganismos presentes no SBR5 apresentavam uma preferência de ácido acético como substrato. Após o dia 26 o consumo de AOV foi elevado, com a exceção do dia 44, no qual se voltou a verificar um aumento da concentração dos ácidos propiónico e n-butírico.

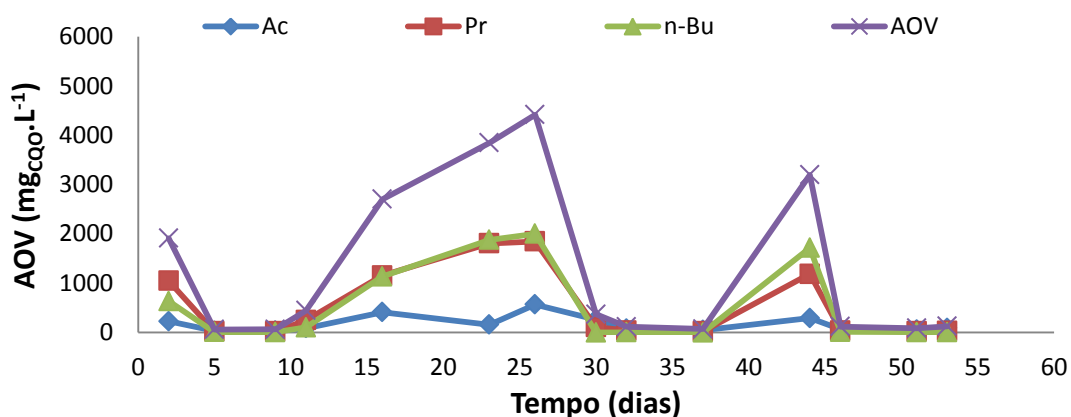


Figura 33 - Concentração de AOV discriminados na fase de decantação do reator SBR5.

Ao avaliar as culturas ao microscópio do reator SBR5 foi possível observar microrganismos acumuladores de PHA, uma vez que utilizando a técnica do Azul do Nilo conseguimos identificar várias inclusões de grânulos de PHA nas células (Figura 34). No entanto, não se verificou uma boa formação de flocos, dificultando a retenção de bactérias acumuladoras de PHA no reator, impedindo obter uma cultura estável e consequentemente uma boa seleção de culturas.



Figura 34 - Observação microscópica com a técnica do Azul do Nilo sem fluorescência (a) e com fluorescência (b) do SBR5 (ampliação 400x).

Ao reator SBR6 foi aplicada uma carga orgânica mais baixa de 1 g/L, apresentando uma remoção média acima dos 90%, com valores da CQO e AOV no efluente de saída baixos, indicando que ocorreu um bom consumo dos AOV por parte dos microrganismos. Apresentando uma carga mais baixa e mantendo o mesmo ciclo de operação do reator

seria de esperar uma maior remoção da CQO por parte dos microrganismos. No entanto, surgiu um período de 21 dias no qual a remoção se encontrava abaixo dos 90% (dia 11 a 25), em que apresentou valores de cerca de 86%. O SBR6 apresentou valores mais elevados de concentração de sólidos no início da operação, nomeadamente no dia 7 e 18 (Figura 36), indicando uma menor concentração de microrganismos no reator, explicando a redução da remoção da CQO.

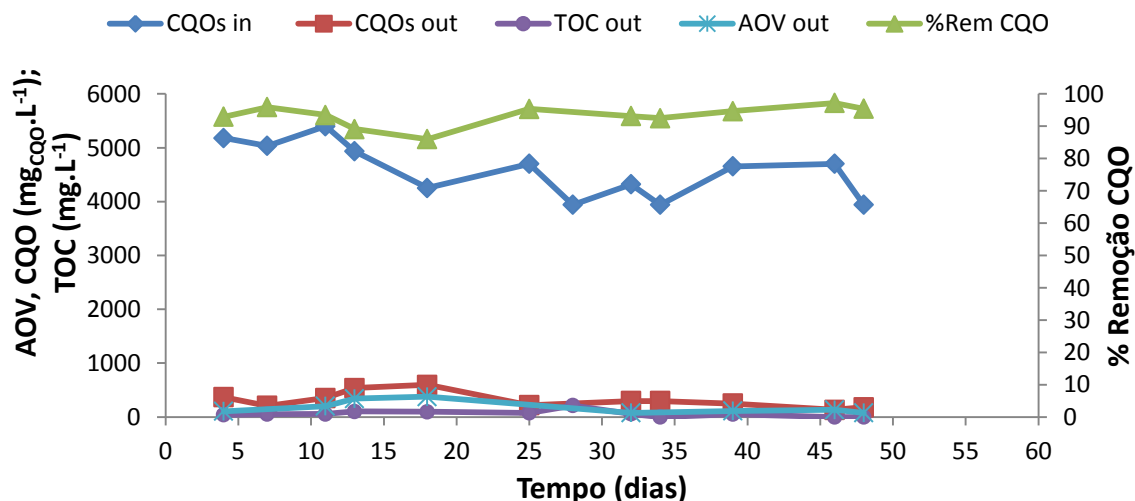


Figura 35 - Operação do reator SBR6.

A elevada concentração de sólidos no efluente tratado deve-se a uma má sedimentação dos sólidos no reator, podendo levar a uma saída elevada de biomassa na fase de decantação como se pode observar na Figura 36.

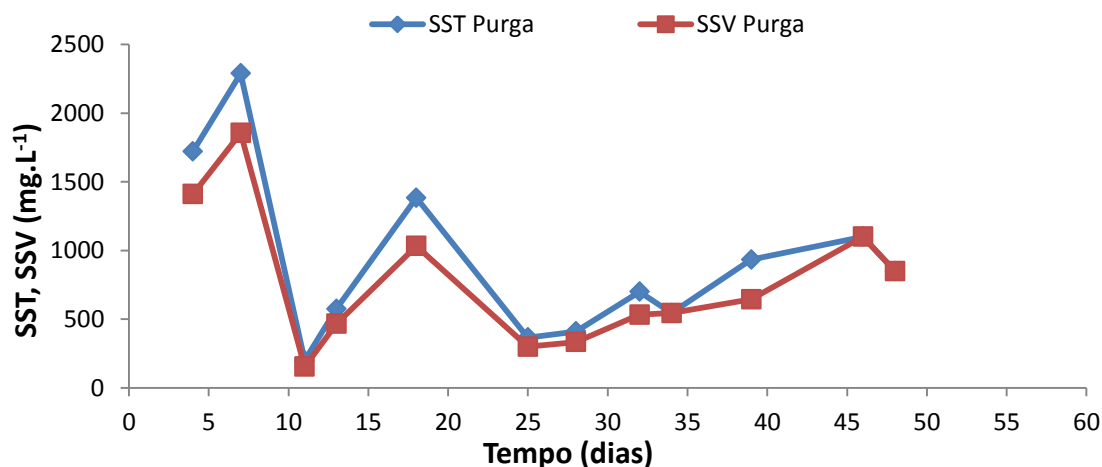


Figura 36 - Concentração de sólidos totais e voláteis na fase de decantação do SBR6.

Uma baixa carga orgânica leva ao consumo do glicocálice por parte das bactérias presentes em flocos, levando a uma dispersão das bactérias (Tandoi *et al.*, 2006). Com a perda de biomassa há uma diminuição da quantidade de bactérias presentes no reator, o que implica uma menor capacidade para consumir o substrato e conseqüente menor remoção da CQO. Após a falha elétrica verificou-se uma estabilização da concentração de sólidos. O facto de ter ocorrido um período anóxico permitiu o favorecimento da proliferação de filamentosas (Figura 37), em quantidade adequada, permitindo uma melhoria na sedimentabilidade da biomassa do reator.

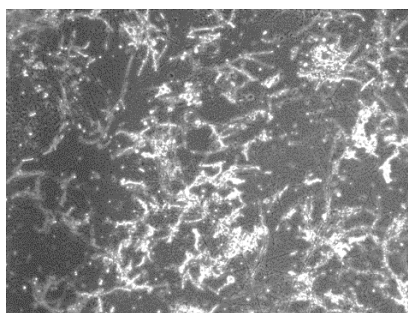


Figura 37 - Presença de microrganismos filamentosos no SBR6 (dia 40).

O SBR6 apresentou um consumo preferencial de ácido propiónico no período onde a remoção da CQO apresentava valores mais baixos, com o ácido n-butírico a ser consumido mais lentamente que os restantes (Figura 38). Todavia, após o dia 26 o n-butírico aparentava ser o substrato preferencial das bactérias, apresentando o ácido acético como o substrato de menor consumo.

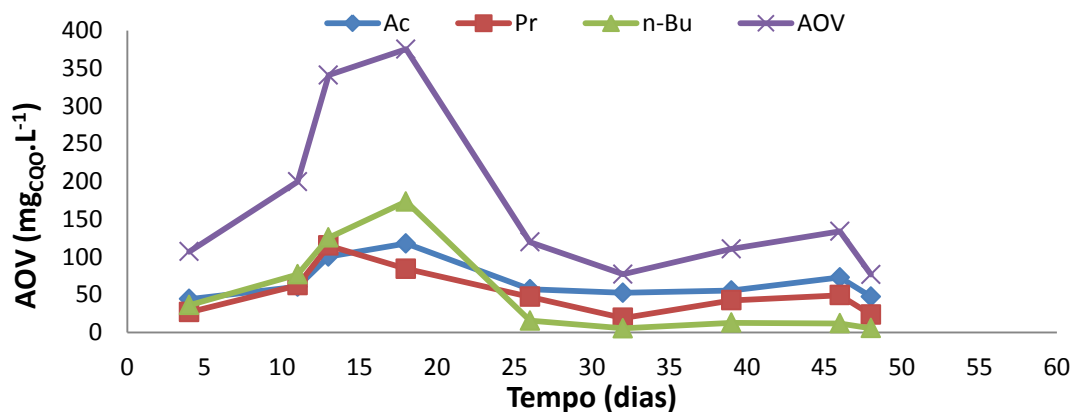


Figura 38 - Concentração de AOV discriminados na fase de decantação do reator SBR6.

Com a recolha de amostras ao longo dos ensaios procedeu-se à quantificação de PHA acumulado. O SBR5 apresentou uma acumulação máxima de 11% de PHA, sendo 6% de monómero HV e 5% de monómero HB, no dia 30 de operação. No mesmo dia apresentou uma maior remoção de CQO por parte dos microrganismos, após o período anaeróbio a que foram expostos. No dia 44 de operação o SBR5 apresentou uma redução significativa na sua taxa de remoção da CQO (69%), apresentando uma relação direta com a acumulação de PHA, uma vez que a acumulação de PHA nesse dia foi de aproximadamente 5%. Ao longo do restante período de operação do reator a acumulação de PHA aumentou, sem conseguir atingir o máximo do dia 30.

No período entre o dia 10 e 30, o ácido acético foi o que apresentou um maior consumo por parte das bactérias, contudo a acumulação de monómeros HV foi sempre superior à de HB ao longo de todo o ensaio. Seria de esperar uma maior acumulação de monómeros HB do que HV nesse período, uma vez que o acético é um precursor direto do monómero HB.

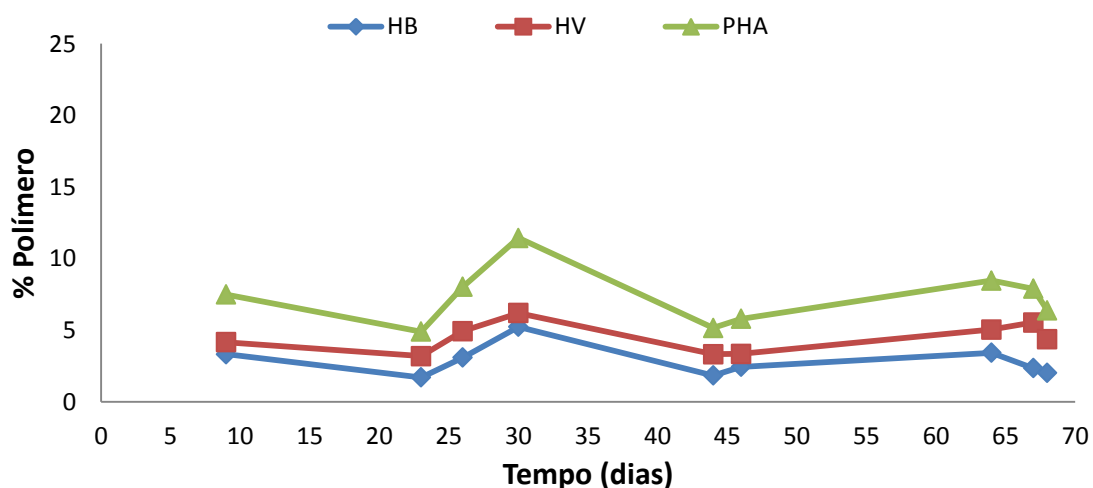


Figura 39 - Quantificação de polímero no ensaio do SBR5.

No reator SBR6 o dia 11 apresentou a maior acumulação de polímero (11% do peso seco das células) por parte das bactérias, quando alimentadas com uma carga orgânica de 1 g/L, havendo um equilíbrio de formação de monómeros HV (6%) e HB (5%). No restante período de operação do reator este não atingiu um valor de acumulação tão elevado como no dia 11, apresentando um declínio evidente na acumulação de monómeros de HB. O declínio da acumulação (dia 11 a 18) deve-se a uma redução na capacidade de remoção da CQO (89%). No entanto, com o período anóxico das bactérias, estas apresentaram uma ligeira melhoria no consumo de AOV (e conseqüente remoção da CQO, uma média de 95%), apresentando o n-butírico como o substrato preferencial. Apesar de apresentar um elevado consumo de AOV e elevada remoção da CQO, a acumulação de polímero foi muito reduzida. Esta situação pode ser explicada pela incapacidade de formação de flocos por parte dos microrganismos, havendo apenas a presença de microflocos, dificultando a sedimentação e seleção de culturas.

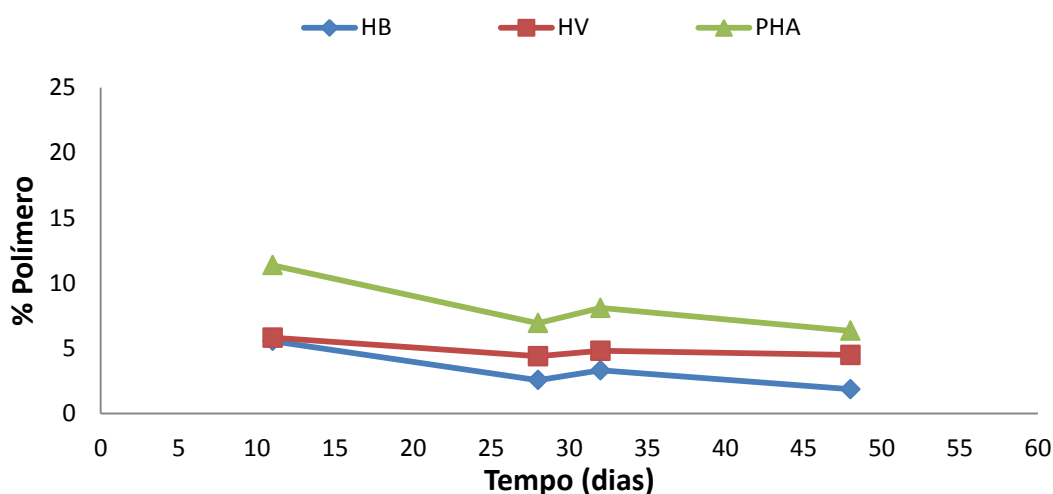


Figura 40 - Quantificação de polímero no ensaio do SBR6.

Em ambos os casos verificou-se uma elevada taxa de remoção da CQO ao longo dos ensaios, indicando que se tratou de culturas adequadas ao tratamento de efluentes com elevado teor de carbono. No entanto, não apresentaram boas características de floculação devido, por um lado, à elevada carga orgânica de substrato a que foram

expostas (SBR5), não produzindo glicocálice (flocos de pequena dimensão) e por outro devido ao aparecimento de microrganismos filamentosos (SBR6). As fracas características de floculação impedem que ocorra uma boa seleção de culturas. Podemos assim concluir que para uma boa seleção de culturas microbianas com capacidade de acumulação de PHA é necessário ter em conta a carga orgânica aplicada, não devendo ser demasiado elevada ou baixa como neste ensaio, de maneira a que a cultura apresente boas características de floculação. Pensa-se assim que uma carga intermédia de 2 g_{CCO}/L.d seria aconselhável.

4.1.4 Seleção de culturas utilizando soro de queijo fermentado

Com vários ensaios efetuados com a utilização de substrato constituído por ácidos voláteis puros, neste ensaio optou-se por testar uma seleção de culturas utilizando um resíduo industrial rico em carbono (soro de queijo fermentado). Previamente a ser alimentado ao SBR, o soro sofreu um pré-tratamento através de uma acidificação anaeróbia para a produção de AOV. A inoculação do reator SBR7 foi efetuada segundo as condições destacadas na Tabela 13.

Tabela 13 - Inoculação do SBR para seleção de culturas utilizando soro fermentado.

Reatores	Lamas utilizadas	Biomassa [g _{SSV} /L]	Volume do reator [L]	Carga orgânica [g _{CQO} /L.d]
SBR7	ETAR Sul SimRia	2	5	1

O SBR7 apresentou também uma elevada eficácia de remoção da CQO ao longo de toda a sua operação. Considerando que este ensaio foi efetuado como uma simulação no tratamento de um efluente/resíduo industrial podemos verificar que as culturas mistas utilizadas como inóculo e selecionadas nesta fase são é uma opção viável para o tratamento, apresentando ainda a vantagem de se poder valorizar o efluente através da produção de polímeros com elevado potencial comercial.

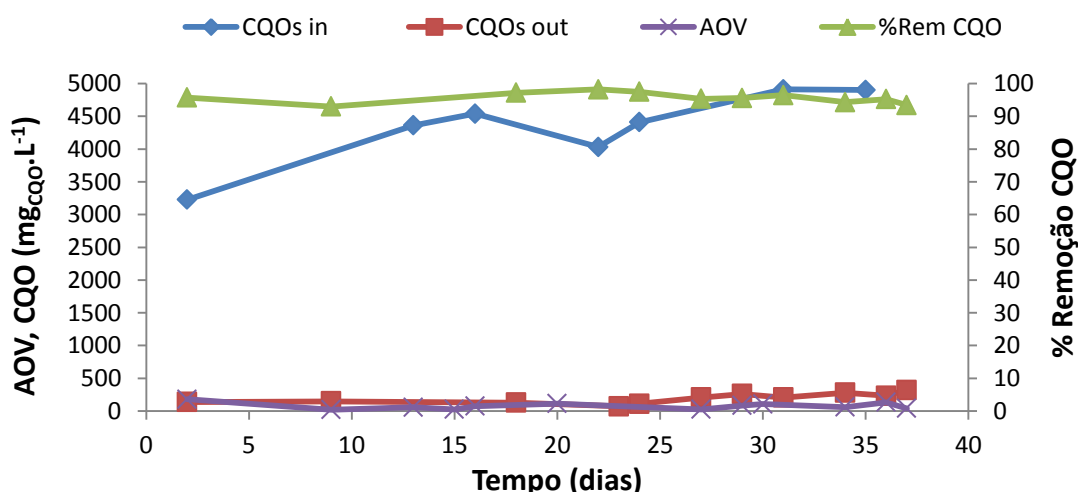


Figura 41 - Operação do SBR7.

O soro de queijo após acidificação anaeróbia, apresentava concentrações mais elevadas de ácido n-butírico, seguido do acético e propiônico (Tabela 14 - Caracterização do soro de queijo fermentado.). Os restantes ácidos formados apresentavam apenas concentrações menores, tornando a sua influência mínima no ensaio. Ao analisar a Tabela 14 - Caracterização do soro de queijo fermentado. e a Figura 42 é possível determinar que o n-butírico foi o substrato preferencial por parte das bactérias, uma vez que apresenta uma concentração mais reduzida e constante no efluente tratado e uma tendência constante ao longo de todo o ensaio. As concentrações de AOV no efluente tratado apresentavam-se maiores para o ácido acético, indicando que este foi o substrato que as bactérias menos consumiram ou que o ácido n-butírico pode ter sido convertido a ácido acético por parte das bactérias presentes.

Tabela 14 - Caracterização do soro de queijo fermentado.

Ac [mg _{CQO} /L]	Pr [mg _{CQO} /L]	i-Bu [mg _{CQO} /L]	n-Bu [mg _{CQO} /L]	AOV _{total} [mg _{CQO} /L]
776	631	16	4794	6682

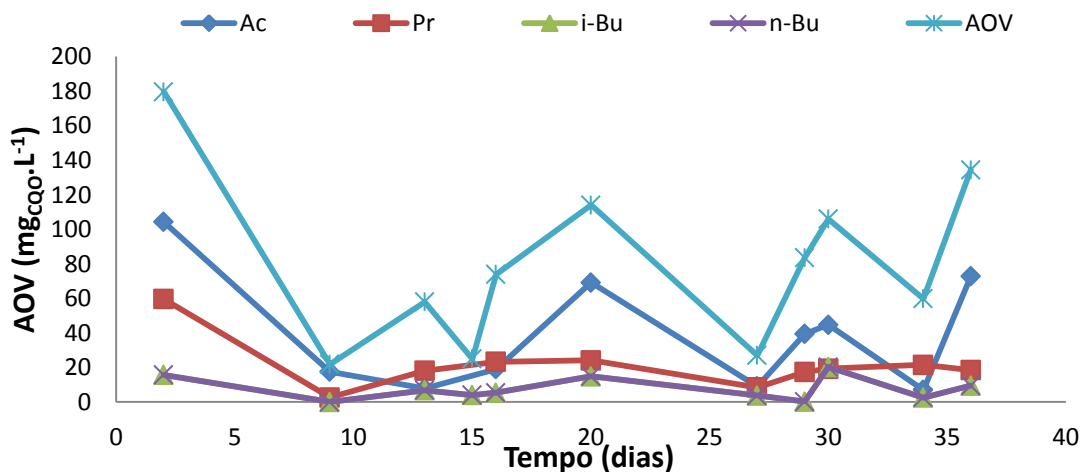


Figura 42 - Concentração de AOV discriminados na fase de decantação do reator SBR7.

Numa fase inicial o reator SBR7 apresentava uma boa capacidade de sedimentação, indicando uma boa formação de flocos (Figura 43a), comprovada também pela baixa concentração de sólidos na fase de decantação do reator (Figura 44).

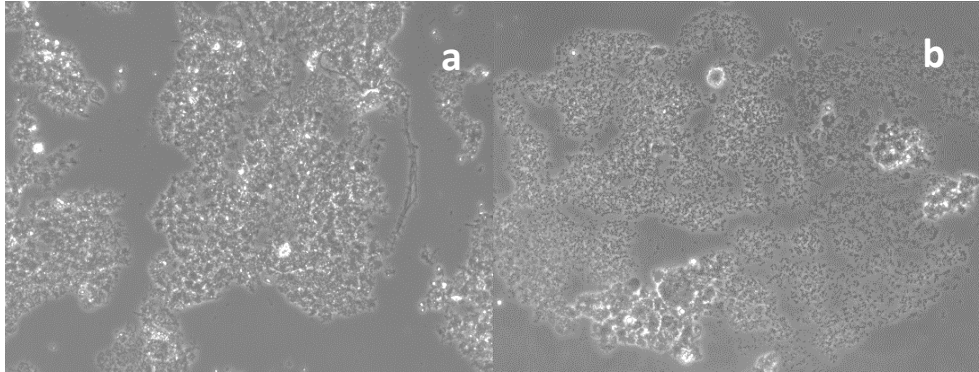


Figura 43 - Observação microscópica direta do dia 0 (a) e 24 (b) de operação do SBR7.

No entanto, assim como aconteceu com o SBR6, como a carga orgânica da alimentação é baixa, as bactérias acabam por consumir o glicocálice que permite a formação de flocos de maior dimensões. Podemos verificar pela Figura 44 que após 23 dias de operação a concentração de sólidos aumenta consideravelmente, indicando que a sedimentabilidade do reator diminui, devido fundamentalmente aos flocos serem mais pequenos (Figura 43b).

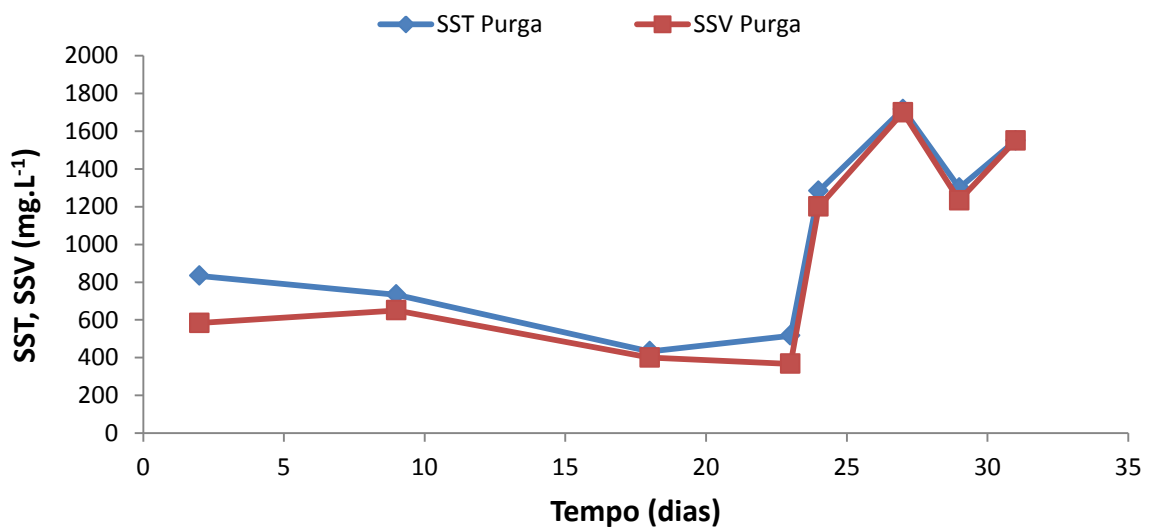


Figura 44 - Concentração de sólidos na fase de decantação do reator SBR7.

4.2 Ensaio de acumulação de PHA

Foram realizados ensaios para testar a capacidade das culturas selecionadas nos SBR para acumulação de PHA em reatores descontínuos, utilizando diferentes substratos acidificados. Os substratos escolhidos foi o fermentado da fração orgânica de resíduos sólidos urbanos (FORSU) e o fermentado de soro de queijo (com ou sem precipitação prévia de proteínas).

4.2.1 Ensaio com FORSU fermentada

Inicialmente foi feito um ensaio utilizando FORSU fermentada como substrato com as culturas microbianas selecionadas no reator SBR5, utilizando a metodologia mencionada em 3.3.

A FORSU fermentada apresentava uma maior predominância de ácido n-butírico, seguido de ácido acético e propiónico (Tabela 15).

Tabela 15 - Caracterização da FORSU fermentada.

Ac [mg _{CQO} /L]	Pr [mg _{CQO} /L]	n-Bu [mg _{CQO} /L]	AOV _{total} [mg _{CQO} /L]
92	45	113	256

Neste ensaio foi possível obter uma acumulação máxima de PHA de 10% do peso seco das células após a primeira hora de ensaio, seguido de uma redução gradual durante as cinco horas seguintes, atingindo o valor mínimo de 5%. Após 5,5h de operação efetuou-se um pulso no ensaio (linha tracejada na Figura 45), de maneira a otimizar a acumulação nas células. Ocorreu uma melhoria na acumulação de PHA (8%), sem no entanto atingir o máximo anterior de 10%, mantendo-se constante durante o restante tempo do ensaio. Os monómeros preferenciais de PHA acumulados por parte das bactérias foram os HV, tal como aconteceu durante o processo de seleção de cultura realizada no reator SBR5, indicando que as bactérias selecionadas apresentavam uma via metabólica preferencial para a acumulação de monómeros HV.

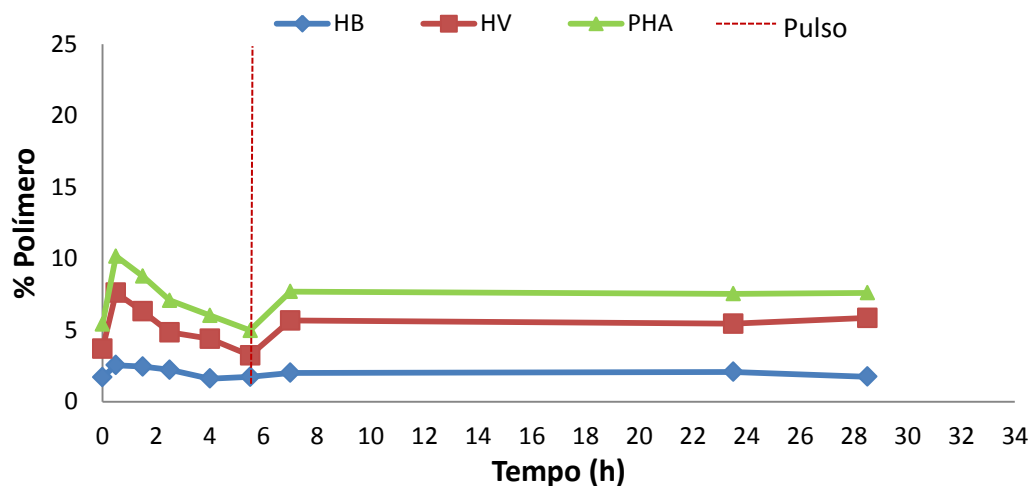


Figura 45 - Quantificação de polímero no ensaio descontínuo 1.

A Figura 46 vem corroborar o facto de as culturas seleccionadas no SBR5 apresentarem uma via metabólica preferencial para a acumulação de monómeros HV. Como foi referido anteriormente, o ácido acético é um precursor direto de monómeros HB. Contudo, na presença de outros ácidos orgânicos, a produção de polímeros apresenta composições monoméricas distintas devido às bactérias apresentarem vias metabólicas diferentes. O ácido acético demonstra ser o substrato consumido preferencialmente pelas bactérias, seguido pelo n-butírico, no entanto os monómeros HV são os que se apresentam em maior proporção.

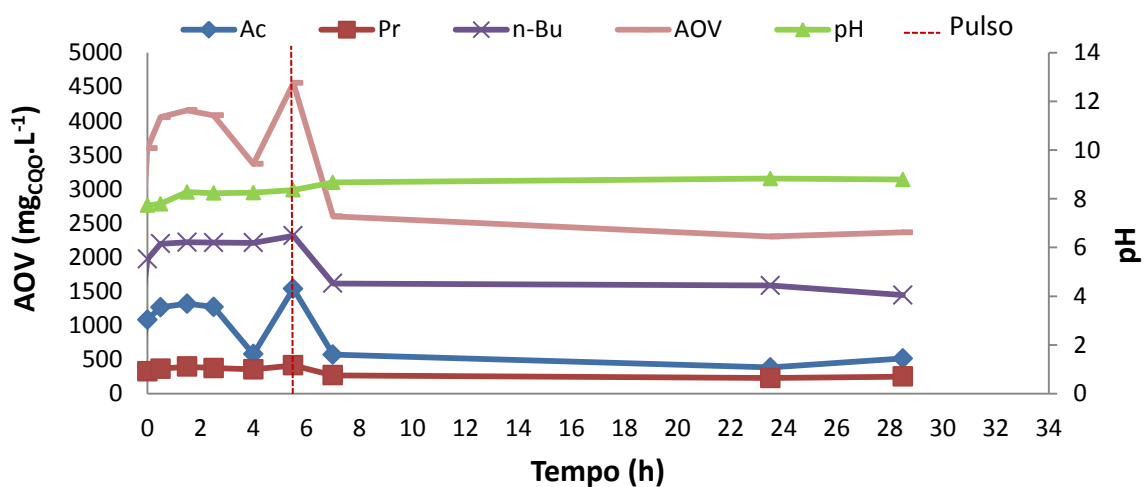


Figura 46 - Concentração de AOV ao longo do ensaio descontínuo 1.

4.2.2 Ensaio com soro fermentado sem precipitação prévia de proteínas

Realizaram-se dois ensaios descontínuos, utilizando bactérias provenientes do SBR7, no qual foi utilizado soro fermentado para a seleção de culturas, seguindo também a metodologia referida em 3.3. O soro de queijo fermentado utilizado apresentava a mesma constituição que mencionado anteriormente na Tabela 14.

Ao longo do primeiro ensaio foram efetuados dois pulsos para tentar obter uma maior acumulação de PHA por parte das bactérias de maneira a garantir um maior rendimento de acumulação. Com a adição de pulsos houve um aumento gradual na acumulação de PHA por parte das bactérias, atingindo um valor máximo de 15% num período aproximado de 6h. Os monómeros HB apresentaram um aumento significativo da sua concentração, apresentando-se como os monómeros predominantes no decorrer do ensaio de acumulação.

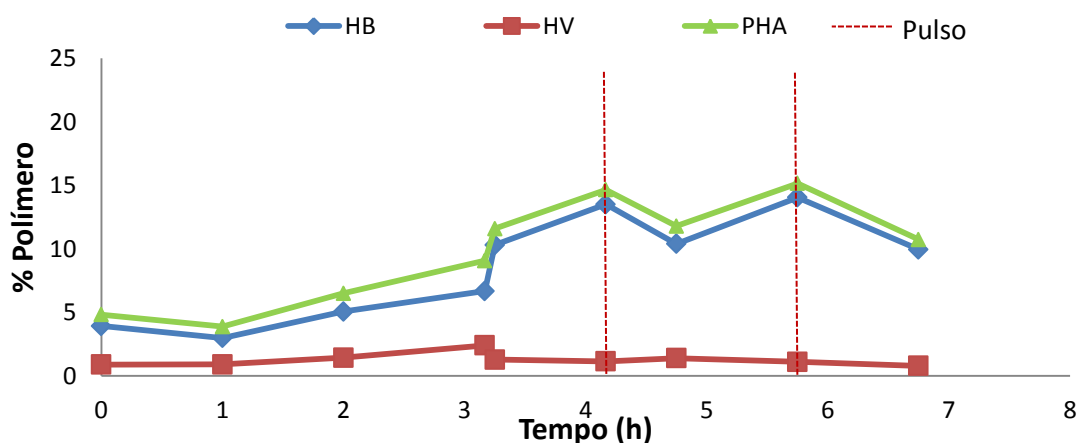


Figura 47 - Quantificação de Polímero no ensaio descontínuo 2.

A maior acumulação de monómeros HB deveu-se ao facto de o substrato utilizado ser muito rico em ácido acético e principalmente em n-butírico. Observando a Figura 48 é evidente uma maior concentração de n-Butirato, o que pode ter repercussões no género de monómeros formados pela via metabólica das bactérias. Segundo Marang *et al.* (2013), o butirato é o substrato preferencial das bactérias para a produção de PHA, convertendo-se na sua maioria em PHB, indicando uma maior formação de monómeros HB.

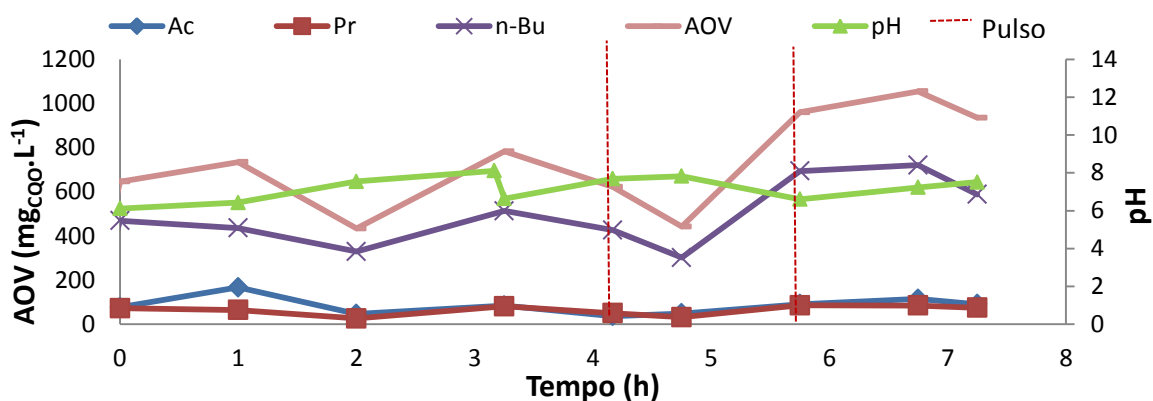


Figura 48 - Concentração de AOV ao longo do ensaio descontínuo 2.

Terminado o primeiro ensaio com soro fermentado procedeu-se a um segundo, em condições idênticas ao ensaio anterior, prolongando-se um pouco mais o tempo de operação (29h). O ensaio foi iniciado, verificando que apresentava uma taxa de acumulação inferior (5%) relativamente ao ensaio anterior (15%) ao fim de 6h de operação. Procedeu-se então a um período de fome de aproximadamente 18h, após o qual se iniciou um pulso. Ao iniciar o pulso observou-se um aumento da velocidade de degradação de substrato, ocorrendo um aumento na acumulação de PHA. Ao fim de quatro pulsos verificou-se uma acumulação cada vez maior alcançando uma acumulação máxima de 15% do peso seco das células no final da operação, triplicando o seu valor inicial de 5%. O monómero de HB aparenta ser o que é acumulado em maior percentagem, representando praticamente os 15% de acumulação total por parte das células.

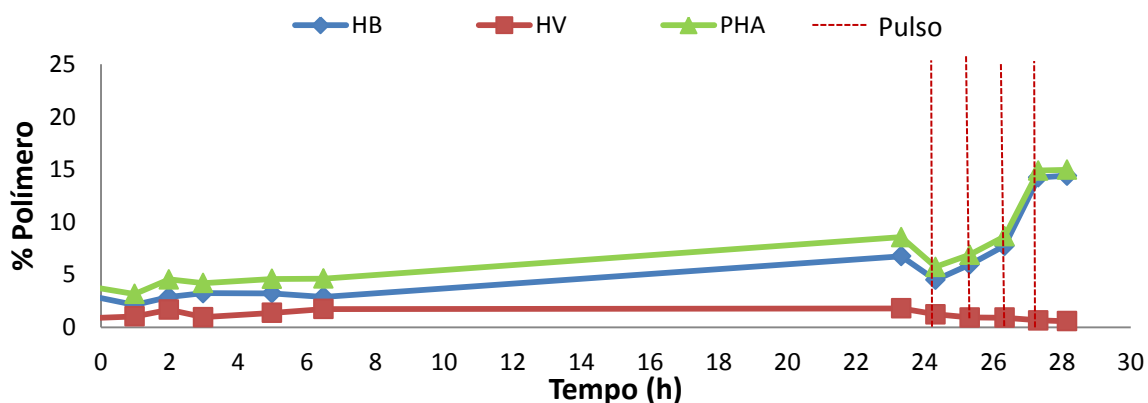


Figura 49 - Quantificação de Polímero no ensaio descontínuo 4.

Neste segundo ensaio é possível uma melhor observação em como o ácido n-butírico era o substrato maioritário do soro acidificado que as bactérias selecionadas pelo SBR7 utilizavam. Como a Figura 50 demonstra, a concentração do ácido acético e propiónico foi baixa e constante ao longo de praticamente todo o ensaio, variando apenas a do ácido n-butírico. No decorrer do período de fome gerada verifica-se a redução de concentração do ácido n-butírico, acompanhando a tendência do consumo de AOV nos pulsos efetuados, o que demonstra que houve uma melhor adaptação da cultura proveniente do SBR 27 a este ácido.

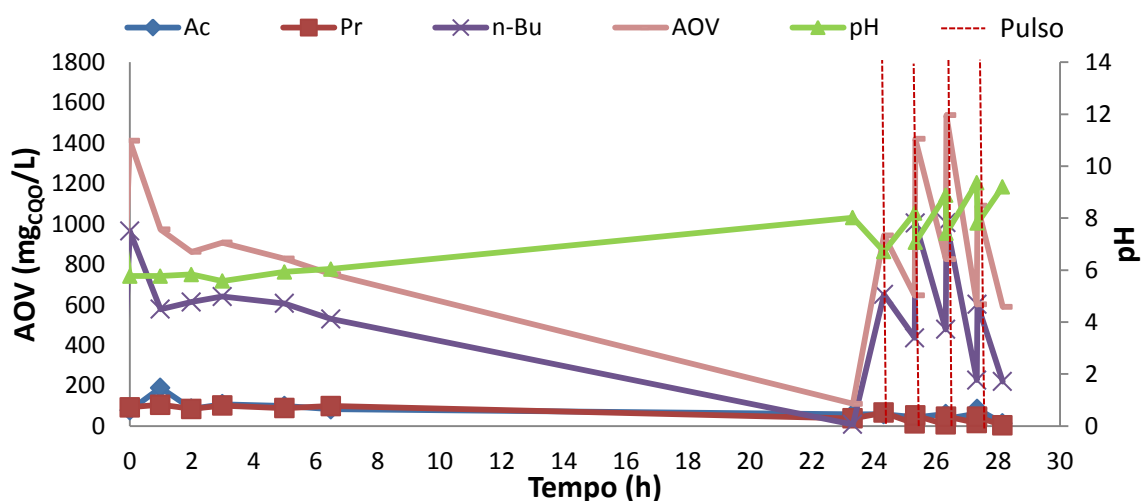


Figura 50 - Concentração de AOV ao longo do ensaio descontínuo 4.

Na realização dos ensaios com soro fermentado consegue-se concluir que o efluente é um bom substrato para a acumulação de monómeros HB, uma vez que o substrato alimentado apresentou uma elevada concentração de ácido n-butírico na sua composição. Na Figura 51 podemos observar que as culturas acumuladoras que se conseguiram selecionar apresentavam uma boa capacidade de sintetização de PHA. Contudo, as bactérias presentes na biomassa retirada do SBR7 apresentavam uma baixa percentagem de acumulação de PHA. Esta situação pode ser explicada pela presença de

bactérias com baixa capacidade de sintetização de PHA, indicando que houve a necessidade de adaptar a cultura selecionada no SBR7 para as novas condições.

Pela análise da Figura 51 - Observação microscópica de amostras do ensaio de acumulação 4 com a técnica de azul do Nilo no início do ensaio (a, b – 0h) e no final (c, d – 28h). Azul do Nilo sem fluorescência (a, c); Azul do Nilo com fluorescência (b, d). verificou-se que ocorreu a acumulação de PHA, acompanhada por uma diminuição da concentração de AOV, o que levou a uma remoção da CQO. Pelas percentagens de remoção alcançadas (superior a 90%) anteriormente no reator SBR7 é possível considerar que para além de ser um bom sistema de tratamento de efluentes/resíduos industriais, possibilita ainda uma valorização orgânica sob a forma de produção de PHA.

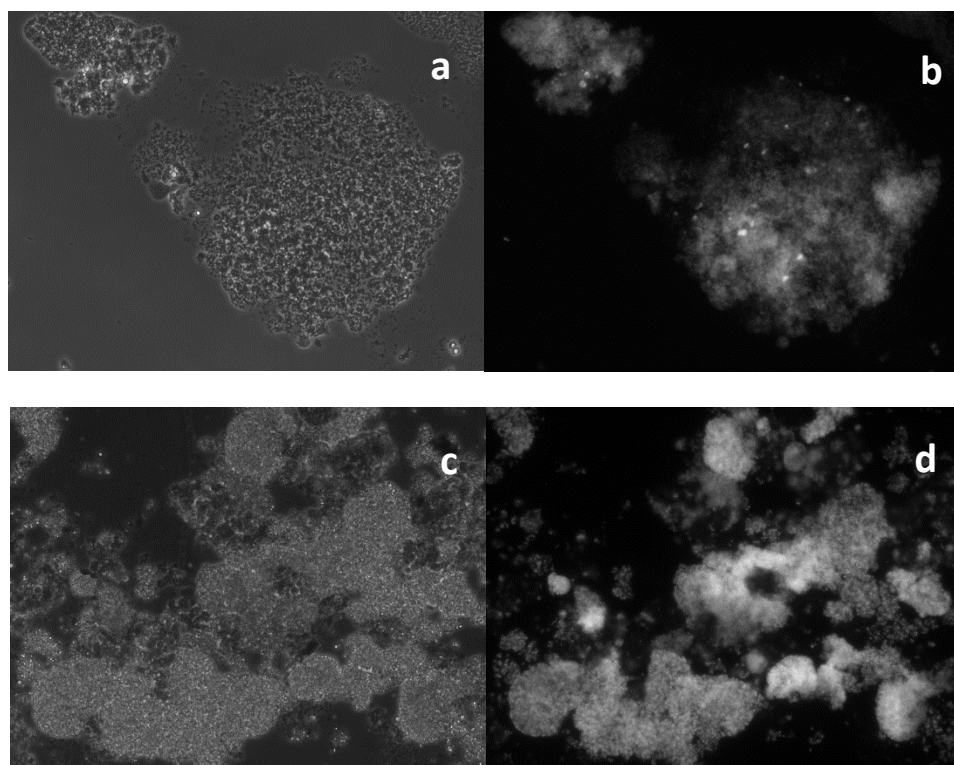


Figura 51 - Observação microscópica de amostras do ensaio de acumulação 4 com a técnica de azul do Nilo no início do ensaio (a, b – 0h) e no final (c, d – 28h). Azul do Nilo sem fluorescência (a, c); Azul do Nilo com fluorescência (b, d).

4.2.3 Ensaio com soro fermentado com precipitação prévia de proteínas

Foi efetuado um ensaio descontínuo de soro fermentado, no qual se efetuou a precipitação de proteínas, de modo a desviar o consumo de carbono do crescimento celular para a acumulação de PHA. As proteínas, apesar de também serem uma fonte de carbono, contribuem para um maior nível de azoto (constitui 16% da sua estrutura) (Tandoi *et al.*, 2006), o que diminui a possibilidade dos microrganismos acumularem PHA. Para a precipitação das proteínas recorreu-se a uma autoclavagem a uma temperatura de 120 °C, durante um período de 15min para se conseguir retirar a maioria das proteínas presentes no resíduo.

Após a precipitação das proteínas iniciou-se o ensaio descontínuo de acumulação, utilizando a mesma metodologia usada nos ensaios anteriores. Neste ensaio foi também utilizada a cultura selecionada pelo reator SBR7, obtendo-se neste caso uma acumulação máxima de 12% após 6h de operação, mantendo-se constante até ao final do ensaio. O monómero de HB apresentava-se novamente em maior percentagem (aproximadamente 12%), apresentando uma acumulação praticamente nula do monómero de HV por parte das bactérias.

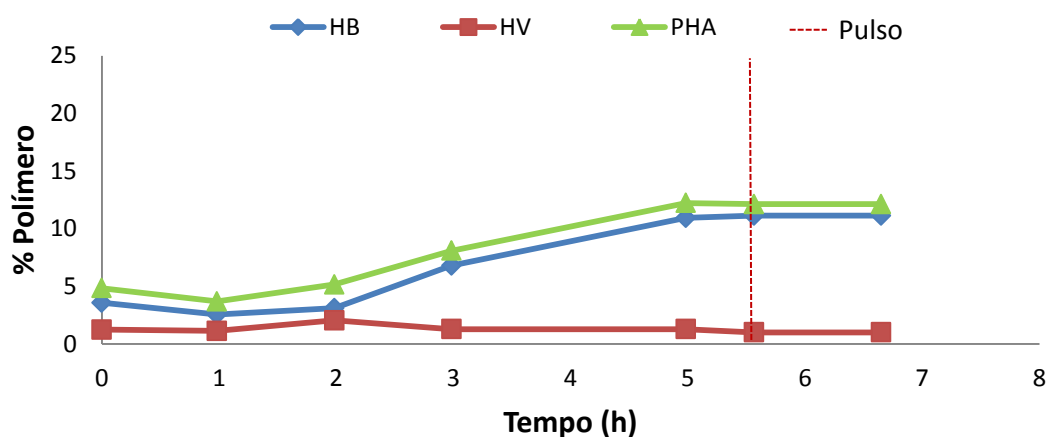


Figura 52 - Quantificação de Polímero no ensaio descontínuo 3.

O consumo do substrato no decorrer do ensaio aparentava ser mais lento (Figura 53) que nos ensaios anteriores (Figura 48 e Figura 50), apresentando um consumo mais acentuado após 5h de operação. Esta demora do consumo de substrato pode deve-se ao facto de as bactérias estarem expostas a um meio diferente ao qual foram seleccionadas (menor concentração de azoto). As culturas microbianas presentes no inóculo utilizado podem necessitar de um período de adaptação, uma vez que foram inicialmente alimentadas com um soro rico em proteínas. Após o período de adaptação da biomassa (5h) ocorre um consumo mais acentuado de substrato (Figura 52), acabando por ser introduzido um pulso (próximo das 6h de operação), apresentando uma maior taxa de acumulação de polímero nesse momento, mantendo-se constante até ao fim do ensaio.

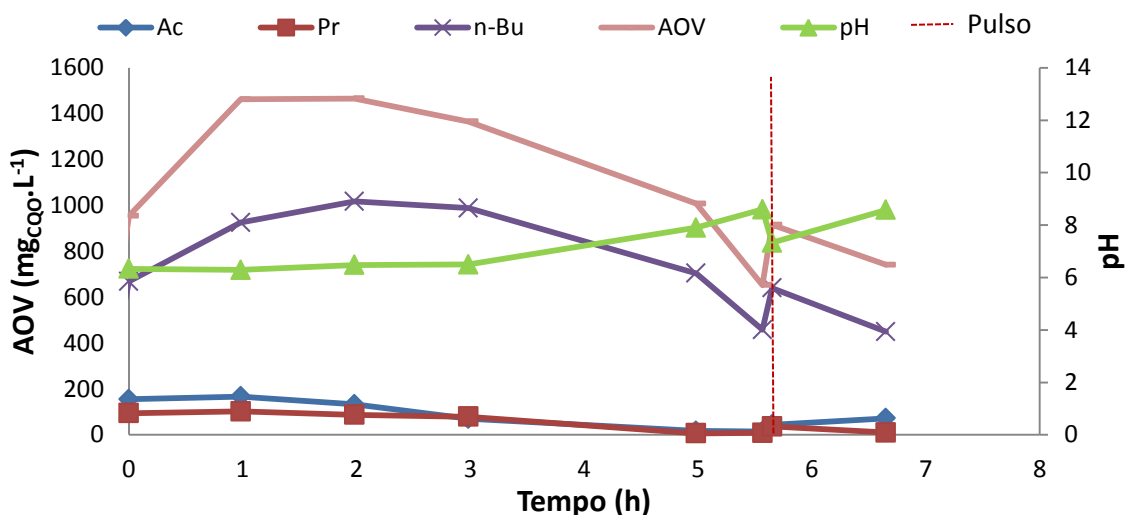


Figura 53 - Concentração de AOV ao longo do ensaio descontínuo 3.

Avaliando o desempenho geral dos ensaios de acumulação verifica-se que o ensaio sem a precipitação de proteínas apresentava melhores resultados de acumulação, necessitando de menos tempo para obter uma acumulação de 15% (ensaio 2). Verifica-se também que alterando o meio (ensaio 3) ou o substrato (ensaio 1) no qual as culturas foram seleccionadas, obrigando a um período de adaptação, levando um maior período de tempo para iniciar a degradação do substrato e a acumulação de PHA.

Conclusão e Trabalhos Futuros

5. Conclusão

Os inóculos utilizados para a seleção de culturas produtoras de PHA neste trabalho apresentaram um bom desempenho em termos de tratamento para todos os ensaios SBR, sendo possível encontrar valores de remoção da CQO acima de 90%. Contudo é necessário ter em atenção algumas condições para se poder ter uma boa seleção de culturas produtoras de PHA.

A temperatura ambiente influencia a seleção de culturas produtoras de PHA. No decorrer dos ensaios, a exposição a uma temperatura ambiente muito baixa (10 - 13 °C) apresentou uma proliferação de microrganismos filamentosos, afetando a sedimentabilidade dos sólidos nos reatores. Os microrganismos filamentosos, apesar de serem capazes de acumular PHA, apresentam uma baixa capacidade de acumulação (5% do peso total das células secas), assim como apresentam problemas na extração dos biopolímeros intracelulares produzidos por serem constituídas maioritariamente por paredes celulares, indicando ser economicamente pouco viável a sua utilização como bactérias acumuladoras de PHA.

A carga orgânica aplicada aos reatores não deve ser muito baixa ou muito elevada, pois pode também influenciar a sedimentação de sólidos no reator, dificultando o processo de seleção de culturas e a sua retenção no reator. Nos ensaios realizados, obtiveram-se melhores resultados para cargas orgânicas intermédias de 2 g/L (SBR1 e SBR2), verificando-se que para cargas elevadas de 4 g/L as bactérias não produzem glicocálice, dificultando a floculação e consequente sedimentação de sólidos. Para cargas baixas de 1 g/L também houve dificuldade de floculação devido às bactérias consumirem o glicocálice, dificultando a agregação e consequente retenção da cultura nos reatores.

A seleção nos SBR de culturas produtoras de PHA utilizando o soro de queijo fermentado apresentou os melhores resultados nos ensaios de acumulação em reatores descontínuos, uma vez que se manteve o mesmo substrato para a seleção das culturas e para os ensaios de acumulação de PHA. É importante manter o mesmo meio na seleção e na acumulação, uma vez que permite uma adaptação das células a um certo tipo de

substrato, permitindo atingir uma maior acumulação de PHA nas células num menor período de tempo.

A utilização de efluentes/resíduos industriais ricos em carbono ou da fração orgânica dos resíduos sólidos urbanos fermentados pode ser uma boa alternativa à atual utilização de açúcares como substrato para a produção de PHA. Através do controlo do processo de fermentação de resíduos orgânicos é possível definir que tipo de polímeros se pretendem produzir, uma vez que a sua sintetização a partir dos vários AOV pode apresentar vias metabólicas diferentes consoante o tipo de ácidos de partida.

6. Trabalhos Futuros

Em trabalhos futuros é recomendável o controlo da temperatura ambiente, não permitindo exposições a temperaturas baixas, evitando a proliferação de microrganismos filamentosos.

A carga orgânica a aplicar deve situar-se entre 1 – 4 g/L.d de maneira a evitar a formação de microflocos e de um crescimento disperso das bactérias presentes, beneficiando a sedimentação dos sólidos e a seleção de culturas.

Manter um maior tempo de seleção de maneira a favorecer microrganismos acumuladores de PHA

O estudo de outros tipos de substratos na seleção de culturas e ensaios de acumulação.

Bibliografia

7. Bibliografia

- AKARAONYE, Everest; KESHAVARZ, Tajalli; ROY, Ipsita. 2010- Production of polyhydroxyalkanoates: the future green materials of choice. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**. 85:6 p. 732–743.
- ALBUQUERQUE, M. G. E.; MARTINO, V.; POLLET, E.; AVÉROUS, L.; REIS, M. A. M. 2011- Mixed culture polyhydroxyalkanoate (PHA) production from volatile fatty acid (VFA)-rich streams: effect of substrate composition and feeding regime on PHA productivity, composition and properties. **Journal of biotechnology**. 151:1 p. 66-79
- 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**. 44:11 p. 3419–3433.
- ALBUQUERQUE, Maria G. E.; CARVALHO, Gilda; KRAGELUND, Caroline; Silva, Ana F; BARRETO CRESPO, Maria T; REIS, Maria a M; NIELSEN, Per H. 2012- Link between microbial composition and carbon substrate-uptake preferences in a PHA-storing community. **The ISME Journal**. 7:1 p. 1–12.
- ALVES, M.; MOTA, M. 2007- Reactores Biológicos Fundamentos e APLICAÇÕES. In FONSECA, M. M.; TEIXEIRA, J. A. (Eds.) - **Reactores Biológicos - Fundamentos e Aplicações**. Lisboa, Portugal : Lidel Edições Técnicas,. p. 373–392.
- APA - **Agencia Portuguesa do Ambiente** [Em linha], atual. 2014. Disponível em WWW:<URL:<http://www.apambiente.pt/index.php?ref=16&subref=84&sub2ref=108&sub3ref=209>>.
- Arroja, Luís; Capela, Isabel; Nadais, Helena; Serafim, Luísa S.; Silva, Flávio. 2012- Acidogenic Valorisation of High Strength Waste Products from Food Industry. **Industrial Waste**, Prof. Kuan-Yeow Show (Ed.), InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/industrial-waste/acidogenic-valorisation-of-high-strength-waste-products-from-food-industry>
- BENGTSSON, Simon; WERKER, Alan; CHRISTENSSON, Magnus; WELANDER, Thomas. 2008 - Production of polyhydroxyalkanoates by activated sludge treating a paper mill wastewater. **Bioresource technology**. 99:3 p. 509–16.
- BENGTSSON, Simon; WERKER, Alan; WELANDER, Thomas. 2008 - Production of polyhydroxyalkanoates by glycogen accumulating organisms treating a paper mill wastewater. **Water science and technology : a journal of the International Association on Water Pollution Research**. 58:2 p. 323–30.
- CHEE, JY; YOGA, SS; LAU, NS. 2010 - Bacterially produced Polyhydroxyalkanoate (PHA): converting renewable resources into bioplastics. **Technology and Education Topics in**

- Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**, Méndez-Vilas, A. (Ed.) p. 1395–1404.
- CHEN, Guo-Qiang. 2009- A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry. **Chemical Society reviews**. 38:8 p. 2434–46
- DIAS, Ana Maria; TEIXEIRA, Ana; AZEVEDO, Fátima; GONÇALVES, Lucinda; GUERRA, Miguel Déjean; RIBEIRO, Rita; RODRIGUES, Sofia; ALVARENGA, António. - **Relatório do Estado do Ambiente 2013** [Em linha] Disponível em WWW:<URL:http://www.apambiente.pt/_zdata/DESTAQUES/2013/REA_2013_Final_4_dezembro.pdf>.
- DIAS, João M. L.; LEMOS, Paulo C; SERAFIM, Luísa S; OLIVEIRA, Cristina; EIROA, Marta; ALBUQUERQUE, Maria G E; RAMOS, Ana M; OLIVEIRA, Rui; REIS, Maria a M. 2006- Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by mixed aerobic cultures: from the substrate to the final product. **Macromolecular bioscience**. 6:11 p. 885–906.
- FLOR, A.; ARROJA, L.; CAPELA, I. 2002- Co-digestão anaeróbia da fracção orgânica dos resíduos sólidos urbanos (FORSU) e Lamas Secundárias (LS). **researchgate.net**. Issue 1.
- GRAGE, Katrin; JAHNS, Anika C.; PARLANE, Natalie; PALANISAMY, Rajasekaran; RASIAH, Indira A.; ATWOOD, Jane A.; REHM, Bernd H. A. 2009 - Bacterial Polyhydroxyalkanoate Granules: Biogenesis, Structure, and Potential Use as Nano-/Micro-Beads in Biotechnological and Biomedical Applications. **Biomacromolecules**. 10:4 p. 660–669.
- HOTTLE, Troy A.; BILEC, Melissa M.; LANDIS, Amy E. 2013 - Sustainability assessments of bio-based polymers. **Polymer Degradation and Stability**. 98:9 p. 1898–1907.
- JACQUEL, Nicolas; LO, Chi-Wei; WEI, Yu-Hong; WU, Ho-Shing; WANG, Shaw S. 2008 - Isolation and purification of bacterial poly(3-hydroxyalkanoates). **Biochemical Engineering Journal**. 39:1 p. 15–27.
- JENKINS, D.; RICHARD, M. G.; DAIGGER, G. T. 2004 - **Manual on the Causes Solids, and Control of Activated Sludge Bulking Foaming and Other Separation Problems**. London : IWA Publishing
- JOHNSON, Katja; JIANG, Yang; KLEEREBEZEM, Robbert; MUYZER, Gerard; VAN LOOSDRECHT, Mark C M. 2009- Enrichment of a mixed bacterial culture with a high polyhydroxyalkanoate storage capacity. **Biomacromolecules**. 10:4 670–6
- KHANNA, Shilpi; SRIVASTAVA, Ashok K. 2005 - Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. **Process Biochemistry**. 40:2 p. 607–619.
- KOLLER, Martin; SALERNO, Anna; MUHR, Alexander; REITERER, Angelika; BRAUNEGG, Gerhart. 2013 - POLYHYDROXYALKANOATES: BIODEGRADABLE POLYMERS AND PLASTICS FROM RENEWABLE RESOURCES. **Materiali in Tehnologije**. 47:1 p. 5–12.

- LAYCOCK, Bronwyn; HALLEY, Peter; PRATT, Steven; WERKER, Alan; LANT, Paul. 2014 - The chemomechanical properties of microbial polyhydroxyalkanoates. **Progress in Polymer Science**. 39:2 p. 397–442.
- LEE, Wee Shen; CHUA, Adeline Seak May; YEOH, Hak Koon; NGOH, Gek Cheng. 2014 - A review of the production and applications of waste-derived volatile fatty acids. **Chemical Engineering Journal**. 235 p. 83–99
- MADKOUR, Mohamed H.; HEINRICH, Daniel; ALGHAMDI, Mansour; SHABBAJ, Ibraheem; STEINBÜCHEL, Alexander. 2013 - PHA recovery from biomass. **Biomacromolecules**. 14:9 p. 2963–2972.
- MADSEN, Michael; HOLM-NIELSEN, Jens Bo; ESBENSEN, Kim H. 2011 - Monitoring of anaerobic digestion processes: A review perspective. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. 15:6 p. 3141–3155.
- MARANG, Leonie; JIANG, Yang; VAN LOOSDRECHT, Mark C M; KLEEREBEZEM, Robbert. 2013- Butyrate as preferred substrate for polyhydroxybutyrate production. **Bioresource technology**. 142 p. 232–239.
- METCALF, E.; EDDY, H. 2003 - **Wastewater engineering: treatment and reuse** [Em linha]. 1819 p. Disponível em WWW:<URL:<http://www.lavoisier.fr/notice/fr097556.html>>. ISBN 0-07-041878-0.
- NIZA, Samuel; SANTOS, Eduardo; COSTA, Inês; RIBEIRO, Paulo; FERRÃO, Paulo. 2014 - Extended producer responsibility policy in Portugal: a strategy towards improving waste management performance. **Journal of Cleaner Production**. 64 p. 277–287
- PARDELHA, F.; ALBUQUERQUE, M. G. E.; CARVALHO, G.; REIS, M. a M.; DIAS, J. M. L.; OLIVEIRA, R. 2013 - Segregated flux balance analysis constrained by population structure/function data: The case of PHA production by mixed microbial cultures. **Biotechnol Bioeng**. 110:8 p. 2267–2276.
- PARDELHA, Filipa; ALBUQUERQUE, Maria G.E.; REIS, Maria a.M.; DIAS, João M.L.; OLIVEIRA, Rui. 2012 - Flux balance analysis of mixed microbial cultures: Application to the production of polyhydroxyalkanoates from complex mixtures of volatile fatty acids. **Journal of Biotechnology**. 162:2-3 p. 336–345.
- PERNTHALER, J.; GLÖCKNER, F. O.; SCHÖNHUBER, W.; AMANN, R. - Fluorescence in situ hybridization. In **Methods in Microbiology: Marine Microbiology**. Paul, J ed. London : Academic Press Ltd, [s.d.]
- REDDY, C. S. K.; GHAI, R.; RASHMI; KALIA, V C. 2003 - Polyhydroxyalkanoates: an overview. **Bioresource technology**. 87:2 p. 137–46.

- 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**. 25:6 p. 377–85.
- SERAFIM, Luísa S.; LEMOS, Paulo C.; REIS, Maria A M. 2000 - Produção de Bioplásticos por Culturas Microbianas Mistas. **Boletim de Biotecnologia**. p. 16–21.
- SERAFIM, Luisa S.; LEMOS, Paulo C.; ALBUQUERQUE, Maria G E.; REIS, Maria a M. 2008 - Strategies for PHA production by mixed cultures and renewable waste materials. **Applied microbiology and biotechnology**. 81:4 p. 615–628.
- SERAFIM, Luísa S.; LEMOS, Paulo C.; OLIVEIRA, Rui; REIS, Maria a M. 2004 - Optimization of polyhydroxybutyrate production by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding conditions. **Biotechnology and bioengineering**. 87:2 p. 145–160.
- SERAFIM, Luísa S.; LEMOS, Paulo C.; TORRES, Cristiana; REIS, Maria a M.; RAMOS, Ana M. 2008 - The influence of process parameters on the characteristics of polyhydroxyalkanoates produced by mixed cultures. **Macromolecular bioscience**. 8:4 p. 355–366.
- SINGH SAHARAN, Baljeet; GREWAL, Anita; KUMAR, Pardeep. 2014 - Biotechnological Production of Polyhydroxyalkanoates: A Review on Trends and Latest Developments. **Chinese Journal of Biology**. 2014 p. 1–18
- TANDOI, Valter; JENKINS, David; WANNER, Jiri (Eds.) 2006 - **Activated Sludge Separation Problems Theory, Control Measures, Practical Experience**. [S.l.] : IWA Publishing, ISBN 1900222841.
- VALENTINO, Francesco; BRUSCA, Angelo Antonio; BECCARI, Mario; NUZZO, Andrea; ZANAROLI, Giulio; MAJONE, Mauro. 2013 - Start up of biological sequencing batch reactor (SBR) and short-term biomass acclimation for polyhydroxyalkanoates production. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**. 88:2 p. 261–270.
- VERLINDEN, R. A J.; HILL, D J.; KENWARD, M.; WILLIAMS, C D.; RADECKA, I. 2007 - Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. **Journal of applied microbiology**. 102:6 p. 1437–49.
- YATES, Madeleine R.; BARLOW, Claire Y. 2013 - Life cycle assessments of biodegradable, commercial biopolymers—A critical review. **Resources, Conservation and Recycling**. 78 p. 54–66.

Anexos

8. Anexos

Reagentes usados na coloração de Azul do Nilo:

✓ Solução de NaCl a 0,9%

Adicionar 9 mL de NaCl em 1000 mL de água destilada.

✓ Corante Azul do Nilo

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

✓ Solução de Ácido acético a 8%

Adicionar 8 mL de ácido acético (CH₃CO₂H) a 100 mL de água destilada.

Reagentes usados em FISH:

✓ Solução de PBS, solução tampão fosfato salino pH 7,2

i) 30x PBS: adicionar 38,7 g de Na₂HPO₄.12H₂O, 6,6 g de NaH₂PO₄.2H₂O e 113,1 g de NaCl a 500 mL de água MiliQ. Autoclavar e armazenar.

ii) Diluir 1:10 para 3x de PBS (para fazer PFA) e autoclavar.

✓ Paraformaldeído (PFA) (4%)

i) Aquecer 65 mL de água purificada a 60°C

ii) Pesar 4 g de PFA em pó e adicionar à água

iii) Adicionar 2 gotas de NaOH 2M e o PFA deve dissolver-se em 1 a 2 minutos

iv) Arrefecer à temperatura ambiente e adicionar 33 mL de PBS 3x concentrado

v) Ajustar o pH para 7,2 com HCl 1M

vi) Filtrar com filtro de 0,2 µm para remover quaisquer cristais não dissolvidos

vii) Aplicar os volumes das alíquotas e congelar

✓ NaCl 5M

Adicionar 58 g de NaCl a 200 mL de água mili-Q. Depois de diluído, autoclavar.

✓ Tris-HCl 1M

Adicionar 31,5 g de Tris-HCl a 150 mL de água mili-Q, dissolver e ajustar o pH para 7,2 com NaOH 2M. Perfazer até 200 mL com água mili-Q. Autoclavar.

✓ EDTA 0,5M

Adicionar 18,6 g de hidrato de EDTA dissódico a 75 mL de água mili-Q. Ajustar o pH para 7,2 com NaOH. Perfazer até 100 mL com água mili-Q e autoclavar.

✓ SDS a 10%:

Dissolver 10 g de SDS em 100 mL de água mili Q.

✓ Formamida:

Este composto é tóxico, pelo que deve ser trabalhado na *hotte*. Fazer alíquotas de 2 mL de volume e congelar.

Tabela 16 - Quantidade de Formamida e água MiliQ para preparar solução de hibridação.

Quantidade de Formamida (µL)	% Formamida	Quantidade de água MiliQ (µL)
0	0	1598
100	5	1498
200	10	1398
300	15	1298
400	20	1198
500	25	1098
600	30	998
700	35	898
800	40	798
900	45	698
1000	50	598

Tabela 17 - Quantidade de NaCl e EDTA para preparar a solução tampão de lavagem.

% Formamida	Quantidade de NaCl (μL)	Quantidade de EDTA (μL)
0	9000	-
5	6300	-
10	4500	-
15	3180	-
20	2150	500
25	1490	500
30	1020	500
35	700	500
40	460	500
45	300	500
50	180	500