



**João Costa  
Correia**

**Seleção de culturas mistas em reatores SBR para  
produção de PHA**





**João Costa  
Correia**

**Seleção de culturas mistas em reatores SBR para  
produção de PHA**

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



## **o júri**

presidente

**Prof. Dr. Luís Manuel Guerreiro Alves Arroja**

professor associado do Departamento de Ambiente e Ordenamento da Universidade de Aveiro

**Prof. Dr. Cheng Chia-Yau**

professor auxiliar convidado da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Isabel Aparício Paulo Fernandes Capela**

professora associada do Departamento de Ambiente e Ordenamento da Universidade de Aveiro



## agradecimentos

Gostaria de agradecer à Professora Isabel Capela pela disponibilidade, sugestões e partilha de conhecimento que teve para comigo durante a realização deste trabalho.

Agradecer também à Androcas, à Ju, à Ritinha à Nancy, ao Paulinho, ao Celso, ao Migas, ao Vitó, à Marina e a Tishinha que sempre me apoiaram e aturaram durante este ano e claro, nos últimos 5 anos. Um especial obrigado ao Daniel que para além de ser um companheiro destas viagens fez com que todos os dias passados no laboratório fossem bem mais...divertidos. Ao Pissu que sempre enalteceu as minhas indumentárias e claro, sempre me recebeu de braços abertos. E claro, à Bé que sempre me deu calma, tranquilidade e alegria ao longo destes anos.

Agradecer ao Flávio por todas as dicas que deu para este trabalho, ao Pedro e à Cátia pela companhia nos laboratórios.

E sem dúvida que nestes agradecimentos precisava de referir duas pessoas que estiveram na base de todo este trabalho. A Tânia, que entre vaquinhas e gatinhos, suimicídios e descascas, fez com que os AOVs, Acetil-CoAs, TOCs e PHAs parecessem amigos de longa data, e não bichos de 7 cabeças. E a Fátima, que mesmo abandonando a bancada do lab. 52 toda desarrumada, se apressou em ajudar-me a construir a minha dissertação e as minhas ideias, e a ensinar tudo sobre o mundo inexplicável... dos bioplásticos. A vocês vos devo este trabalho. Muito Obrigado!

Para terminar, não podia deixar de agradecer à minha família, ao meu irmão, aos meus pais e à minha tia. Foram vocês que me abriram todas as portas que me trouxeram até aqui. Obrigado!





## palavras-chave

Polihidroxialcanoato (PHA), reator batch sequencial (SBR), alimentação dinâmica aeróbia (ADF), ácidos orgânicos voláteis (AOV's), rácio Carbono/Azoto (C/N)

## resumo

A depleção das reservas de petróleo associada às limitações ambientais dos plásticos provenientes de fontes não renováveis levou a comunidade científica a procurar alternativas ambientalmente mais favoráveis.

Os polihidroxialcanoatos (PHAs) são polímeros produzidos por microrganismos e completamente biodegradáveis. Com propriedades semelhantes aos poliésteres sintéticos, os PHAs surgem no contexto como uma das alternativas mais promissoras aos plásticos ditos convencionais. No entanto a produção destes biopolímeros a nível industrial ainda não é economicamente competitiva face aos baixos custos de produção de polímeros sintéticos, já que é necessário o uso de culturas puras e substratos dispendiosos.

A produção de PHAs através de culturas mistas e efluentes industriais é uma solução que vem reduzir os custos comparativamente à produção de PHAs através de culturas puras e permite igualmente a valorização de resíduo indesejado. Contudo é necessário haver uma etapa de acidificação do substrato com vista à produção de ácidos orgânicos voláteis (AOVs) e uma seleção de culturas

Neste trabalho foi desenvolvido um sistema de produção de PHAs utilizando como substrato soro de queijo acidificado e lamas ativadas provenientes de uma ETAR urbana e uma ETEI, com especial incidência no processo de enriquecimento da cultura mista em reatores descontínuos sequenciais (SBRs). Diferentes condições foram aplicadas aos reatores SBRs, variando a carga orgânica (1,4-3 gCQO/L.d), rácio de carbono/azoto (C/N) (14/5) presente no meio e o teor de AOVs no substrato (40-88% em base CQO). Após o processo de seleção foram realizados ensaios em batch para acumulação de polímero, testando o efeito do aumento da carga orgânica, o controlo do pH e a precipitação das proteínas do soro acidificado.

As condições testadas em SBRs permitiram o enriquecimento das lamas ativadas em organismos produtores de PHA. Em ensaios batch obteve-se uma taxa máxima de acumulação de PHA de 54% (molPHA/molSSV) o que se traduziu numa produção de 45,79 CmmolPHA/L. O controlo de pH para 9 na fase de acumulação conduziu a um aumento no rendimento de conversão de AOVs a PHA (0,84 CmolPHA/CmolAOVs).

Foi demonstrado que o soro de queijo é uma fonte de carbono viável para a produção de AOVs com vista à produção de PHAs.

**keywords**

Polyhydroxyalkanoate (PHA), sequential batch reactor (SBR), dynamic aerobic feeding (ADF), organic fatty acids (AOVs), Carbon / Nitrogen rate (C/N).

**abstract**

The depletion of oil reserves associated to the non-biodegradability of oil-based plastics has led scientific community to seek new alternatives more environmental-friendly.

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are a group of full biodegradable polymers produced by several microorganisms as a carbon source. With similar properties to synthetic polyesters, PHAs are promising alternatives to conventional plastics, although the production of these biopolymers at industrial level is not yet economically competitive with the low production costs of synthetic polymers, since it is necessary to use pure cultures and expensive substrates.

PHA production using mixed cultures and low cost substrates as industrial wastewaters is a solution that has lower costs compared to the production of PHAs using pure cultures, and also allows the recovery of unwanted residue. However, it is necessary to have a step of acidification of the substrate in order to produce volatile fatty acids (AOVs) and an enrichment of the mixed cultures in PHA producing microorganisms.

In this study it was developed an enrichment of mixed cultures step and an accumulation step in order to produce PHA using fermented cheese whey as substrate and active sludge from a wastewater treatment plant, with special focus on the selection of mixed cultures using sequential batch reactors (SBR). Different conditions were applied to the SBRs, varying the organic load rate (1,3-3 gCQO/L.d), Carbon/Nitrogen rate (14-5) and the content of AOVs in the substrate (30-70%). Batch tests were also carried to test PHA accumulation of the culture.

The conditions tested allowed enriching the mixed cultures with microorganism's producers of PHA. The cultures were able to accumulate a maximum of 54% (molPHA/molX) in batch tests which corresponded to a maximum production of 45,79 CmmolPHA/L. The batch test carried under pH of 9 showed an increase of the yield of PHA production (0,84 CmolPHA/CmolAOVs).

It was demonstrated that cheese whey is a reliable carbon source for the production of AOVs to produce PHAs

## Índice

Índice .....	i
Índice de Figuras .....	iv
Índice de Tabelas.....	vi
Abreviaturas .....	vii
1. Introdução .....	1
1.1. A mudança de paradigma do tratamento de Efluentes .....	1
1.2. Plásticos e o consumo dos combustíveis fósseis .....	1
1.3. A resposta às duas problemáticas.....	2
1.4. Objetivos .....	4
2. Revisão Bibliográfica .....	5
2.1. Conceitos de Biotecnologia .....	5
2.1.1. Polímeros, poliésteres e termoplásticos .....	5
2.1.2. Biopolímeros e Bioplásticos.....	5
2.2. Polihidroxialcanoatos.....	9
2.2.1. Estrutura dos PHAs .....	10
2.2.2. PHB .....	11
2.2.3. Copolímero P(3HB-co-3HV) .....	12
2.2.4. História e Produção Industrial de PHAs .....	13
2.2.5. Aplicações dos PHAs.....	16
2.3. Síntese de PHA .....	17
2.3.1. Por culturas mistas .....	17
2.3.2. Determinação e caracterização do PHA.....	19
2.3.3. Extração de PHA.....	19
2.4. Produção de PHA por culturas mistas .....	20

2.4.1.	Culturas Mistas .....	20
2.4.2.	Estratégias.....	21
2.5.	Método de Produção em 3 Fases utilizando ADF .....	24
2.5.1.	1ª Etapa - Fermentação Acidogénica .....	24
2.5.2.	2ª Etapa - Enriquecimento de Culturas Mistas pelo método (F/F).....	26
2.5.3.	3ª Etapa - Acumulação de PHA em reatores Batch.....	31
3.	Materiais e Métodos.....	35
3.1.	Instalação experimental .....	35
3.2.	Reator Descontínuo Sequencial.....	36
3.3.	Alimentação dos SBR.....	36
3.4.	Parâmetros analisados.....	37
3.5.	Ensaio Batch.....	38
3.6.	Métodos Analíticos.....	39
3.6.1.	Carência Química de Oxigénio, Sólidos Suspensos Totais e Voláteis .....	39
3.6.2.	Medição de oxigénio e pH .....	39
3.6.3.	Carbono orgânico total e azoto total .....	39
3.6.4.	Ácidos Orgânicos Voláteis .....	39
3.6.5.	Polihidroxicarboxilatos.....	40
3.6.6.	Precipitação e determinação das proteínas para o batch 5 .....	40
3.6.7.	Coloração para a visualização de PHA .....	40
3.7.	Cálculos de teores e balanços Materiais.....	41
4.	Resultados e Discussão .....	43
4.1.	Enriquecimento da Cultura Mista de Microrganismos .....	43
4.1.1.	Caracterização da Alimentação .....	46
4.1.2.	Condições de Fome/Fartura .....	47
4.1.3.	Efeito do teor e composição de AOVs na alimentação .....	51

4.1.4.	Efeito da carga orgânica.....	53
4.1.5.	Efeito do rácio C/N .....	56
4.1.6.	Observação da cultura mista enriquecida ao microscópio ótico (com coloração de azul de Nilo) .....	59
4.2.	Ensaio Batch de Acumulação de Polímero.....	60
4.2.1.	Teor e composição de AOVs na alimentação.....	62
4.2.2.	Efeito da carga orgânica.....	65
4.2.3.	Efeito do controlo de pH.....	66
4.2.4.	Ensaio de precipitação de proteínas.....	67
5.	Conclusões.....	71
5.1.	Perspetivas Futuras .....	73
6.	Bibliografia .....	75

## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> Categorias mais comuns de produção de biopolímeros (Babu <i>et al.</i> , 2013).....	7
<b>Figura 2</b> Biodegradabilidade dos bioplásticos (adaptado de (Chanprateep <i>et al.</i> , 2010).....	7
<b>Figura 3</b> Estrutura base dos polihidroxicanoatos (adaptado de Albuquerque <i>et al.</i> , (2009)). .....	11
<b>Figura 4</b> Representação esquemáticas do metabolismo de produção de PHB e PHV por culturas mistas em condições aeróbias. Adaptado de (Pardelha <i>et al.</i> , 2012) .....	18
<b>Figura 5</b> Esquema do processo concetual de PHA em 3 Etapas, utilizando CM (adaptado de Morgan-Sagastume <i>et al.</i> , (2011).....	24
<b>Figura 6</b> Esquema de funcionamento de um reator SBR (PekaSys, 2012) .....	26
<b>Figura 7</b> Instalação experimental do Sistema de produção de PHAs. A 1ª etapa (tracejado) não foi analisada neste trabalho experimental .....	35
<b>Figura 8</b> Carga orgânica aplicada e resultados gerais dos SBRs 1 e 2 a), 3 b), 4 c) e 5 d) .....	44
<b>Figura 9</b> Composição da alimentação em AOVs em cada condição (como CQO (a) e em percentagem relativa (b)).....	46
<b>Figura 10</b> Análise dos Ciclos SBR1 a), SBR2 b), SBR 3 c), SBR 4 d) e SBR 5 e) .....	48
<b>Figura 11</b> Correspondência do teor de AOVs com o armazenamento de PHA e composição de polímero .....	51
<b>Figura 12</b> Evolução do SBR 1 e SBR 2 ao longo dos dias. À esquerda da linha a tracejado o SBR operou a um ORL de 1,7 gCQO/L/d (condição 1) e à direita a um ORL de 3,0 gCQO/L/d (condição 2) .....	53
<b>Figura 13</b> Comparação da duração da fase de fartura para os SBR 1 e 2. As fases de fartura correspondem ao período de tempo até à linha tracejada .....	54
<b>Figura 14</b> Comparação da duração da fase de fartura para os SBR 1, 3, 4 e 5 .....	55
<b>Figura 15</b> TOC e TN ao longo de um ciclo nas condições 3, 4 e 5 (a, b e c respetivamente). A linha a tracejado indica o final da fase de fartura .....	57

<b>Figura 16</b> Observação da cultura enriquecida em campo claro e com coloração azul de Nilo .....	59
<b>Figura 17</b> Perfis de TOC, TN, AOVs e %PHA para os batch 1, 2, 3, 4 e 5 (B1, B2, B3, B4 E B5 respetivamente) .....	61
<b>Figura 18</b> Consumo específica do de AOVs ao longo dos 5 ensaios batch e moles de carbono do copolímero produzidos .....	63
<b>Figura 19</b> Comparação dos batch 2 e 3 para da análise da influência do aumento do ORL .....	65
<b>Figura 20</b> Teor de Proteínas antes e depois da precipitação.....	67
<b>Figura 21</b> Comparação dos perfis de TOC, TN, AOVs e %OD do batch 2 com proteínas (ORL:1,5 gCQO/L e 77%AOVsin) com batch 5 sem proteínas (ORL: 1,5 gCQO/L e 88% AOVs in) .....	68

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1</b> Principais famílias de Bioplásticos (adaptado de Crank <i>et al.</i> (2004); Albuquerque (2009)).....	6
<b>Tabela 2</b> Melhoramento sustentável dos bioplásticos em relação aos plásticos derivados de petróleo (PBP) (Álvarez-Chávez <i>et al.</i> , 2012).....	8
<b>Tabela 3</b> Nomenclatura dos polihidroxicanoatos (Albuquerque <i>et al.</i> , 2009)	11
<b>Tabela 4</b> Produção industrial de PHAs a nível mundial e suas aplicações (adaptado de Chen (2009) .....	14
<b>Tabela 5</b> Espécies vulgarmente utilizadas na produção industrial de PHA (adaptado de Chen (2009)).....	15
<b>Tabela 6</b> Condições aplicadas a reatores SBR (Dionisi <i>et al.</i> , 2006; Villano <i>et al.</i> , 2010).....	29
<b>Tabela 7</b> Concentrações de micronutrientes adicionados a alimentação .....	37
<b>Tabela 8</b> Condições de operação nos SBR.....	38
<b>Tabela 9</b> Condições aplicadas aos ensaios Batch .....	38
<b>Tabela 10</b> Condições aplicadas e resultados gerais dos 5 SBRs .....	43
<b>Tabela 11</b> Taxas de consumo de TOC e TN para as condições 3, 4 e 5 .....	50
<b>Tabela 12</b> Resultados Gerais dos 5 ensaios Batch .....	60
<b>Tabela 13</b> Produção do copolímero PHB-HV e respetivas frações molares.....	64



## Abreviaturas

- ETAR – Estação de Tratamento de Águas Residuais
- ETEI – Estação de Tratamento de Efluentes Industriais
- PHA - Polihidroxicanoato
- CM – Cultura Mista de Microrganismos
- ADF – Alimentação Dinâmica Aeróbia
- AOVs – Ácidos Orgânicos Voláteis
- F/F – Método Fome/Fartura
- PLA – Ácido Polilático
- PBS - Polibutileno Succinato
- PE - Polietileno (PE)
- PTT - Politrimetileno Tereftalato
- PUR – Poliuretano
- scl-HÁ – Hidroxicanoatos de cadeia curta
- mcl-HÁ – Hidroxicanoatos de cadeia média
- PHB - Polihidroxibutirato
- PHV - Polihidroxivalerato
- PHB-VH – Polihidroxibutirato-co-Valerato
- PHO - Polihidroxiocanoato
- PHN - Polihidroxinonanoato
- OAPs – Organismos acumuladores de polifosfato
- OAGs - Organismos acumuladores de glicogénio
- ORL – carga orgânica
- TRS – Tempo de retenção de sólidos
- TRH – Tempo de retenção hidráulico
- CSTR – Reator contínuo perfeitamente agitado
- MBBR - Reator biológico de leito móvel
- SBR – Reator descontínuo sequencial
- C/N - Rácio de Carbono/Azoto
- OD - Oxigénio Dissolvido
- TOC – Carbono Orgânico Total Solúvel

- TN – Azoto Total
- X – Biomassa ativa
- %PHA –  $\text{CmmolPHA/CmmolSSV}$
- $y_{\text{PHA}}$  –  $\text{CmmolPHA/CmmolAVOs}$
- CoA – Coenzima A

## **1. Introdução**

### **1.1. A mudança de paradigma do tratamento de Efluentes**

Um dos bens essenciais ao ser humano é a água e este elemento está presente em numerosas funções e atividades, servindo tanto para consumo, auxílio de transporte de materiais e limpeza dos meios. Depois de ser usada nas mais diversas atividades, tanto pessoais como industriais, torna-se inapropriada para uma nova reutilização e transforma-se num resíduo indesejado, muitas vezes prejudicial para o meio ambiente. Este resíduo, nos países desenvolvidos, é normalmente encaminhado para estações de tratamento de águas residuais ou industriais (ETAR ou ETEI respetivamente) que o reabilitam de forma a ser aceite no meio recetor. No entanto, a quantidade de material potencialmente valorizável que estes efluentes transportam é significativa. Desta forma a gestão dos efluentes de águas residuais e industriais deve ser assente na valorização dos materiais como uma nova matéria-prima e não como um resíduo. Esta mudança de paradigma que só recentemente se tem posto em prática permite então modificar a economia associada ao tratamento de resíduos, e no caso particular ao tratamento de efluentes líquidos.

### **1.2. Plásticos e o consumo dos combustíveis fósseis**

A humanidade, desde a revolução industrial no final do século XVIII sofreu um crescimento colossal em todos os parâmetros sociais e económicos. O quotidiano e os hábitos das pessoas, sobretudo no mundo ocidental sofreram uma enorme transformação, especialmente com a descoberta dos combustíveis fósseis e a invenção da máquina a vapor.

Com a evolução dos processos, não tardou a que no século XIX, a descoberta de métodos de extração de petróleo conduzissem a um novo salto na evolução da sociedade mundial. Passados pouco mais de 150 anos, o petróleo é o recurso natural mais explorado pelo ser humano e serve de base para uma grande quantidade de produtos, desde combustíveis, asfalto, fibras sintéticas, plásticos, entre outros.

Os plásticos derivados do petróleo são utilizados nas mais variadas indústrias, desde a indústria automóvel às embalagens alimentares, tendo o consumo deste material crescido a uma taxa maior do que qualquer outro grupo de materiais. No

entanto, esta tendência poderá reverter-se num futuro próximo, devido à depleção das reservas de petróleo e conseqüente aumento do preço deste recurso. Espera-se que o mercado de plásticos abrande a partir de 2020, dependendo no entanto do aparecimento de novas fontes de carbono alternativas (Crank *et al.*, 2004)

Outro problema associado a este tipo de plástico é o seu longo tempo de vida. Os plásticos sintéticos, quando descartados no ambiente, podem persistir durante várias décadas, causam um impacto ambiental grave devido à sua difícil biodegradação. Nos países desenvolvidos, muitos bens à base de plástico acabam por ser rejeitados como resíduos indiferenciados em aterros sanitários. No entanto a acumulação destes bem chega a atingir 20% do volume total de aterros (Stein, 1992). Este efeito, embora solucione o problema ambiental gerado pelos plásticos no meio ambiente, pode conduzir a uma crise de sobrelotação de aterros (Braunegg *et al.*, 1998)

### **1.3. A resposta às duas problemáticas**

Nos últimos anos, e para responder às desvantagens associados aos plásticos convencionais, a comunidade científica têm vindo a aplicar esforços no desenvolvimento de uma solução ambiental e economicamente sustentável. A utilização de fontes renováveis como, organismos marinhos, produtos vegetais, resíduos biológicos naturais, subprodutos industriais e alimentares surgem como fonte de carbono para novos biomateriais, nomeadamente os bioplásticos (Álvarez-Chávez *et al.*, 2012).

Dentro dos bioplásticos encontram-se os polihidroxalcanoatos (PHA). O PHA é um grupo de poliésteres produzido de forma intracelular a partir de matéria orgânica por uma grande variedade de microrganismos como reserva de energia e carbono. Tem um elevado potencial para substituir alguns dos polímeros derivados do petróleo, como o caso dos poliésteres (as propriedades elastoméricas e termoplásticas são semelhantes) (Albuquerque, 2009). Para além disso, são facilmente biodegradáveis no ambiente já que muitos microrganismos no solo produzem enzimas capazes de hidrolisar estes polímeros em monómeros solúveis em água (Chanprateep, 2010).

Esta capacidade natural tem sido explorada pela indústria química na tentativa de produzir o biopolímero a uma escala industrial. Este feito foi já atingido utilizando culturas puras de microrganismos. No entanto este método ainda não demonstrou ter

capacidade para concorrer com os plásticos tradicionais devido aos elevados custos de produção, sobretudo na utilização de culturas puras (Dionisi *et al.*, 2004). Deste modo, a comunidade científica tem virado os seus esforços para encontrar métodos de produção de PHA alternativos, a partir de substratos de baixo custo e sobretudo utilizando culturas mistas de microrganismos (CM). Associada à tentativa de encarar os efluentes industriais e águas residuais como um recurso capaz de ser valorizado, tem-se encontrado nestas fontes de carbono de elevada carga orgânica uma alternativa viável aos substratos puros vulgarmente utilizados para a produção de PHAs (glucose e sacarose) (Chen, 2009).

Dos métodos estudados pela comunidade científica nos últimos anos destaca-se a produção de PHAs através de uma seleção de culturas mistas por alimentação aeróbia dinâmica (ADF). Este processo pode ser descrito essencialmente em três etapas fundamentais. A primeira consiste na transformação do efluente de baixo custo num substrato com características que permitam a acumulação de polímero. Como as culturas mistas armazenam, por norma, o carbono sob forma de glicogénio é necessário haver uma etapa de acidificação do efluente, transformando o substrato em ácidos orgânicos voláteis (AOVs), sendo que este já permite a síntese de PHA (Albuquerque, 2009). A segunda etapa consiste no enriquecimento da cultura mista em microrganismos capazes de produzir e armazenar o PHA. Este tipo de seleção microbiológica é realizado impondo à cultura mista uma alimentação ADF que consiste na variação de períodos de presença e ausência de substrato. Este método pode também ser designado pelo método Fome-Fartura (F/F). A terceira etapa corresponde portanto à acumulação de PHA por parte da cultura enriquecida, sendo o polímero extraído posteriormente do meio intracelular.

Nesta dissertação foram testadas e estudadas algumas condições aplicadas à segunda e terceira etapas de modo a compreender e melhorar os processos de enriquecimento de culturas mistas e de acumulação de polímero, a partir um efluente de uma indústria de laticínios, o soro de queijo.

#### **1.4. Objetivos**

Para o desenvolvimento desta dissertação foram traçados os seguintes objetivos gerais:

- Desenvolvimento das duas fases finais do processo biológico para a produção de polímeros usando culturas mistas de processos de lamas ativadas alimentadas com soro de queijo acidificado
- Testar diferentes condições de operação dos reatores, carga orgânica, teor de AOVs e rácio de carbono/azoto no enriquecimento de culturas mistas em microrganismos produtores e armazenadores de PHA de modo a compreender a sua influência
- Perspetivar qual das condições aplicadas acarreta mais benefícios no processo de enriquecimento.
- Estudar os efeitos da carga orgânica, pH e presença de proteínas no substrato na fase de acumulação de polímero, bem como nas diferentes seleções de culturas

## 2. Revisão Bibliográfica

### 2.1. Conceitos de Biotecnologia

#### 2.1.1. Polímeros, poliésteres e termoplásticos

Os polímeros são moléculas de grande dimensão compostas pela repetição de várias unidades chamadas monómeros. Os monómeros presentes na cadeia podem ser o mesmo, formando um homopolímero ou variados, formando copolímeros. Sendo moléculas com uma massa muito superior às moléculas pequenas, os polímeros apresentam propriedades físicas únicas na rigidez e viscoelasticidade, tendo tendência a formar estruturas semi-cristalinas (Seidel, 2008). Em geral, os polímeros não são nem totalmente amorfos, nem totalmente cristalinos, apresentando-se num estado intermediário. Este estado intermediário é definido pelo grau de cristalinidade do polímero.

Os polímeros que contêm um grupo funcional éster na sua cadeia principal são designados por poliésteres. Neles incluem-se materiais biológicos como a cutina, presente na membrana celulósica de células de alguns órgãos vegetais e o polihidroxialcanoato (PHA) bem como materiais sintéticos provenientes de combustíveis fósseis, como o polietileno tereftalato (PET), o poliéster mais comum.

Normalmente os polímeros apresentam propriedades termoplásticas. Estes materiais, também designados por termoplásticos, apresentam uma elevada viscosidade a partir de uma certa temperatura chamada temperatura de transição, podendo ser facilmente moldados. Quando arrefecidos retomam ao estado sólido. São facilmente recicláveis já que as cadeias macromoleculares dos termoplásticos se encontram ligadas por forças de van der Waals ou por ligações de Hidrogénio que se quebram por ação do calor, fundindo-se o material e permitindo ser moldado. Os termoplásticos diferem dos termofixos exatamente por esta propriedade, já que os materiais termofixos formam ligações irreversíveis durante o tratamento do material. São exemplos o polipropileno (termoplástico) e o poliuretano (termofixos).

#### 2.1.2. Biopolímeros e Bioplásticos

Os biopolímeros são polímeros de origem biológica e englobam uma vasta gama de substâncias.

Os biopolímeros podem ser classificados em 4 grupos:

- Polímeros à base de aminoácidos (seda, elastano, colagénio)
- polissacarídeos produzidos por bactérias (celulose, dextrano, xantana)
- Polifenóis (lignina e tanina)
- Poliésteres (ácido poliático, goma-laca e polihidroxicanoatos)

Existem 3 grandes classes de biopolímeros: Polissacarídeos (hidratos de carbono de cadeia linear), polinucleotídeos (cadeias longas de polímeros compostos por 13 ou mais monómeros nucleótidos) e polipeptídeos (cadeias curtas de aminoácidos) (Elnashar, 2011). São exemplo deste tipo de polímeros as proteínas, enzimas, ADN, celulose, quitosana, entre outros, e podem ser encontrados e praticamente todo o tipo de ambientes.

Os bioplásticos são biopolímeros que englobam os materiais semelhantes aos plásticos convencionais mas que diferem no facto de serem derivados de biomassa, biodegradáveis ou ambos (Bioplastics, 2013).

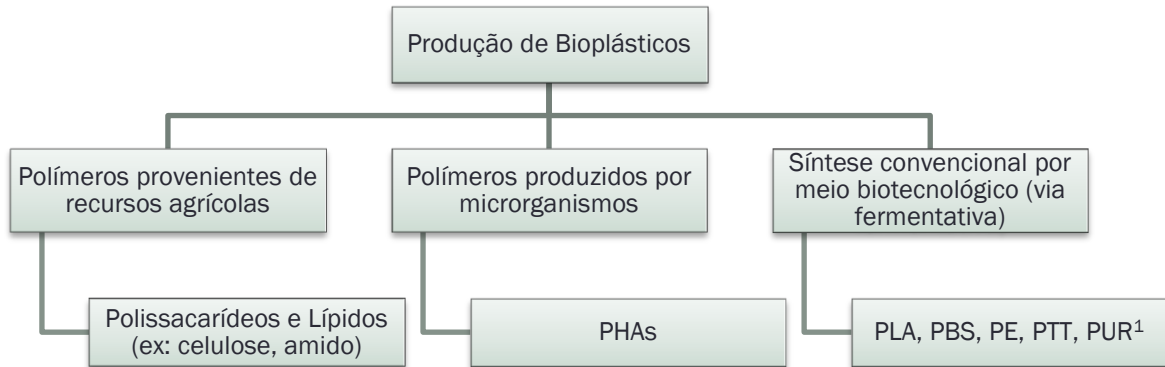
Existem 8 principais famílias de bioplásticos (tabela 1) e são essencialmente polissacarídeos ou poliésteres.

**Tabela 1** Principais famílias de Bioplásticos (adaptado de Crank *et al.* (2004); Albuquerque (2009))

Bioplástico	Tipo de Polímero	Métodos de Produção
Polímero à base de amido	Polissacarídeos	Polímero natural modificado
Polímeros derivados de celulose	Polissacarídeos	Polímero natural modificado ou celulose bacteriológica
Ácido poliático	Poliéster	Monómero de origem biológica (ácido láctico) produzido através de fermentação seguido de polimerização
Poliuretano (PUR)	Poliuretanos	Polimerização de polióis de origem biológica obtidos por fermentação ou purificação química com isocianatos petroquímicos
Politrimetileno Teraftalato (PTT)	Poliéster	1,3-propanediol produzido por fermentação seguido de copolimerização + ácido teraftálico de origem petroquímica (DMT)
Polibutileno teraftalato	Poliéster	1,4 butanediol produzido por fermentação seguido de copolimerização + DMT petroquímico
Polibutileno succinato (PBS)	Poliéster	1-4 butanodiol copolimerizado com ácido succínico, ambos produzidos por fermentação

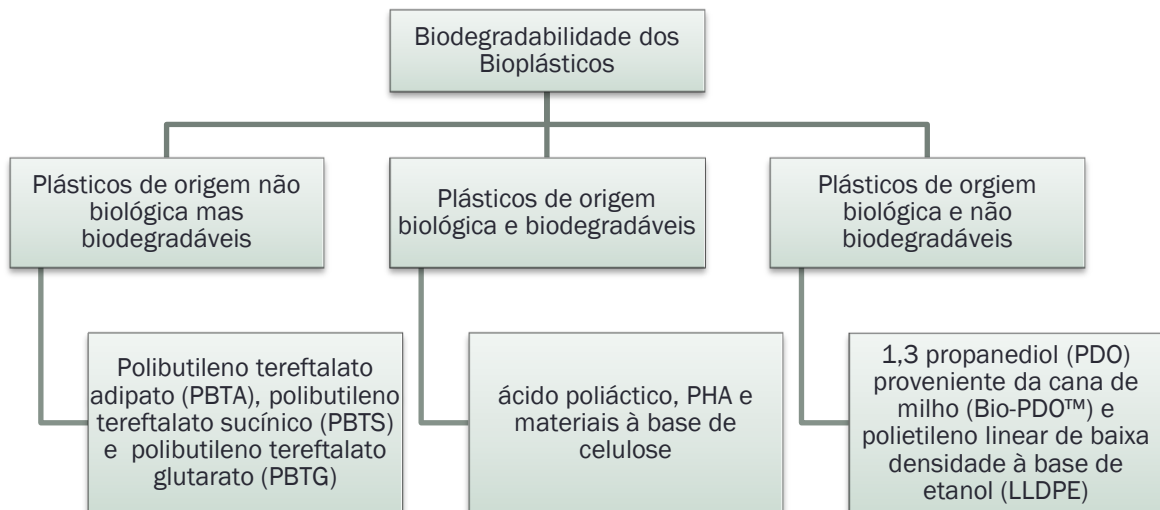


Os seus métodos de produção são variados e podem ser divididos em três tipos diferentes (figura 1).



**Figura 1** Categorias mais comuns de produção de biopolímeros (Babu *et al.*, 2013)<sup>1</sup>

Quanto à sua biodegradabilidade, os bioplásticos podem ser igualmente divididos em 3 grupos (**Figura 2**).



**Figura 2** Biodegradabilidade dos bioplásticos (adaptado de (Chanprateep *et al.*, 2010)

- <sup>1</sup> Ácido Poliáctico (PLA), Polibutileno Succinato (PBS), polietileno (PE), politrimetileno tereftalato (PTT), Poliuretano (PUR)

No conjunto das duas classificações, os PHAs os PHAs aparecem como o material ideal à substituição dos plásticos de origem petroquímica, uma vez que são sintetizados naturalmente por meios biológicos e são completamente biodegradáveis.

### ***Vantagens e Desvantagens dos Bioplásticos***

Os bioplásticos são materiais ambientalmente favoráveis em relação aos plásticos de origem petroquímica já que nas suas produções a emissão de gases de efeito-estufa é feita em quantidades significativamente menores (Tabela 2). Associado a esta vantagem, muitos dos bioplásticos são biodegradáveis, possibilitando a recuperação orgânica do material no final do ciclo de vida. Esta propriedade confere uma enorme vantagem aos plásticos tradicionais derivados de petróleo.

**Tabela 2** Melhoramento sustentável dos bioplásticos em relação aos plásticos derivados de petróleo (PBP) (Álvarez-Chávez *et al.*, 2012)

<b>Bioplástico</b>	<b>Melhoramento Sustentável</b>
<b>Polihidroxicanoatos</b>	Elevada biodegradabilidade. Semelhante ao polipropileno (PP)
<b>Ácido polilático</b>	A produção de ácido poliático poupa 30-50% de energia fóssil e emite menos 50-70% de CO <sub>2</sub> do que PBP (petróleo based plástico). É reciclável e permite a sua compostagem acima dos 60°C. Semelhante ao Politereftalato de etileno (PET). Aplicações na medicina estética
<b>Amido termoplástico (TPS)</b>	A sua produção requer um terço da energia despendida na produção do PBP equivalente. Menores emissões que PBP, Biodegradável e compostável.
<b>Bio-uretanos (BURs)</b>	Requer menos 23% de energia comparado com PBP
<b>Celulose e Lignina</b>	Compostáveis
<b>PTT</b>	A produção necessita menos 26-50% do que plásticos convencionais e emite menos 44% de gases de efeito estufa. Biodegradável e potencialmente reciclável.
<b>Proteínas de soja e milho</b>	Biodegradáveis e compostáveis

As principais desvantagens dos bioplásticos são geralmente os preços associados à produção destes materiais e à dificuldade em criar, gerir e explorar a matéria-prima, comparativamente com os plásticos ditos convencionais, provenientes dos combustíveis fósseis.

### ***Posição dos Bioplásticos no Mercado Mundial***

Os bioplásticos ocupam atualmente uma pequeníssima fatia do mercado mundial de comércio de plástico, cerca de 1% (EuropaBioplastics, 2011). No entanto, com o aumento dos preços do petróleo existe um espaço cada vez maior para os bioplásticos neste segmento industrial. O preço dos plásticos derivados de petróleo aumentou cerca de 50-80% em 2012, e prevê-se que a tendência se mantenha nos próximos anos (The Plastics Exchange LLC, 2010).

A produção de bioplásticos é maioritariamente realizada em produções de pequena dimensão (cerca de 1000 a 20.000 toneladas por ano), e perdem em economia de escala para apenas uma unidade de produção de polietileno com capacidade de 300.000 toneladas por ano. Atualmente a maior empresa produtora de biopolímeros do mundo é a norte americana Metabolix Inc e a maior produtora de ácido láctico a NatureWorks LLC, também norte americana, com capacidade de produção de 140.000 toneladas por ano (Chanprateep, 2010).

Os bioplásticos disponíveis no mercado mundial são o PLA, PHA e polímeros à base de amido. O PLA e o PHA têm recebido muita atenção devido ao seu enorme potencial em substituir os plásticos convencionais, por apresentarem características muito semelhantes a estes.

### ***Incentivo ao uso de bioplásticos biodegradáveis***

Alguns membros da União Europeia já estabeleceram políticas para a redução do uso de plásticos derivados do petróleo. A Bélgica implementou uma eco-taxa de 3€ por quilograma em embalagens do tipo de sacos de supermercado. A Holanda implementou também uma taxa baseada nas emissões de CO<sub>2</sub> libertadas na produção de materiais de embalagem e no próprio conteúdo em carbono (Álvarez-Chávez *et al.*, 2012). França, Itália e Espanha consideram avançar com a mesma legislação.

## **2.2. Polihidroxicanoatos**

Os PHAs são um grupo de poliésteres completamente biodegradáveis com propriedades termoplásticas e elastoméricas semelhantes a alguns polímeros derivados de combustíveis fósseis como o polipropileno e o polietileno. São produzidos por uma vasta gama de microrganismos como fonte de carbono e reserva

de energia. Já foram identificados cerca de 300 espécies capazes de produzir este polímero (Albuquerque, 2009).

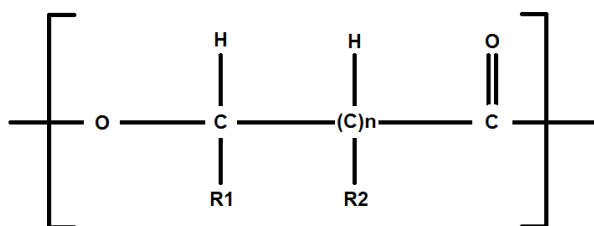
Os PHAs podem ser degradados num curto período de tempo, entre 3 a 9 meses, por diversos microrganismos, convertendo-os em dióxido de carbono e água através de enzimas próprias. Podem ser produzidos a partir de fontes renováveis e são considerados materiais naturais (Suriyamongkol *et al.*, 2007).

São considerados os melhores candidatos para substituir os atuais plásticos derivados do petróleo devido à sua durabilidade, vasta aplicabilidade e variadas propriedades, existindo mais de 100 diferentes monómeros de PHA (Chen, 2009). Estes podem ser divididos em 2 classes, os hidroxialcanoatos de cadeia curta (scl-HA, monómeros de 3 a 5 carbonos) e os hidroxialcanoatos de cadeia média (mcl-HA, monómeros de 6 a 14 carbonos) (Elnashar, 2011). Fazem parte dos scl-HAs o polihidroxibutirato PHB, o polihidroxivalerato PHV e o copolímero poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (PHB-HV). Alguns membros dos mcl-HAs são o polihidroxiocetanoato (PHO) e o polihidroxinonanoato (PHN) O número de monómeros numa cadeia de polímero varia entre 100 a 30.000 unidades (Lee, 1996).

As propriedades dos PHAs dependem do(s) monómero(s) que o constitui, da organização na cadeia do polímero e na variedade de monómeros existentes na própria cadeia. Genericamente são substâncias lipofílicas, e dentro da célula encontram-se como inclusões insolúveis (Sudesh *et al.*, 2000). A sua cristalinidade pode variar entre 40-80% (Sudesh *et al.*, 2000). Os monómeros de PHAs podem ser combinados em diferentes copolímeros que permitem melhorar as propriedades desejadas para diversas aplicações. Variando o comprimento da cadeia as propriedades do polímero também são alteradas, incluindo o grau de cristalinidade e o ponto de fusão (Albuquerque, 2009). Quando maior o grau de cristalinidade, maior é a organização das cadeias de polímero. O conhecimento do grau de cristalinidade de um polímero é importante, pois facilita na seleção do material a ser usado em diferentes aplicações.

### 2.2.1. Estrutura dos PHAs

A estrutura dos monómeros de PHAs é representada por uma cadeia carboxílica principal (Figura 3).



**Figura 3** Estrutura base dos polihidroxicanoatos (adaptado de Albuquerque *et al.*, (2009)).

Nesta cadeia, diferentes grupos substituintes são introduzidos (R1 e R2) constituindo os diferentes monómeros (Tabela 3).

**Tabela 3** Nomenclatura dos polihidroxicanoatos (Albuquerque *et al.*, 2009)

		R1	R2	Abreviatura	Nome
<b>Poli(3-hidroxicanoatos)</b>	Cadeia Curta (C3-C5)	H	H	P(3HP)	Poli(3-hidroxiopropionato)
		CH <sub>3</sub>	H	P(3HB)	Poli(3-hidroxi-2-metilbutirato)
		CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	H	P(3HV)	Poli(3-hidroxi-2-metilvalerato)
	Cadeia Média (C6-C14)	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	P(3H2MB)	Poli(3-hidroxi-2-metilbutirato)
		CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	P(3H2MV)	Poli(3-hidroxi-2-metilvalerato)
		(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	H	P(3HHx)	Poli(3-hidroxi-hexanoato)
<b>Poli(4-hidroxicanoatos)</b>		H	H	P(4HB)	Poli(4-hidroxi-2-metilbutirato)

Destes, apenas o homopolímero PHB, o copolímero 3-hidroxi-2-metilbutirato (HB) e 3-hidroxi-2-metilvalerato (HV) e o copolímero HB 3-hidroxi-2-metilvalerato (HHx) foram produzidos industrialmente (Dias *et al.*, 2006).

### 2.2.2. PHB

O polihidroxi-2-metilbutirato (PHB) é o poliéster mais simples e mais bem conhecido dos PHAs.

O ponto de fusão dos bioplásticos derivados deste polímero é de 160°C. É bastante rígido e quebradiço, o que em alguns casos limita as suas aplicações. Consegue alongar cerca de 2-5% até ao ponto de rutura enquanto o polipropileno tem uma capacidade de alongamento maior (10-12%) (Harper, 2000). No entanto outras propriedades como o módulo de elasticidade e a resistência à tração são próximas ao polipropileno. O PHB também tem uma pequena tendência a deformar-se e encolher

com o tempo. É insolúvel em água e é significativamente resistente à degradação hidrolítica, o que diferencia este biopolímero dos restantes, que normalmente são solúveis em água ou sensíveis à humidade (Lee, 1996). O PHB apresenta também uma elevada cristalinidade o que o torna extremamente resistente a solventes. É um bom resistente a óleos e gorduras, mas limitado na resistência a ácidos e bases fortes. É também resistente a radiação ultravioleta. A sua permeabilidade ao oxigénio é extremamente reduzida, cerca de 2 vezes menor do que o PET e 40 vezes que o PE, o que o torna apropriado para o embalamento de materiais oxidáveis. A permeabilidade ao vapor de água também é reduzida quando comparada a outros biopolímeros, no entanto é superior à maioria dos poliésteres sintéticos. Outra vantagem do PHB é de não ser tóxico, o que permite aplicações deste polímero em produtos para cosmética, dispositivos biomédicos, alimentação, entre outros (Albuquerque, 2009)

### 2.2.3. Copolímero P(3HB-co-3HV)

O Co polímero P(3HB-co-3HV) trata-se de uma cadeia polimérica onde os monómeros HB e HV se encontram distribuídos aleatoriamente. Este copolímero apresenta um cristalinidade inferior ao PHB e um melhoramento das propriedades mecânicas. É menos rígido e quebradiço e a sua flexibilidade é maior, o que permite maiores alongamentos antes de partir. A resistência à tração e durabilidade são melhores comparativamente ao homopolímero, isto sem diminuir a sua biodegradabilidade.

Devido ao seu isodimorfismo, o ponto de fusão e o ponto de transição vítrea diminuem com o aumento a fração de HV no polímero. Para cadeias com mais 30% de monómero HV na cadeia polimérica os pontos de fusão e transição vítrea aumentam (Feng *et al.*, 2002). Já que a temperatura a que ocorre a degradação e decomposição do PHA não depende da composição monomérica, quanto menor for a temperatura de fusão do copolímero menor será a temperatura do processamento do PHA, reduzindo perdas de massa molecular. Estes copolímeros apresentam também uma viscosidade de fusão mais elevada, que é uma propriedade desejável para a extrusão de sopro (Albuquerque, 2009).

#### 2.2.4. História e Produção Industrial de PHAs

A descoberta de PHAs em bactérias foi realizada pela primeira vez por Lemoigne em 1926, quando este observou em *Bacillus megaterium* a produção de um polímero intracelular constituído por monómeros de hidroxibutirato, mais tarde chamado polihidroxibutirato (Prieto, 2007).

A produção de PHAs remonta do ano de 1959 quando W. R. Grace and Company iniciou a produção de PHB nos Estados Unidos para fins comerciais. No entanto, a empresa encerrou a produção devido a problemas de purificação e eficiência na extração do polímero. Em 1970 a Imperial Chemical Industries Ltd iniciou o processo de produção de PHBV que mais tarde passou para as mãos da Metabolix Inc. Em 2008 esta empresa anunciou a produção combinada de PHA e energia de biomassa. Em 2010 a empresa japonesa Kaneka anunciou a produção de um tipo de PHBH, com um volume de produção 1000 toneladas por ano. A alemã Biomer Inc produz também PHB em uma escala comercial para aplicações médicas (Chanprateep, 2010).

No Brasil a PHA Industrial S.A., numa *joint venture* com um produtor de açúcar e um produtor de álcool iniciou a produção de PHB usando cana-de-açúcar, a uma escala piloto de 50 toneladas por ano. No entanto a intenção é de ampliar a capacidade para as 3000 toneladas/ano (Chen, 2009).

Na Tabela 4 são compiladas algumas empresas produtoras de PHAs.

**Tabela 4** Produção industrial de PHAs a nível mundial e suas aplicações (adaptado de Chen (2009))

Empresa	Tipo de PHA	Escala de Produção (tons/ano)	Período	Aplicações
ICI, RU	PHBV	300	1980s até ao 1990s	Embalagens
btF, Áustria	PHB	20-100	1990s	Aplicações Médicas
Shandong Lukang, China	Diversos PHA	Escala Piloto	2005 - presente	Matérias-primas e aplicações médicas
Biomers, Germany	PHB	100-300	1990s - presente	Aplicações Médicas
BASF, Alemanha	PHB, PHBV	Escala Piloto	1980s - 2005	Mistura com Ecoflex
Metabolix, EUA	Diversos PHA	Desconhecido	1980s - presente	Embalagens
Tepha, EUA	Diversos PHA	Desconhecido	1990s - presente	Bio-Implantes Médicos
ADM, EUA (with Metabolix)	Diversos PHA	50 000	2005 - presente	Matérias-primas
P&G, EUA	Diversos PHA	Desconhecido	1980s - 2005	Embalagens
Kaneka, Japão (with P&G)	Diversos PHA	Desconhecido	1990s - presente	Embalagens
Meredian, EUA	Diversos PHA	10 000	2007 - presente	Matérias-primas
Mitsubishi, Japão	PHB	10	1990s	Embalagens
Biocycles, Brasil	PHB	100	1990s - presente	Matérias-primas
Zhejiang Tian An, China	PHBV	2000	1990s - presente	Matérias-primas
Shanaté aou Lianyi Biotech, China	Diversos PHA	Escala Piloto	1990s - 2005	Embalagens e aplicações médicas
Jiang Su Nan Tian, China	PHB	Escala Piloto	1990s - presente	Matérias-primas
Shenzhen O'Bioer, China	Diversos PHA	Desconhecido	2004 - presente	Desconhecido
Tianjin Green Bio-Science (+DSM)	P3HB4HB	10 000	2004 - presente	Matérias-primas e Embalagens

Na produção industrial são utilizadas frequentemente bactérias geneticamente modificadas, permitindo aumentar as taxas de acumulação de polímero (tabela 5).



**Tabela 5** Espécies vulgarmente utilizadas na produção industrial de PHA (adaptado de Chen (2009))

Espécie	Manipuladas Geneticamente	Tipo de PHA e escala (tons/ano)	Substrato	Rendimento (g/L substrato)	PHA (%peso celular seco)	Empresa
<i>Ralstonia eutropha</i>	Não	PHB (10)	Glucose	>200	>80%	Tianjin North. Food, China
<i>Alkagenes latus</i>	Não	PHB (10-300)	Glucose ou Sacarose	>60	>75%	Chemie Linz, btF, Austria e Biomers, Alemanha
<i>Escherichia coli</i>	Sim	PHB (10)	Glucose	>150	>80%	Jiang Su Nan Tian, China
<i>Ralstonia eutropha</i>	Não	PHBV (300-2000)	Glucose + propionato	>160	>75%	ICI, RU
<i>Ralstonia eutropha</i>	Não	P3HB4HB (>10000)	Glucose + Butano-1,4-diol	>100	>75%	Metabolix, EUA
<i>Ralstonia eutropha</i>	Sim	PHBHHx 1	Ácidos Orgânicos	>100	>80%	P&G, Kaneka, Japão
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Não	PHBHHX 1	Ácido láurico	<50	<50%	P&G, Jiangmen Biotech Ctr, China
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Sim	PHBHHx (0,1)	Ácido láurico	~50	>50%	Shandong Lukang, China
<i>Pseudomonas putida</i>	Não	Mistura PHA (0,1)	Ácidos Orgânicos	~45	>60%	ETH, Suíça
<i>Bacillus spp.</i>	Não	PHB (5)	Sacarose	>90	>50%	Biocycles, Brasil

As bactérias chegam a acumular 80% de polímero por peso celular seco. A bactéria *Ralstonia eutropha* e espécies de *E. coli* recombinadas geneticamente são os microrganismos mais utilizados a nível industrial para a produção de PHAs. Os seus baixos requisitos e elevada velocidade de crescimento, a facilidade de operação e elevadas percentagens de polímero produzido por peso de célula seca fazem com que estas espécies continuem a ter um peso importante neste sector industrial, mesmo com a hipotética entrada de culturas mistas (Chen, 2009).

Neste estudo foi produzido o copolímero PHB-HV.

### **Produção Industrial de PHA por culturas mistas**

A produção industrial de PHAs é feita exclusivamente por culturas puras, excetuando o caso da empresa Anoxkaldnes (Lund, Suécia) que se tornou recentemente como a primeira indústria a produzir PHAs, a uma escala piloto, e

utilizando culturas mistas, como forma de tratamento de efluentes industriais (Morgan-Sagastume *et al.*, 2011).

#### 2.2.5. Aplicações dos PHAs

A diversidade de propriedades dos PHAs confere-lhes uma ampla gama de aplicações.

OS PHAs, tendo propriedades semelhantes aos termoplásticos tradicionais, e por isso podem ser processados como tais, sendo adequados para moldagem por injeção, aplicações de filme soprado, linha de extrusão e termoformagem, podendo ser processados em equipamentos convencionais usados para outros plásticos. Podem ser usados num vasto intervalo de temperaturas visto que mantém a sua forma original entre os -30° até aos 120°C (Chen, 2009). Com elevada resistência à água, humidade e calor, bem como a baixa permeabilidade ao oxigénio e ao vapor de água e baixa toxicidade, os PHA são indicados para a produção de variadíssimas embalagens, desde produtos alimentares a embalagens de produtos cosméticos. São também indicados para bens duráveis como objetos do dia-a-dia, brinquedos etc. Podem ser aplicados em materiais para uso em meios aquáticos, como as redes de pesca.

Sendo biodegradáveis os PHAs são especialmente adequados para uso em atividades agrícolas. Podem ser usados como invólucros biodegradáveis, para libertação controlada de adubos, fertilizantes, fungicidas, herbicidas e inseticidas. Podem também ser usados em sistemas de rega (Bioplastics, 2013).

Os PHAs podem ter um especial interesse no desenvolvimento de produtos descartáveis, como por exemplo produtos de higiene pessoal ou fraldas descartáveis.

Por último, através da esterificação do PHB e mclPHAs pode obter-se biodiesel (Zhang *et al.*, 2009).

#### ***PHAs em aplicações biomédicas***

Nos últimos 20 anos, os PHAs têm sido usados no desenvolvimento de aparelhos e produtos com aplicações biomédicas, nomeadamente suturas, dispositivos de reparação de tecidos articulares, rebites, tachas, grampos, parafusos, placas para correção de ossos, malhas cirúrgicas, *patches* cardiovasculares, pins

ortopédicos, entre muitos outros (Chen, 2009). Os PHAs podem também ser usados na produção de cápsulas de medicamentos, por serem biocompatíveis.

### 2.3. Síntese de PHA

A síntese de PHA é uma capacidade realizada por variadíssimas espécies microbiológicas. Já detetada em mais de 300 espécies, incluindo bactérias aeróbicas heterotróficas (de gram-negativo e gram-positivo), bactérias aeróbicas e anaeróbicas fotossintéticas e algumas *archaea* (Albuquerque, 2009). Trata-se de uma forma de armazenar carbono no meio intracelular. Normalmente é armazenado em grânulos no interior do citoplasma. Em redor destes grânulos encontram-se enzimas envolvidas na síntese e degradação do polímero.

O armazenamento de PHA ocorre quando os microrganismos estão incapacitados de crescer ao mesmo ritmo que conseguem consumir o substrato de carbono, podendo este fenómeno ser causado pela limitação de um elemento externo, tal como azoto, fósforo ou oxigénio ou por um fator interno como a limitação de produção de enzimas sintetizadoras de PHA.

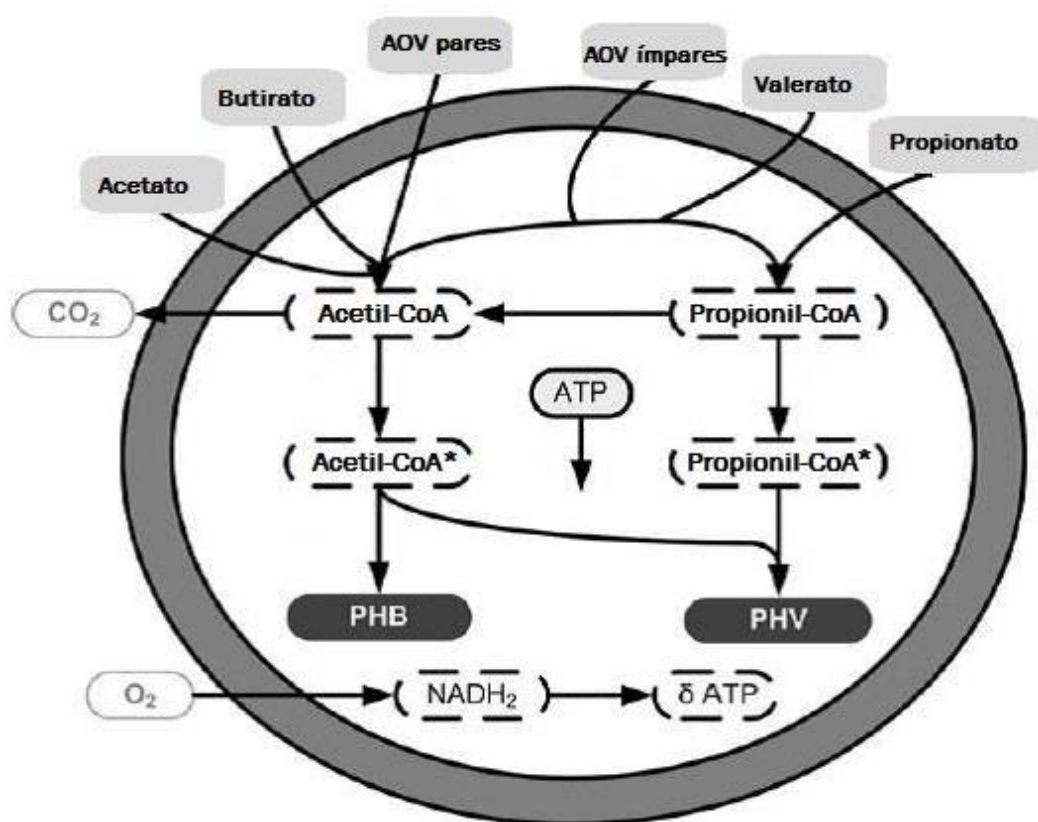
A biossíntese do PHA tem sido intensamente estudada nos últimos anos em diversas espécies de microrganismos, já que esta não se procede sempre do mesmo modo. Por exemplo na bactéria *Ralstonia eutropha*, a síntese de PHA ocorre quando não existe um nutriente de crescimento no meio. Na fase de crescimento deste organismo não é possível atingir mais que 10% de PHA por massa celular seca (Lee, 1996). Em contrapartida a bactéria *Alcaligenes latus*, consegue acumular até 50% do conteúdo celular a par do crescimento celular (Wang and Lee, 1997).

De uma forma geral o passo fundamental na produção de PHAs é a síntese do Acetil-Coenzima A (Acetil-CoA) a partir do piruvato, proveniente das vias metabólicas dos microrganismos. O Acetil-CoA trata-se de um precursor na obtenção de 3-hidroxiacil-CoA de diferentes comprimentos produzido por várias PHA sintetases (Chen, 2010). No entanto é possível produzir Acetil-CoA a partir da oxidação de ácidos orgânicos voláteis (AOVs) de diversos comprimentos.

#### 2.3.1. Por culturas mistas

Os (AOVs) de cadeia curta, como os ácidos acético e propiónico, podem ser convertidos a PHAs como visto anteriormente. Estes são transportados através da

membrana celular e depois convertidos a Acetil-CoA e/ou Propionil-CoA (Figura 4). Estes compostos servirão então de precursores aos PHAs. O Acetil-CoA é convertido em PHB enquanto o Propionil-CoA pode ser convertido a PHV (com a adição de Acetil-CoA) ou descarboxilado a Acetil-CoA e depois convertido a PHB. O mesmo processo pode ocorrer com outros ácidos de cadeia curta, como o butirato e o valerato, sendo descarboxilados a Acetil-CoA ou Propionil-CoA. Podem também ser convertidos diretamente a 3-hidrobutiril-CoA e 3-hidroxisvaleril-CoA e conseqüentemente polimerizados a PHB e PHV (Albuquerque, 2009) (Figura 4).



**Figura 4** Representação esquemática do metabolismo de produção de PHB e PHV por culturas mistas em condições aeróbias. Adaptado de (Pardelha *et al.*, 2012)

Na Figura 4 os compostos a cinzento claro correspondem aos AOVs provenientes do substrato e a tracejado os compostos intermediários e precursores do PHB e PHV. Os AOVs com um número par de carbonos na sua cadeia dão origem ao precursor Acetil-CoA e os AOVs com número ímpar de carbonos podem dar origem ao precursor Acetil-CoA e ao precursor Propionil-CoA.

### 2.3.2. Determinação e caracterização do PHA

Existem vários métodos que permitem a detecção e caracterização dos PHAs no interior das células. A técnica mais comum para detecção *in vivo* é o método de fluorescência dos grânulos (Braunegg *et al.*, 1998). Ostle and Holt (1982) estudaram o fenômeno e observou que os grânulos de PHB exibem uma fluorescência laranja quando suspensos com azul de Nilo A, permitindo a distinção do glicogênio e do polifosfato que não fluorescem. Para quantificação do conteúdo celular, estrutura e composição do PHA o método mais comum utilizado é a cromatografia gasosa após digestão em solvente orgânico. A partir da pirólise em azoto do PHA extraído, seguido de espectrometria de massa- GC e espectrometria infravermelha após extração em clorofórmio são outras técnicas usadas para quantificação de PHA. A determinação mássica molecular é normalmente executada por cromatografia de permeação em gel e a determinação das temperaturas de fusão e de transição vítrea são estimadas por calorimetria diferencial (Braunegg *et al.*, 1998).

### 2.3.3. Extração de PHA

Outro passo condicionante na produção de PHAs a nível industrial é a extração do polímero do meio intracelular. A eficiência deste processo é de extrema importância pois traduz a quantidade final do produto produzido.

Existem dois processos típicos para executar a extração do polímero intracelular, utilizando solventes orgânicos de modo a que o material celular se desintegre exceto o polímero e o uso de enzimas substituindo os solventes.

O método convencional baseia-se na solubilidade do polímero em clorofórmio e na sua insolubilidade em metanol (Kessler *et al.*, 2001). Os lípidos e outros compostos lipofílicos são removidos em metanol quente e o PHA solubilizado em clorofórmio. O PHA pode depois ser recuperado através da evaporação do clorofórmio ou por precipitação quando adicionado metanol ou etanol. A secagem das células, alteração do pH ou temperatura, como etapa anterior à extração do polímero pode facilitar a recuperação deste (Braunegg *et al.*, 1998). O processo de solubilização em clorofórmio permite a obtenção do polímero com um elevado grau de pureza, no entanto é gasto uma grande quantidade de solvente poluente, não sendo portanto indicado para o uso a uma escala industrial.

Outro processo envolvendo solventes refere-se ao uso de soluções alcalinas de hipoclorito de sódio para a digestão do material celular excetuando o PHA. Os grânulos de polímero podem depois ser separados da fase aquosa por centrifugação. Este método foi desenvolvido por Williamson and Wilkinson (1958). O método é menos eficiente ao primeiro, já que os grânulos de polímero são significativamente afetados, resultando numa perda de massa de polímero. Contudo otimizando alguns parâmetros, nomeadamente pH, temperatura e o rácio da fase da biomassa/aquosa é possível aumentar a eficiência do processo resultando numa maior massa e pureza do polímero final (Braunegg *et al.*, 1998).

O segundo protocolo surge na tentativa de corrigir este problema, evitando o uso de solventes orgânicos. As bactérias são tratadas com um conjunto de enzimas, nomeadamente proteases, nucleases e lisozimas, e detergentes, removendo proteínas, ácidos nucleicos e outros compostos celulares, deixando o polímero intacto (Byrom, 1987; Suriyamongkol *et al.*, 2007).

Holmes *et al.* (1984) descreveu o processo enzimático usado pela Zeneca Inc. para a recuperação do P(3HB) e P(3HB-*co*-3HV). Primeiro o meio é sujeito a altas temperaturas (100-150°C) causando a lise celular e a desnaturação dos ácidos nucleicos. A biomassa, excetuando o PHA é então solubilizada com enzimas proteolíticas e surfactantes aniônicos. Finalmente obtém-se o PHA através de centrifugação do material seguido do branqueamento com água oxigenada.

## **2.4. Produção de PHA por culturas mistas**

### 2.4.1. Culturas Mistas

Culturas mistas (CM) são populações de microrganismos onde não se conhecem os tipos e quantidades de microrganismos presentes. São utilizados em diversos ramos industriais nomeadamente no tratamento biológico de águas residuais, tanto na remoção de carência química e bioquímica de oxigénio (CQO e CBO) como na remoção de azoto, fósforo e sulfatos. As lamas ativadas, isto é, culturas mistas usadas em tratamentos aeróbicos, para além das funções que desempenham em sistemas de tratamento de águas residuais, apresentam-se como candidatas a substituírem as atuais culturas puras na produção de PHA. Muitas vezes as lamas, nos sistemas de tratamento de efluentes, são sujeitas a períodos de presença e

ausência de matéria orgânica, o que obriga a cultura a adaptar-se, acumulando reservas de carbono e energia no meio intracelular (Dircks *et al.*, 2001). De facto, a produção de polímero nas estações de tratamento de águas residuais já foi observado diversas vezes já que as águas residuais transportam muitas vezes compostos que podem ser convertidos em PHAs (Dionisi *et al.*, 2004).

#### 2.4.2. Estratégias

Nos últimos anos tem havido um grande interesse por parte da comunidade científica em desenvolver métodos alternativos e de baixo custo à produção de PHA. Nestas alternativas incluem-se o uso de substratos de baixo custo, como efluentes industriais e o uso de culturas mistas. Combinando os dois fatores é expectável um decréscimo de custos, dispensando esterilização de materiais e aquisição de substratos dispendiosos.

A utilização de uma fonte de carbono de baixo custo, como um efluente residual com elevada carga orgânica parece assim enquadrar-se no objetivo. No entanto, e ao contrário das culturas puras para produção de PHA, as culturas mistas não armazenam os hidratos de carbono sob a forma de PHA, mas sob forma de glicogénio (Albuquerque, 2009). Contudo são capazes de armazenar PHAs caso o substrato seja composto por ácidos orgânicos voláteis (AOVs) (Dircks *et al.*, 2001). Portanto é necessário haver uma etapa de fermentação acidogénica do efluente para converter os hidratos de carbono em AOVs. Para a realização desta etapa normalmente são usados reatores contínuos perfeitamente agitados (CSTRs) (Albuquerque *et al.*, 2007) ou reatores biológicos de leito móvel (MBBRs) (Jarpa *et al.*, 2012).

O uso de culturas mistas de lamas ativadas em substituição das culturas puras acarreta algumas vantagens. O crescimento e manutenção dos microrganismos podem ser operados de uma forma muito mais fácil já que não são necessárias condições de esterilização. É possível também usar como fonte de carbono substratos de composição variada e desconhecida, em vez do uso de uma fonte de carbono única ou uma mistura sintética de substratos bem definida.

No entanto as lamas ativadas não se encontram especializadas para a produção de polímero, mas apenas para a degradação de carbono e/ou nutrientes. Os compostos presentes nas águas residuais que podem ser transformados em PHAs



apresentam-se normalmente em baixas concentrações e a própria biomassa não é muito ativa a baixas cargas orgânicas a que está habituada, daí apenas uma fração dos microrganismos ter a capacidade de armazenamento do polímero e em quantidades reduzidas (Beccari *et al.*, 2002; Dircks *et al.*, 2001). Para corrigir estas limitações é necessário proceder a uma seleção dos microrganismos acumuladores de PHA, potencializando a capacidade da CM em produzir o polímero para valores mais próximos das culturas puras.

Essa seleção pode ser realizada induzindo na cultura mista condições que criem competição entre os microrganismos e fazendo com que aqueles mais aptos para a produção de PHAs sejam favorecidos. Este processo, denominado de Enriquecimento de Culturas Mistas em Microrganismos Produtores e Acumuladores de PHAs, tem recebido uma enorme atenção da comunidade científica, com vista à substituição das culturas puras. Este enriquecimento, que permite aproximar as capacidades de produção da CM às capacidades de uma cultura pura produtora de PHAs, tem sido demonstrado diversas vezes (Serafim *et al.*, 2008; Patel *et al.*, 2009; Dai *et al.*, 2007, 2008; Bengtsson, 2009).

O enriquecimento da CM pode ser atingido de duas formas, variando a presença e ausência de oxigénio ou variando a presença e ausência da fonte de carbono (Johnson *et al.*, 2010).

### ***Ciclos Anaeróbio/aeróbio***

Para além das lamas ativadas em sistemas aeróbios de tratamento de águas residuais terem capacidade de produzir PHAs, o fenómeno também já foi observado em sistemas biológicos de remoção de fósforo. Estes sistemas são operados em ciclos alternados de condições aeróbias e anaeróbias. Através destes ciclos ocorre uma seleção de microrganismos, sobretudo de organismos acumuladores de polifosfato (OAPs) e organismos acumuladores de glicogénio (OAGs) (Johnson *et al.*, 2010). Em condições anaeróbias, o carbono é armazenado sob a forma de PHA enquanto o glicogénio, anteriormente armazenado numa segunda unidade de armazenamento é consumido. Na fase aeróbia, os OAPs e os OAGs consomem o PHA para crescimento, armazenando o glicogénio (Albuquerque, 2009). O fenómeno de armazenamento de PHA deve-se a uma limitação externa de presença e ausência do aceitador final de eletrões (Serafim *et al.*, 2008). O enriquecimento de culturas pelo



método Anaeróbio/Aeróbio permite a seleção de culturas com baixas produtividades mas com uma maior variedade de polímeros obtidos, mesmo com base em substratos idênticos (Albuquerque, 2009).

### ***ADF***

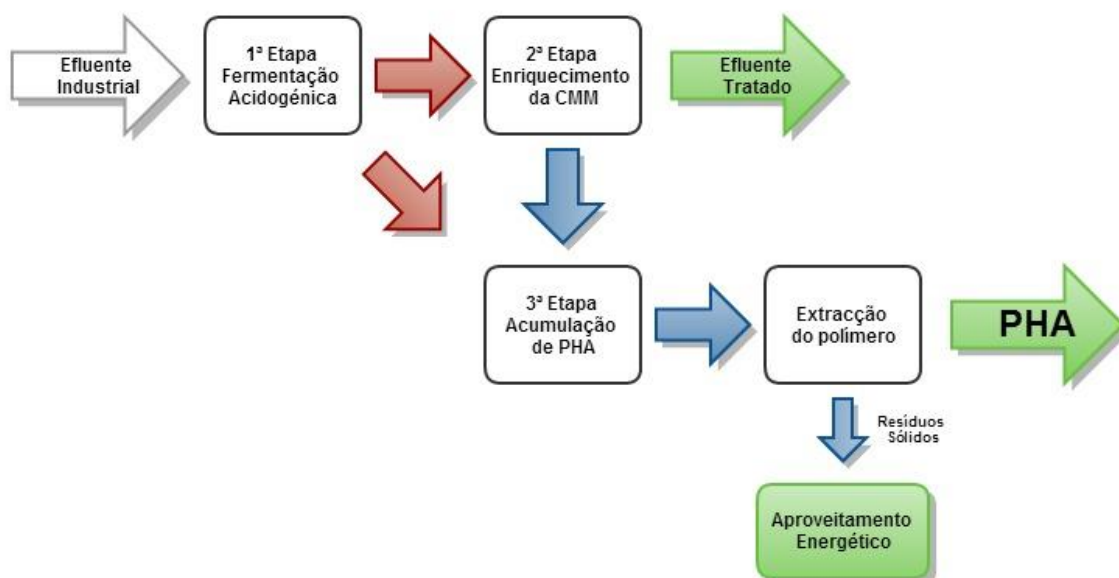
As lamas ativadas em condições completamente aeróbias, quando são sujeitas a longos períodos de fome após depleção do substrato, isto é, quando se encontram em ausência da fonte de carbono, tendem a adaptar-se, consumindo uma maior percentagem de carbono para armazenamento do que para crescimento. Esse carbono servirá como fonte de energia durante o período de fome, possibilitando a sobrevivência dos microrganismos.

Quando este fenómeno é imposto intencionalmente é designado de Alimentação Dinâmica Aeróbia (ADF) ou método de Fome e Fartura (F/F). Este trata-se portanto do outro método de seleção de culturas mistas, e o mais utilizado no que toca a enriquecimento de culturas mistas para produção de PHA. Permite obter culturas com elevada capacidade de produção e armazenamento de PHA, sendo possível atingir mais de 80% do conteúdo intracelular em polímero (Albuquerque, 2009).

Este método induz períodos de presença e ausência da fonte de carbono criando condições de fome-fartura. Para tal é dado um substrato inicial em excesso à cultura (período de fartura), onde os microrganismos vão usar a fonte de carbono para crescimento e/ou acumulação de polímero. Quando o substrato se esgota (período de fome) apenas os microrganismos que usaram o substrato para armazenamento de carbono sobreviverão, perdurando para um ciclo seguinte. A repetição deste ciclo permite então o enriquecimento em microrganismos acumuladores de PHA. Tradicionalmente os estudos com este método têm sido baseados no uso de substratos puros, ou realizados em meios sintéticos, e raramente com efluentes acidificados. O objetivo desses estudos é compreender de que forma os parâmetros operacionais do reator favorecem ou não o enriquecimento da cultura, nomeadamente a carga orgânica (ORL), o rácio de carbono/azoto/fósforo, pH o tempo de retenção de sólidos (TRS), tempo de retenção hidráulico (TRH) e duração de ciclo. Quando usado um efluente acidificado na seleção da cultura é possível também estudar o efeito do teor de ácidos orgânicos no efluente.

## 2.5. Método de Produção em 3 Fases utilizando ADF

A produção de PHA utilizando culturas mistas tem sido intensamente estudada nos últimos anos pela comunidade científica, existindo apenas um caso de aplicação a nível industrial, pela empresa AnoxKaldnes (Lund, Suécia). Diversos autores têm estudado um grande conjunto condições e parâmetros com vista a otimização deste processo. Na grande maioria dos casos são identificadas duas principais etapas (Figura 5, 2ª e 3ª etapa) quando são utilizados AOVs puros para a seleção da CM e produção de PHA (Serafim *et al.*, 2004; Johnson *et al.*, 2009). Uma terceira etapa (Figura 5, 1ª etapa) é adicionada quando um efluente industrial é utilizado como fonte de carbono (Dionisi *et al.*, 2005; Bengtsson *et al.*, 2008; Albuquerque *et al.*, 2010).



**Figura 5** Esquema do processo concetual de PHA em 3 Etapas, utilizando CM (adaptado de Morgan-Sagastume *et al.*, (2011)

### 2.5.1. 1ª Etapa - Fermentação Acidogénica

A etapa inicial corresponde à fermentação acidogénica de um efluente de baixo custo mas de elevada carga orgânica com vista a produção de ácidos orgânicos voláteis (AOVs), que posteriormente servirá de substrato aos microrganismos.

A maioria dos estudos relacionados com a produção de PHAs utilizando culturas mistas não faz um estudo da fermentação acidogénica com vista à produção de AOVs, optando pela utilização de substratos compostos por um único AOV, ou por uma mistura definida. Nesses trabalhos é comum optar-se pela utilização do acetato

como fonte de carbono (e.g. Dionisi *et al.*, 2001; Beun *et al.*, 2002; Serafim *et al.*, 2004; Johnson *et al.*, 2009), sendo este convertido ao PHA mais simples, o PHB, com o objetivo de simplificar o metabolismo dos microrganismos. Há também estudos que referem a adição de outros ácidos possibilitando a obtenção de outros monómeros, nomeadamente o monómero Hidroxivalerato, permitindo a produção do copolímero PHB-HV (Beccari *et al.*, 1998; Dionisi *et al.*, 2004; Lemos *et al.* 2006), com um valor comercial mais elevado. A utilização de ácidos puros na alimentação de culturas mistas permite uma análise mais aprofundada do comportamento dos microrganismos a este tipo de substrato, permitindo posteriormente o desenvolvimento de uma terceira etapa de acidificação de um substrato de baixo custo, *a priori* das restantes.

Em substituição dos ácidos puros como substrato, pode-se optar pela fermentação acidogénica de efluentes ricos em carbono e de baixo custo, convertendo-os num substrato mais apropriado à produção de PHAs.

A fermentação acidogénica é o primeiro de duas etapas anaeróbicas da digestão da matéria orgânica a metano e dióxido de carbono (produção de biogás).

Na primeira etapa, e em condições anaeróbicas os compostos orgânicos são transformados em AOVs e outros produtos. No processo, os hidratos de carbono, proteínas ou gorduras presentes no substrato, sob a forma de polímero, são hidrolisados, na presença de enzimas extracelulares, a monómeros. Estes por sua vez são convertidos a piruvato, no metabolismo dos microrganismos. Como a fermentação é dada em meio anaeróbio, o piruvato serve de aceitador e dador de eletrões, produzindo diferentes tipos de composto finais.

Na segunda etapa (metanogénese) os AOVs produzidos são oxidados a dióxido de carbono e metano. Se o processo anaeróbio é realizado com o objetivo de produzir AOVs, as condições de operação devem conduzir a uma optimização da fermentação acidogénica e uma inibição da metanogénese. Tempos de retenção hidráulicos curtos e baixos valores de pH tendem a favorecer a produção de AOVs (Albuquerque, 2009).

O processo normalmente ocorre em hidratos de carbono já que é este o principal composto dos efluentes industriais/ águas residuais.

Dos efluentes estudados destacam-se as águas residuais domésticas, efluentes do processamento de azeite (Dionisi *et al.*, 2005), óleo de palma (Loo *et al.*,

2005), pasta de papel (Bengtsson *et al.*, 2008), melação da cana-de-açúcar (Albuquerque *et al.*, 2010) entre outros.

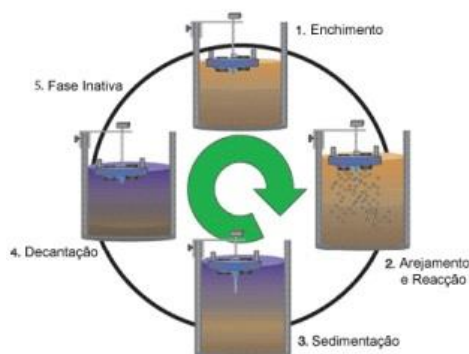
O efluente fermentado pode depois ser usado para a etapa de enriquecimento da cultura e/ou a etapa de acumulação.

### 2.5.2. 2ª Etapa - Enriquecimento de Culturas Mistas pelo método (F/F)

A segunda etapa, crítica neste método de produção de PHA, é o enriquecimento da CM de microrganismos produtores e armazenadores de PHA. Pretende-se nesta etapa potencializar a capacidade de produção e armazenamento da CM aproximando-a às características das culturas puras utilizadas para o mesmo fim. Para atingir este resultado é necessário proporcionar condições favoráveis ao crescimento dos microrganismos que tem maior capacidade de armazenamento de PHA e consequentemente condições desfavoráveis aos microrganismos com baixa taxa de acumulação de polímero. Este processo contribui positivamente para a produção de PHAs, não só para a etapa de acumulação de polímero, como também reduzindo os custos de extração do mesmo (van Loosdrecht *et al.*, 1997). O processo é frequentemente realizado em reatores descontínuos sequenciais (SBR) que permite então um melhor controlo das fases de fome e fartura (Bengtsson *et al.*, 2008), (Albuquerque *et al.*, 2007).

#### **Reator SBR**

Um reator descontínuo sequencial (SBR) trata-se na verdade de um reator semi-contínuo, onde a entrada de efluente, o período de reação e a saída do efluente ocorrem em fases distintas.



**Figura 6** Esquema de funcionamento de um reator SBR (PekaSys, 2012)

O processo cíclico inicia-se com a alimentação do reator inoculado com a cultura mista (Figura 6, Enchimento). Durante o arejamento os microrganismos consomem o substrato e dá-se a produção e acumulação de PHA, sendo esta a fase de fartura (Figura 6, Arejamento e Reação). O substrato é consumido na sua totalidade e dá-se posteriormente a fase de fome, onde apenas os microrganismos que acumularam PHA sobrevivem (ainda na mesma fase). Na fase 3, a cultura sedimenta (Figura 6, Sedimentação) e por fim dá-se a purga parcial do conteúdo (Figura 6, Decantação), mantendo as lammas no interior do reator para que se dê a repetição do ciclo.

### ***Condições de operação aplicadas***

A constituição das culturas mistas varia significativamente em função das condições de operação aplicadas ao meio em que se encontram, já que os diferentes organismos têm diferentes capacidades de adaptação. Portanto é de elevada importância o estudo do efeito das condições de operação dos SBRs quando se trata de proceder à seleção da cultura.

Os parâmetros vulgarmente estudados são: Carga orgânica (ORL), perfil de AOVs, rácio de Carbono/Azoto (C/N), tempo de retenção hidráulico (TRH), tempo de retenção de sólidos (TRS), duração de ciclo, temperatura e oxigénio dissolvido (OD). Há também algumas publicações que estudam outros parâmetros, nomeadamente o efeito do campo magnético (Zhu *et al.*, 2012).

### ***Perfil de AOVs***

O perfil de AOVs usado como alimento na seleção da cultura mista tende a influenciar sobretudo o tipo de polímero produzido, como enunciado anteriormente. Os ácidos com número par de carbonos (acético, butírico, capróico) permitem a produção de Acetil-CoA (2 átomos de carbono). Posteriormente é produzido o monómero HB, com a combinação de dois Acetil-CoA. Os ácidos com número ímpar de carbonos (propiónico, valérico) permitem a produção de Propionil-CoA (3 átomos de carbono) que juntamente com um Acetil-CoA permite a formação do monómero HV (5 átomos de carbono). A combinação de ácidos com número de carbonos par e ímpar

conduz a formação do copolímero PHB-HV. O teor do monómero HV está assim dependente do teor de ácido propiônico e ácido valérico presente no meio.

### ***Oxigênio Dissolvido***

O oxigênio dissolvido é monitorizado e controlado para calcular taxas de produção ou realizar testes de respirometria. Pode ser utilizado como um fator de limitação externo.

### ***Carga Orgânica***

A carga orgânica (ORL) representa o teor de matéria biodegradável que é introduzido no reator por unidade de tempo.

Normalmente são aplicadas concentrações entre 30-120 Cmmol/L/d, ( que correspondem a 1,8-7,2 gCQO/L/d de AOVs), havendo no entanto alguns estudos utilizando concentrações significativamente maiores. Dionisi *et al.* (2006) testaram enriquecimento de culturas com ORLs entre 8.5 – 31.25 gCQO/L/d). Os testes com elevados ORLs têm como objetivo aumentar a produção volumétrica, já que quanto mais carbono se fornecer, maior será a quantidade de polímero produzido.

No entanto, o aumento da carga orgânica pode resultar num aumento da fase de fartura. Se o aumento do ORL se dever a um incremento da concentração no efluente de entrada no SBR, para o mesmo teor de biomassa, estas irão demorar mais tempo a degradar a matéria orgânica, resultando num aumento da fase de fartura, para um ciclo de igual duração.

A carga orgânica pode ser modificada não só pela concentração do substrato mas também pelo volume de substrato adicionado. Se se encurtar o ciclo de operação do reator (ou o TRH), o volume de entrada de substrato para o mesmo período de tempo será maior. Neste caso, já que a concentração de matéria orgânica se mantém constante, a taxa de consumo de substrato também se irá manter constante, contribuindo então para um crescimento da biomassa. Com este crescimento, o rácio entre o tempo das fases de fome e fartura não deverá sofrer alterações, isto se o crescimento da biomassa seja proporcional ao aumento da carga orgânica (Albuquerque, 2009).

Dionisi *et al.*, (2006) e Villano *et al.* (2010) estudaram os efeitos deste parâmetro no enriquecimento de culturas mistas em SBRs, fazendo variar a concentração de substrato e duração de ciclo respetivamente (tabela 6).

**Tabela 6** Condições aplicadas a reatores SBR (Dionisi *et al.*, 2006; Villano *et al.*, 2010)

Parâmetro	Dionisi	Villano
Ciclo SBR	2 horas	2h-1h-0,67h-0,42h
Substrato	40% acético, 40% láctico, 20% propiónico (em base CQO)	85%acético, 15%propiónico (em base CQO)
ORL	8,5-12,75-20-25-31,25 gCQO/L/d (modificando a concentração de entrada)	8.5 a 40,8 gCQO/L/d (modificando a duração do ciclo)
Tempo de retenção hidráulico (TRH) e tempo de retenção de sólidos (TRS)	1 Dia	1 dia - 0,5 dias - 0,33 dias - 0,21 dias
Temperatura	25°C	
pH	7,5	

Com estas condições Dionisi concluiu que o aumento da carga orgânica correspondeu a um aumento da concentração da biomassa, e que acima de 20 gCQO/L/d se traduziu num decréscimo da taxa de produção de polímero. Nas cargas mais elevadas (25 e 31,25 gCOD/L/d), a fase de fatura teve uma duração demasiado elevada o que não permitiu uma seleção dos melhores microrganismos acumuladores de PHA. A produtividade de PHA atingiu um máximo de 0,25 gPHA/L/h quando foi aplicado um OLR de 20 gCOD/L/d.

Villano *et al.* (2010) realizaram o mesmo estudo, embora tenha variado a carga orgânica diária mantendo a mesma concentração do efluente de entrada mas alterando a duração do ciclo do SBR. Obteve os melhores resultados de capacidade de armazenamento para uma carga orgânica de 8,5 gCOD/L/d, a mais baixa que estudou correspondendo a um ciclo de SBR de 2h e um TRH de 1 dia, e obteve uma maior produtividade de polímero com uma seleção a 25 gCOD/L/d de carga orgânica.

### **Rácio C/N**

O rácio carbono/azoto (C/N) representa a proporção de carbono para azoto, e permite perceber se o meio se encontra limitado num ou noutra elemento. Este parâmetro tem um importante papel na seleção da cultura, mas não é determinante, já que não é necessário haver uma limitação externa de nutrientes para haver

acumulação de polímero. Em culturas mistas, a produção de PHA deve-se a uma limitação interna do crescimento dos microrganismos, provocada pela ADF. Na presença de nutrientes o crescimento microbiológico ocorre em paralelo à acumulação de PHA. Porém o controlo dos nutrientes presentes no meio pode influenciar a fração de substrato usado para o crescimento.

Johnson *et al.* (2010) estudaram a influência do rácio C/N na produção de PHB em culturas mistas, concluindo que a limitação em azoto é indicada na etapa de acumulação de PHA mas desfavorável no que toca à seleção da cultura. No estudo foi utilizado apenas acetato como fonte de carbono e amónia como fonte de azoto e as taxas de consumo de cada elemento permitiram compreender se o meio se encontrava limitado a algum dos dois. Concluiu-se também que, C/N superiores de 100/3 Cmol/Nmol correspondem a um meio limitado em azoto e inferiores a 100/2 Cmol/Nmol traduz num meio limitado em carbono. Albuquerque *et al.* (2007) confirmaram também que, mesmo utilizando efluentes fermentados, a limitação de azoto leva a uma perda de capacidade de armazenamento na fase de enriquecimento. Num meio limitado em carbono atinge-se uma cultura produtora de PHA mais estável.

### ***Tempo de retenção de sólidos***

No mesmo estudo, Johnson *et al.* (2010) analisaram o efeito do tempo de retenção de sólidos na limitação num dos dois elementos (azoto ou carbono). De facto não só as concentrações de carbono e azoto iniciais determinam se o meio é limitado em carbono ou em azoto mas também o TRS. É indicado que limitações em azoto se intensificam a baixos SRTs (menor que 2 dias), não sendo tão apropriado para o enriquecimento da cultura.

Coats *et al.* (2007) estudaram igualmente dois SRTs diferentes, 4 e 6 dias, com o mesmo rácio C/N, obtendo maior conteúdo de PHA na cultura enriquecida com o tempo de retenção de sólidos mais pequeno.

### ***pH***

Em relação ao pH, Villano *et al.* (2010) estudaram os efeitos do pH nas fases de enriquecimento e de acumulação de PHA e concluiu que no SBR, as taxas e os rendimentos de armazenamento de polímero diminuíram com o aumento do pH de



7,5 para 9,5. A estabilização da composição da comunidade microbiana deu-se mais rapidamente para um pH de 7,5. Para um pH de 8,5 a cultura também estabilizou, embora com uma constituição diferente da anterior e a pH 9,5 não foi possível obter uma cultura estável.

### ***Temperatura***

A temperatura desempenha também um papel importante no enriquecimento da cultura mista, já que influencia as reações metabólicas bem como a competição entre diferentes tipos de microrganismos (Krishna and Van Loosdrecht, 1999).

As variações de temperatura quer de curto-prazo ou longo-prazo, influenciam a seleção da cultura. Quando se trata apenas de uma mudança de curto-prazo (variações que ocorrem de ciclo para ciclo), estas tendem apenas a influenciar as cinéticas dos metabolismos, contudo as mudanças de longo-prazo (culturas que são selecionadas a uma dada temperatura e que após estabilização sofrem uma mudança de temperatura) podem influenciar a adaptação dos microrganismos e modificar a própria constituição microbiológica da cultura (Johnson *et al.*, 2010). No estudo, verificou-se que nas mudanças de temperatura a longo prazo, a cultura mista selecionada com ácido acético como substrato obteve melhores resultados de produção e armazenamento para as temperaturas mais elevadas (30°C).

#### 2.5.3. 3ª Etapa - Acumulação de PHA em reatores Batch

A terceira fase da produção de PHA a partir de culturas mistas corresponde à acumulação do polímero. É operada em reatores Batch, por se tratar de uma operação finita e descontínua, já que o processo é interrompido quando os microrganismos atingem o máximo de acumulação de polímero.

A separação da segunda e terceira etapas permite a otimização do processo, já que são requeridas condições ótimas diferentes em cada um dos passos (Dionisi *et al.*, 2004; Serafim *et al.*, 2004; Villano *et al.*, 2010). Após terceira etapa é possível proceder à extração do biopolímero.

Diferentes estratégias de alimentação podem ser aplicadas nesta fase: alimentação única (no início da operação do batch), ou alimentação faseada – alimentação por pulsos, em que o substrato é facultado em quantidades mais pequenas e várias vezes. Nesta fase é possível atingir valores de PHA próximos dos

90% de conteúdo celular. Johnson *et al.* (2009) atingiu 89% com ácido acético como substrato).

Aplicando diferentes cargas orgânicas, diferentes pH e sobretudo criando meios limitados em nutrientes é possível potencializar a capacidade de produção de PHA.

Bengtsson *et al.* (2008) estudaram o efeito da limitação de azoto e fósforo na fase de acumulação, obtendo maiores capacidades de armazenamento nos ensaios limitados em nutrientes. Com excesso de nutrientes os microrganismos armazenaram cerca de 10% menos que os microrganismos limitados em azoto e fósforo, tendo sido usado um efluente industrial acidificado de uma indústria de papel como substrato. Porém parece ser necessário a presença de uma quantidade residual de amónia para que a produção de PHA ocorra (Albuquerque, 2009).

O pH do meio em que a cultura enriquecida se encontra na fase de acumulação de PHA também representa um importante parâmetro. De facto (Villano *et al.*, 2010) verificaram que a mudança de pH da segunda para a terceira etapa pode trazer efeitos benéficos na acumulação de polímero. No estudo verificaram que a mudança de pH de 8,5 na fase de seleção para 9,5 na fase de acumulação permitiu acumular cerca de 9% de peso celular seco a mais do que no batch realizado a 8,5. Não só a capacidade de acumulação aumentou como também o rendimento de produção em função da quantidade de AOVs consumida. O pH também permitiu modificar a fração de monómeros de HB e HV produzidos, sendo que teor de HV aumentou com o aumento do pH.

Da mesma forma que na fase de seleção, a temperatura também representa um parâmetro importante na fase de acumulação. Krishna (1999) analisou o efeito do aumento da temperatura dos 15 para os 35°C e verificou que o consumo do substrato (ácido acético) se deu a uma taxa mais elevada, porém a capacidade de armazenamento diminuiu para cerca de metade. Este fenómeno pode ser explicado com a adaptação da cultura às novas condições, o que fez com que o substrato fosse mais consumido para o metabolismo celular do que para armazenamento de PHA.

O oxigénio também pode ser usado em quantidades limitadas potencializando a taxa de produção de PHA. Third *et al.* (2003) verificaram que a produção de PHB foi maior quando o oxigénio estava em concentrações limitadas (<0.01 mg/L) do que em

excesso de oxigénio ( $>0.9$  mg/L), tendo sido obtido  $0.68$  Cmol PHB/Cmol contra  $0.54$  Cmol PHA/Cmol em que foi usado como substrato o ácido acético. A explicação sugerida para este facto pressupõe que a limitação de moléculas de ATP, causado pela limitação de oxigénio reduz o crescimento celular e consequentemente uma maior fração de substrato é usado para armazenamento de PHB. No entanto as taxas de armazenamento podem ser fortemente reduzidas com concentrações de oxigénio demasiado baixas.



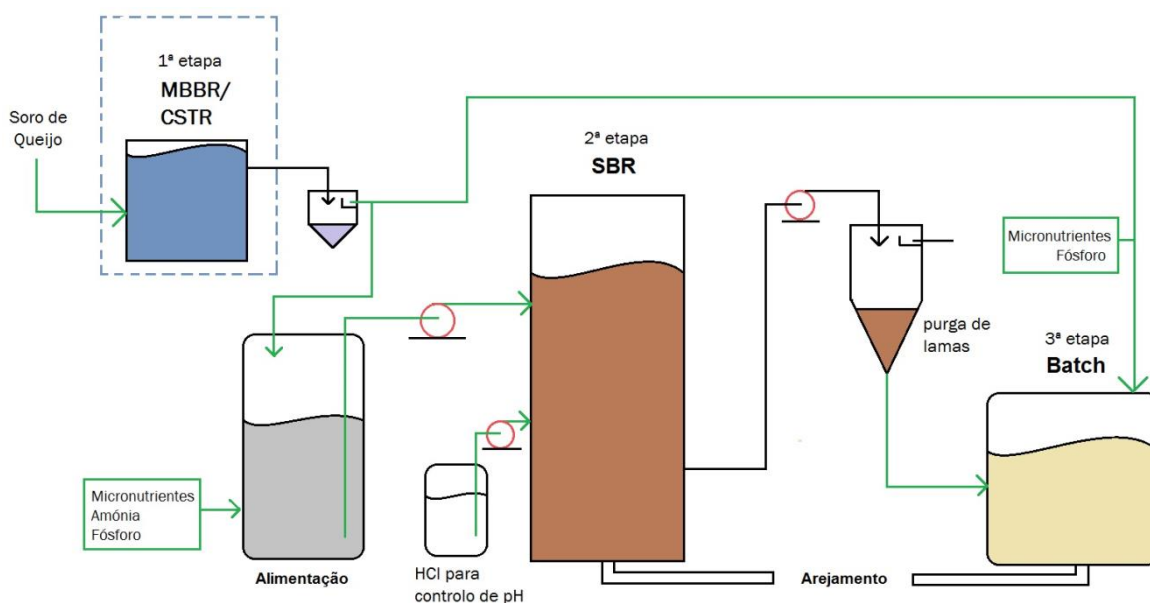
### 3. Materiais e Métodos

O trabalho experimental realizado, integrado no projeto “POLIBIO: *Biopolymers production as a new concept on wastewater treatment*” consistiu no desenvolvimento das etapas de enriquecimento da cultura mista e acumulação de PHAs, utilizando lamas ativadas provenientes da ETAR Norte da SIMRIA e da ETEI da Prio, ambas situadas em Aveiro. Como fonte de carbono foi utilizado soro de queijo proveniente de uma indústria de produção de queijo.

A fase de fermentação acidogénica do soro de queijo foi operada e estudada noutros trabalhos em paralelo e foram utilizados reatores MBBR e CSTR para o efeito.

#### 3.1. Instalação experimental

Para o enriquecimento da cultura mista foram operados 4 reatores SBR, em momentos diferentes, perfazendo um total de 5 condições diferentes analisadas (Tabela 8). Apenas as condições 1 e 2 foram operadas de forma contínua no mesmo reator. Os reatores foram inoculados com lamas provenientes da ETAR Norte da SIMRIA, da ETEI da Prio, ou com lamas provenientes de um enriquecimento anterior com outras condições (Tabela 8). Das condições 3, 4 e 5 foram realizados ensaios *batch*. A Figura 7 ilustra a instalação do sistema experimental.



**Figura 7** Instalação experimental do Sistema de produção de PHAs. A 1ª etapa (tracejado) não foi analisada neste trabalho experimental

### **3.2. Reator Descontínuo Sequencial**

Os SBRs, com 5 litros de volume operacional, foram realizados em condições de alimentação aeróbia dinâmica (ADF), utilizando o efluente acidificado como substrato. Os ciclos foram todos de 24 horas que correspondiam a 20 minutos de enchimento, 22h50 min de arejamento (fase de fome/fartura), 30 minutos de sedimentação e 20 minutos de purga. Do litro retirado do reator na fase da purga, 500 mililitros do conteúdo do reator eram extraídos com as lamas sedimentadas e 500 mililitros retirados com o reator perfeitamente agitado, mantendo o tempo de retenção hidráulico (TRH) em 5 dias e o tempo de retenção de sólidos (TRS) em 10 dias. Os SBRs foram arejados através de 4 difusores de cerâmica que permitiram igualmente a agitação do conteúdo.

Os processos de enchimento, purga e arejamento foram controlados automaticamente com temporizadores. Para tal foram usadas duas bombas peristálticas Watson-Marlow 101UR e uma tomada de arejamento automática. O pH foi controlado automaticamente a um máximo de 8 e monitorizado por um *software* desenvolvido pelo grupo de investigação. Foi usada uma bomba peristáltica para a injeção do ácido clorídrico (0,1 M). O mesmo *software* adquiriu dados de temperatura e oxigénio.

### **3.3. Alimentação dos SBR**

A alimentação, que igualmente correspondia a 1 litro por dia, foi preparada com o efluente acidificado, previamente clarificado através de um sedimentador. Foram usados efluentes de diferentes condições aplicadas aos reatores MBBR e CSTR, que originaram produtos com diferentes concentrações de AOVs (Tabela 8). Foi adicionado também amónia, sob a forma de cloreto de amónia, e fosfato sob a forma de fosfato de potássio, já que o efluente acidificado não possuía estes nutrientes. A concentração de fosfato foi imposta de modo a que o rácio de Carbono/Fósforo fosse de 100:1 (Cmol:Pmol). A concentração de amónia foi estabelecida para que o rácio C/N fosse 100/7, 100/13 e 100/25 (Cmol/Nmol) (Tabela 8). Foram igualmente adicionados micronutrientes, EDTA como antioxidante dos iões metálicos e Tiourea para inibir a nitrificação da amónia. As concentrações destes compostos foram baseados no estudo de (Dionisi *et al.*, 2004), e são descritas na Tabela 7. Os

compostos foram divididos em duas soluções designadas Meio Mineral e Micronutrientes.

**Tabela 7** Concentrações de micronutrientes adicionados a alimentação

Meio mineral (mg/L alimentação)		Micronutrientes (mg/L alimentação)	
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	100	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,3
EDTA	3	MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,03
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	50	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,2
Tiourea	20	ZnCl <sub>2</sub>	0,1
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	2	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,05
		CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,01
		NiCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,02
		KI	0,03

O pH da alimentação foi ajustado a 6 de modo a não criar uma variação tão acentuada no interior do reator. Verificou-se também que este valor de pH foi o suficiente para não criar instabilidade no reator

### 3.4. Parâmetros analisados

O oxigénio dissolvido foi monitorizado e utilizado para analisar as fases de fome e fartura. O pH foi um parâmetro de controlo e limitado a um máximo de 8. Este controlo foi realizado automaticamente com a injeção de ácido clorídrico (1 Molar) sempre que era detetado pH=8. Não houve controlo de temperatura.

A Carência Química de Oxigénio (CQO) foi analisada à entrada e saída dos reatores e foi utilizada para análise do consumo de substrato.

Os (AOVs), o carbono orgânico total solúvel (TOC), azoto total (TN), amónia e proteínas foram monitorizados periodicamente no início e fim de cada ciclo de modo a analisar os consumos de cada um. Os sólidos suspensos voláteis (SSV) foram medidos para analisar o crescimento microbiológico. Os mesmos parâmetros foram igualmente monitorizados ao longo de um ciclo, em cada condição aplicada (com exceção do SBR1 e SBR2), com múltiplas amostragens de modo a analisar o próprio consumo ao longo do ciclo.

Os parâmetros impostos aos SBRs para cada condição estão definidos na Tabela 8.

**Tabela 8** Condições de operação nos SBR

Nome	Inoculação	Dias de Operação	ORL (gCQO/L/d)	% AOV <sub>sin</sub> (base CQO)	C/N	pH	TRH (dias)	TRS (dias)
SBR1	ETAR Norte	70	1,7	75%	14	8	5	10
SBR2	R1	41	3,0	59%	14	8	5	10
SBR3	ETEI Prio	31	1,4	75%	14	8	5	10
SBR4	R3	62	1,3	40%	7,6	8	5	10
SBR5	R4	39	1,4	69%	5	8	5	10

### 3.5. Ensaios Batch

Com as lamas enriquecidas das condições 3, 4 e 5 foram realizados 5 reatores batch para analisar a capacidade de acumulação das mesmas. Para tal usaram-se recipientes com um volume útil de 500 ml. As lamas foram inoculadas nos batch com concentração próxima dos 2,5 gSSV/L, perfazendo um total de 400 ml. Foram introduzidos 100 ml de alimentação com diferentes cargas orgânicas e com substrato proveniente de diferentes condições da fermentação acidogénica (Tabela 9). Foram também adicionados micronutrientes (Tabela 7). Amónia não foi adicionada, estando este composto presente no reator apenas em quantidades residuais provenientes das lamas dos SBRs. Os reatores foram arejados com um difusor cerâmico e agitados com um agitador magnético.

Diferentes condições foram aplicadas aos Batch (Tabela 9).

**Tabela 9** Condições aplicadas aos ensaios Batch

Nome	Inoculação	ORL (gCQO/L/d)	%AOVs in (base CQO)	SSV (g/L)	pH	Proteínas Precipitadas
B1	R4	1,5	40%	3,08	S/ Controlo	
B2	R3	1,5	70%	2,17	S/ Controlo	
B3	R3	3	73%	2,15	S/ Controlo	
B4	R3	1,5	73%	2,35	9	
B5*	R5	1,5	88%	2,4	S/ Controlo	✓

\*O ensaio do batch 5 teve como objetivo testar a potencial inibição das proteínas na produção de PHAs.



### 3.6. Métodos Analíticos

#### 3.6.1. Carência Química de Oxigénio, Sólidos Suspensos Totais e Voláteis

A Carência Química de Oxigénio (CQO) foi medida segundo o método de refluxo fechado com determinação espectrofotométrica baseado no protocolo do “Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater” (Eaton *et al.*, 2005).

Os SST e SSV foram igualmente medidos de acordo com o “Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater “ (Eaton *et al.*, 2005). Os SSVs foram definidos como teor de biomassa.

#### 3.6.2. Medição de oxigénio e pH

O oxigénio dissolvido foi medido com um transmissor *Alpha DO 2000* da *Thermo Scientific*, através de uma sonda de oxigénio *InPro 6800* da *Mettler Toledo* e adquirido com um *software* desenvolvido pelo grupo de investigação. O mesmo *software* adquiriu dados de temperatura (a sonda de temperatura estava incorporada na sonda de OD), e de pH. O pH foi medido e controlado por um controlador/transmissor *Alpha pH 1000* da *Thermo Scientific* através de um eléctrodo pH da *Polyclave*.

#### 3.6.3. Carbono orgânico total e azoto total

O TOC foi quantificado por deteção de absorção infravermelha não dispersiva e o TN por deteção eletroquímica, ambos num *Analytikjena Multi N/C 2100S*. Foram apenas considerados teores solúveis.

#### 3.6.4. Ácidos Orgânicos Voláteis

Os ácidos acético, propiónico, i-butírico, n-butírico, i-valérico, n-valérico e caprónico foram medidos por cromatografia gasosa num cromatógrafo *Clarus 480* da marca *Perkim Elmer* equipado com uma coluna *Chrompack CPSIL-5CB* de 25m x 0.25mm. As determinações foram realizadas com a injeção de 0.5 µL de amostra filtrada contendo 10% de ácido fórmico. Como gás carrier foi usado Hélio. A programação da temperatura no cromatógrafo foi a seguinte: 1 min a 70°C, seguida de uma rampa de 20°C/min até aos 100°C, mantendo-se a esta temperatura durante 2 minutos. Novamente uma rampa de 10°C/min até 140°C e mantida durante 3

minutos. Já que os teores de i-butírico e i-valérico quantificados foram sempre residuais, foram considerados apenas ácidos butírico e valérico, cada um como o somatório dos respectivos isômeros. Os dados foram determinados em mg/L e convertidos em Cmmol/L. Foram também convertidos a gCQO/L através dos valores de carência química de oxigênio teóricos.

#### 3.6.5. Polihidroxialcanoatos

Para determinar o teor de PHA por biomassa e composição do copolímero, foi utilizado um cromatógrafo gasoso *Clarus 480* da marca *Perkim Elmer* equipado com uma coluna SGE BP20 (WAX) 60 mt $\times$ 0,32mm $\times$ 0,5 $\mu$ m. O teor de PHA foi determinado com base no método adaptado de Serafim *et al.* (2004) e Lemos *et al.* (2006). As concentrações de Hidroxibutirato (HB) e Hidroxivalerato (HV) foram calculadas usando padrões de PHB-HV (88%-12% em base molar). Foi usado Heptadecano (HD) como padrão interno. A programação da temperatura no cromatógrafo foi a seguinte: rampa de 16°C/min dos 50°C aos 100°C seguida de outra rampa a 9°C/min até aos 225°C mantendo-se por 3 min.

#### 3.6.6. Precipitação e determinação das proteínas para o batch 5

As proteínas foram determinadas por espectrofotometria pelo método do biureto (Chemists, 1972).

Para o ensaio do Batch 5 as proteínas foram precipitadas baseado no método de (Ahn *et al.*, 2000). A solução de alimentação foi ajustada para um pH de 4,5 seguida de uma autoclavagem a 121°C durante 15 minutos. Os agregados foram removidos por centrifugação a 2000xg. O material particulado mais fino foi removido por filtração utilizando filtros de fibra de vidro. Finalmente o pH da solução final foi corrigido para 6,5.

#### 3.6.7. Coloração para a visualização de PHA

Para a visualização do PHA de forma qualitativa foi utilizada a colorações de Azul de Nilo adaptada pelo Murray *et al* (1994) e Ostle e Holt (1982). Como os grânulos de PHA emitem uma forte fluorescência de cor vermelha quando corados com Azul de Nilo, fazem com que os organismos produtores de PHA sejam facilmente identificáveis quando expostos a este corante (Oshiki *et al.* 2010).

A análise foi efectuada num microscópio Carl Zeiss Axio Imager A.2 acoplado a uma câmara Carl Zeiss AxioCam MRm, estando ligado ao sistema uma câmara de fluorescência Zeiss HXP 120 C. As imagens foram adquiridas em formato digital através do programa de *software* AxioVision. A análise e o processamento das imagens foram efetuados com o programa ImageJ.

### 3.7. Cálculos de teores e balanços Materiais

O conteúdo de PHA, e as frações molares dos monómeros HB e HV foram determinados por cromatografia gasosa como uma percentagem molar de SSV.

$$\%PHA = \frac{\text{molPHA}}{\text{molSSV}} \times 100$$

A biomassa ativa ( $X$ ) foi calculada através da subtração do polímero aos SSV. Foi considerada para a biomassa a fórmula empírica  $C_5H_7NO_2$  (Bengtsson *et al.*, 2008).

$$SSV \left( \frac{\text{mol}}{L} \right) = \frac{SSV (g)}{113 \left( \frac{g}{\text{mol}} \right)}$$

$$X \left( \frac{\text{mol}}{L} \right) = SSV \left( \frac{\text{mol}}{L} \right) - PHA \left( \frac{\text{mol}}{L} \right)$$

A produção do copolímero PHB-HV em Cmmol/L nos reatores batch foi calculada a partir do conteúdo de PHA.

$$PHA \left( \frac{\text{Cmmol}}{L} \right) = \%PHA \times X \times n^{\circ} \text{carbonos}_{PHA}$$

O número de carbonos foi ponderado através das frações molares dos monómeros HB e HV.

Os rendimentos de produção de PHB e PHV foram calculados pela divisão do conteúdo máximo de polímero pelo teor de AOVs consumidos

$$y_{PHB/PHV} = \frac{\text{CmmolPHB máx.}}{\text{Cmmol AOVs consumidos}}$$

A taxa de consumo volumétrica de AOVs foi calculada pelo rácio de AOVs consumidos em função do tempo.

$$-r_{AOVs} = \frac{\Delta AOVs}{\Delta h}$$



## 4. Resultados e Discussão

### 4.1. Enriquecimento da Cultura Mista de Microrganismos

Nesta dissertação, 4 SBRs foram operados com o objetivo de produzir culturas microbiológicas mistas enriquecidas em microrganismos produtores e acumuladores de PHA. Foram aplicadas 5 condições diferentes aos reatores. Cada condição aplicada correspondeu a um SBR novo exceto O SBR 2 que foi operado no seguimento do SBR 1. Os parâmetros utilizados para induzir as diferentes condições aplicadas foram a carga orgânica, o teor de AOVs na alimentação dos reatores e o rácio C/N (Tabela 10). Os parâmetros TRH,TRS, duração de ciclo e pH do reator, foram idênticos para todas as condições (5 dias, 10 dias, 1 dia, e 8 respetivamente).

**Tabela 10** Condições aplicadas e resultados gerais dos 5 SBRs

Condições Aplicadas				Resultados				
Nome	Carga Orgânica (gCQO/L/d)	%AOVs <sub>in</sub> (base CQO)	C/N	Remoção máx. de CQO (%)	F/F (h/h)	%PHA molPHA/molSSV	SSV (g/L)	-Γ <sub>AOVs</sub> total (Cmmol/L.h)
SBR1	1,7±0,2	75%	14	86	0,09	53	2,1±0,5	6,86
SBR2	3,0±0,1	59%	14	80	0,8	17	7,4*	n.d
SBR3	1,4±0,3	75%	14	81	0,16	26	2,8±0,4	15,6
SBR4	1,3±0,2	40%	7,6	82	0,10	11	4,2±0,5	2,6
SBR5	1,4±0,3	69%	5	87	0,17	35	3,3±0,5	9,22

n.d: não determinado

\*valor final de SSV após 28 dias de operação. No SBR 2 verificou-se um aumento da biomassa ao longo da sua operação

Os reatores operaram durante um período nunca inferior a 30 dias (correspondente a 3 TRS). Foram monitorizados os teores de CQO à entrada e saída do reator (para o cálculo da remoção de CQO), os perfis de oxigénio, os AOVs, e os sólidos suspensos totais e voláteis (os últimos para contabilização da biomassa). Foram também analisados os AOVs, %PHA, TOC e TN ao longo de um ciclo dos SBR 3, 4 e 5.

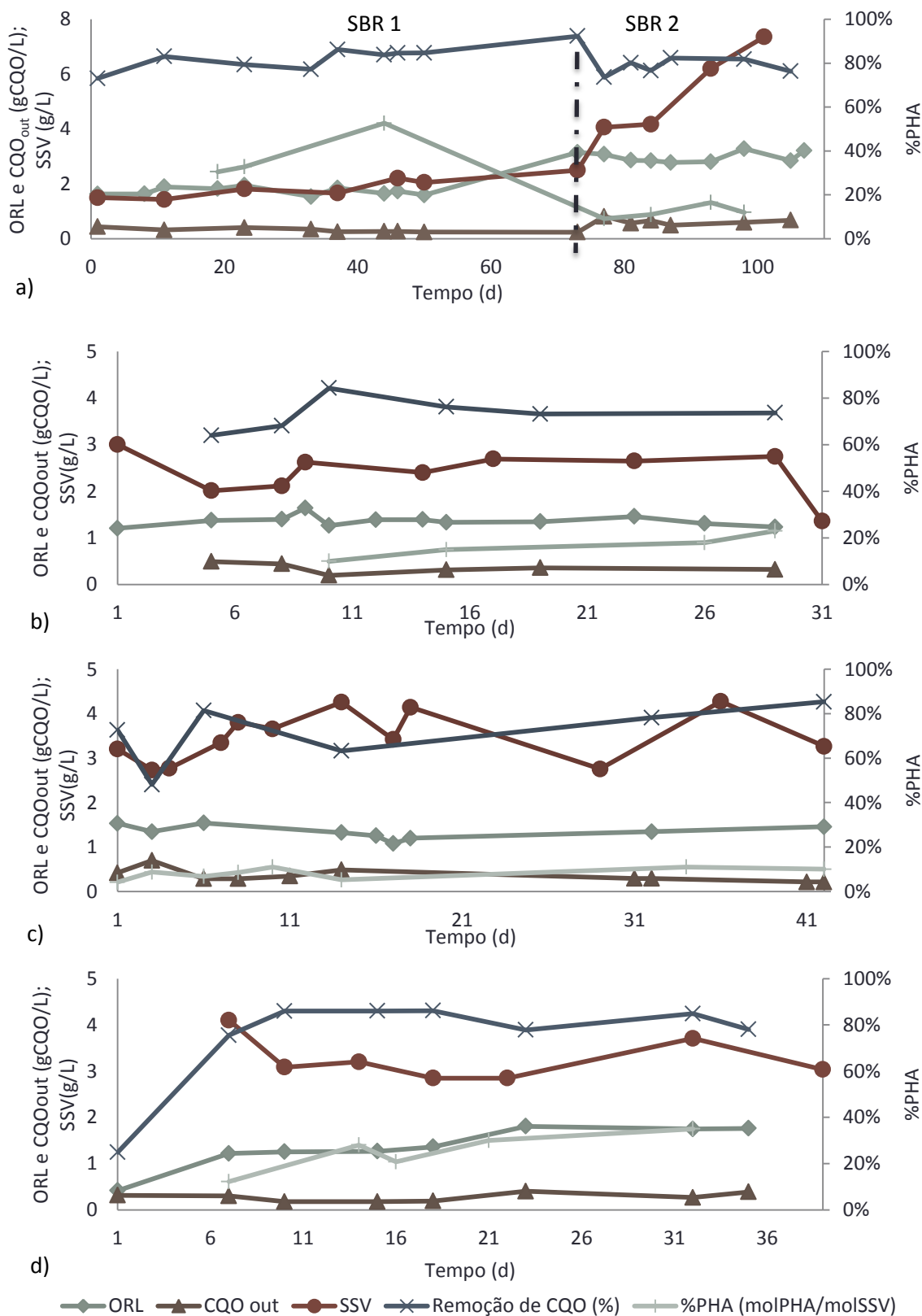


Figura 8 Carga orgânica aplicada e resultados gerais dos SBRs 1 e 2 a), 3 b), 4 c) e 5 d)

A figura 8 descreve a carga orgânica aplicada aos SBRs 1 e 2 (a), 3, 4 e 5 (b), c) e e) respectivamente) ao longo dos dias de operação de cada condição. É possível analisar também o CQO de saída no final de cada ciclo (CQO out), a remoção de CQO (%), o teor de biomassa (SSV) e o teor máximo de polímero armazenado (%PHA) analisado no final da fase de fatura, de acordo com o perfil de oxigênio do respectivo dia.

De uma forma geral, todos os SBRs atingiram remoções superiores a 80% o que do ponto de vista do tratamento de efluentes é favorável (tabela 10).

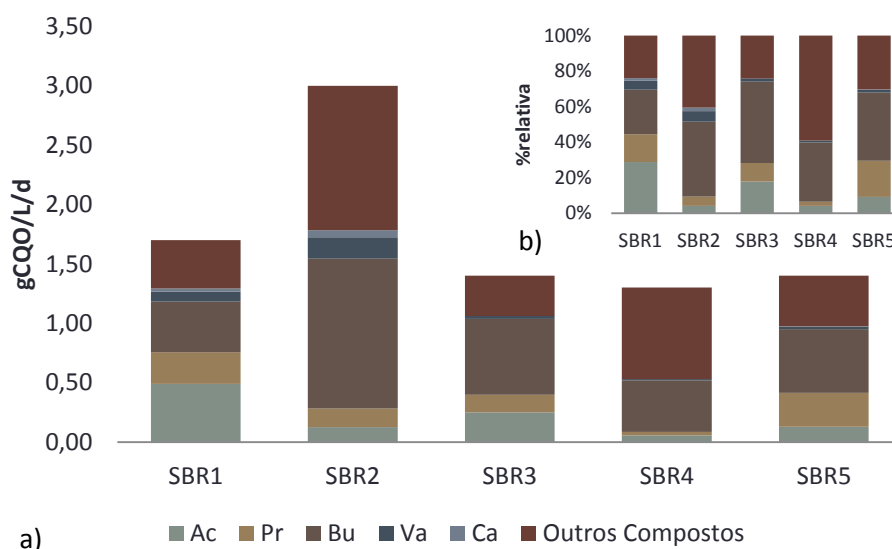
No SBR 1 é possível observar que o teor de biomassa foi sensivelmente constante a  $2,1 \pm 0,5$  (tabela 10) ao longo do processo de enriquecimento, e que o teor máximo de polímero acumulado no final da fase de fatura de um ciclo foi aumentando ao longo da operação do SBR (de 30% a 53% molPHA/molSSV num período de 20 dias), indicando que estaria a ocorrer uma seleção de microrganismos acumuladores de PHA. No entanto quando foi aumentada a carga orgânica para 3,0 gCQO/L/d verificou-se uma perda nessa capacidade de armazenamento atingindo um valor de 9% molPHA/molSSV. O efeito da carga orgânica neste acontecimento é analisado no subcapítulo 4.1.4.

Nos SBR 3 e 5 (figura 8 b) e d)) verificou-se também que durante a operação destes reatores o teor máximo de polímero acumulado num ciclo foi aumentando, de 10% para 23% no SBR 3 e de 12% para 35% no SBR 5. O mesmo não se verificou no SBR 4 em que o teor de polímero acumulado foi inferior às restantes condições, não se tendo verificado um crescimento da capacidade de armazenamento ao longo da sua operação. O máximo conteúdo de PHA intracelular acumulado correspondeu a 11 molPHA/molSSV.

#### 4.1.1. Caracterização da Alimentação

A alimentação foi preparada com uma mistura de soro acidificado, amônia, fosfato e outros micronutrientes. As cargas orgânicas aplicadas foram definidas para os valores representados na Tabela 10 diluindo o soro acidificado disponível.

A composição da alimentação aplicada variou consoante os AOVs produzidos na 1ª etapa de fermentação acidogénica, explicando os diferentes teores de ácidos para as cargas aplicadas (figura 9).



**Figura 9** Composição da alimentação em AOVs em cada condição (como CQO (a) e em percentagem relativa (b))

\*Outros compostos presentes na alimentação podem incluir açúcares e proteínas e outros compostos que não foram convertidos a AOVs na 1ª etapa do processo de produção de PHAs

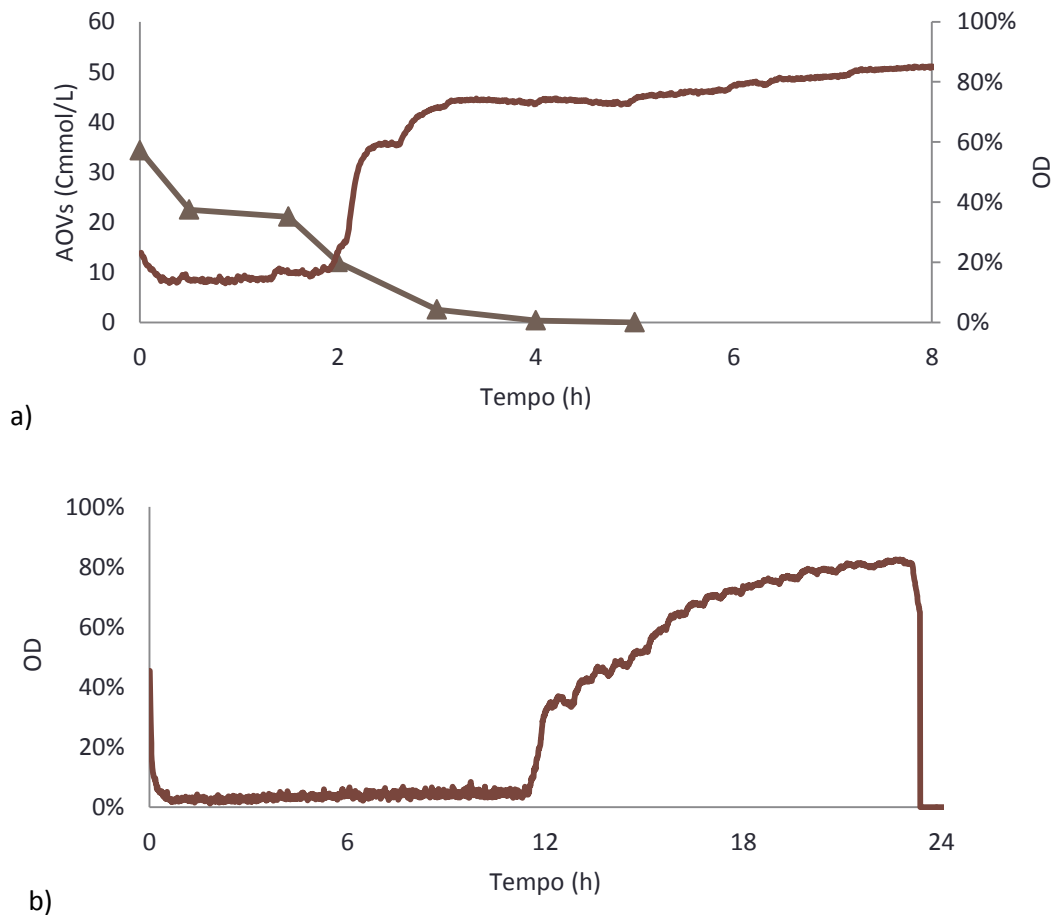
Os ácidos orgânicos voláteis com número par de carbonos (acético e butírico) predominaram na composição dos substratos (figura 9). Em todas as condições ensaiadas os AOVs foram a principal fonte de carbono, com exceção da condição 4, em que os AOVs corresponderam apenas a 40% da carga orgânica aplicada.

A concentração de amônia e AOVs na alimentação foi definida em função do rácio C/N pretendido. A diminuição do rácio C/N da condição 3 para a condição 4 deveu-se a uma diminuição no teor de AOVs no substrato utilizado. Da condição 4 para a condição 5 aumentou-se a concentração de amônia na alimentação. Análises do TOC e TN permitiram a confirmação dos valores deste rácio (tabela 10).



#### 4.1.2. Condições de Fome/Fartura

O objetivo inicial para o enriquecimento da CM foi aplicar condições de fome/fartura no meio, de modo a criar vantagens competitivas aos microrganismos acumuladores de PHA. Para verificar se tais condições estavam sendo geradas analisaram-se os perfis de oxigênio dissolvido nos SBRs assim como os consumos de TOC e AOVs ao longo de um ciclo (figura 10).



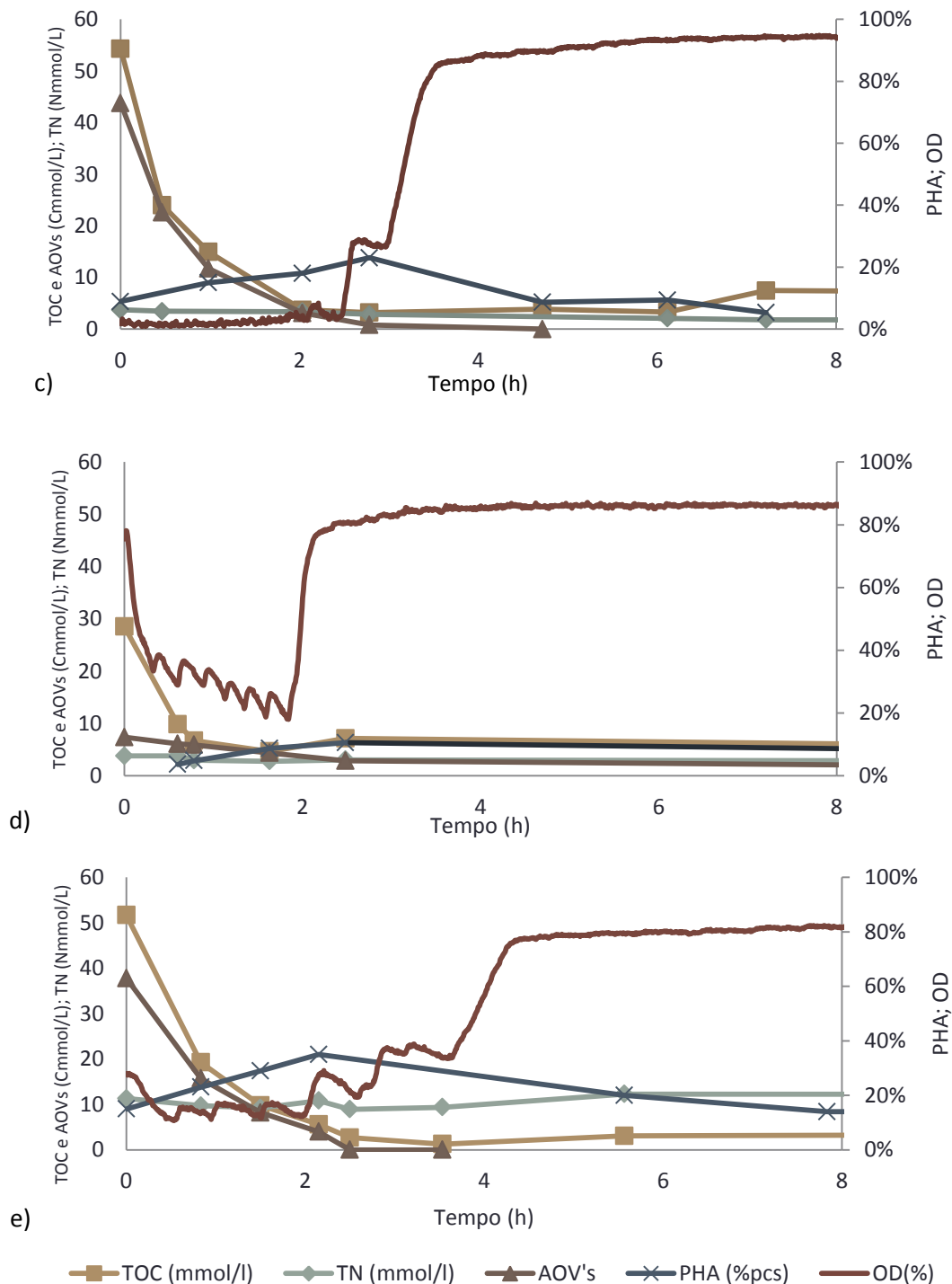


Figura 10 Análise dos Ciclos SBR1 a), SBR2 b), SBR 3 c), SBR 4 d) e SBR 5 e)

\*No SBR 1 a) apenas foram analisados os perfis de AOV's OD. No SBR2 apenas foi analisado o perfil de OD

A figura 10 descreve os consumos de TOC, TN e AOV's bem como a percentagem de armazenamento de PHA e o oxigénio dissolvido ao longo das

condições analisadas (na condição 1 apenas foram analisados o perfil de AOVs e o perfil de OD e na condição 2 apenas foi analisado o perfil de OD).

Pela análise dos perfis de oxigênio dissolvido (OD) é possível identificar duas fases distintas. A primeira fase, onde se observam os valores de OD mais baixos, e uma segunda fase onde OD sobe para percentagens perto dos 100%. Na primeira fase o oxigênio dissolvido aproxima-se de zero (13%, 1,9%, 3,4%, 22% e 11% para as condições 1, 2, 3, 4 e 5 respetivamente) significando que este estaria a ser utilizado como aceitador final de eletrões na degradação da matéria orgânica presente. As análises posteriores de TOC e AOVs confirmaram o mesmo. Durante a primeira fase houve um consumo rápido do substrato (cerca de 90% do TOC presente no início do ciclo foi consumido nesta fase e a totalidade dos AOVs nas condições 3 e 5 – figura 10 c) e e)), tratando-se portanto da fase de fartura. Após a exaustão do substrato, os valores de OD regressaram rapidamente aos valores próximos do ponto de saturação, correspondendo à fase de fome. Nesta fase não houve consumo de AOVs (condições 1, 3 e 5), ou este foi em quantidades mais reduzidas (condição 4).

No SBR 2 (figura 10 b), embora não tenham sido analisados os consumos de TOC e TN, por extrapolação dos perfis de oxigênio pode-se concluir que as mesmas condições de fome e fartura tenham sido criadas no reator.

No SBR 1 (10 a), 70% dos AOVs foram consumidos nas duas primeiras horas e 100% ao fim de 5 horas. No SBR 3 (figura 9 c) os AOVs foram consumidos na sua totalidade ao fim de 3 horas. No SBR 5 (figura 9 e) estes foram num período idêntico (2 horas e 30 minutos)

No SBR 4 (figura 10 d) os AOVs não foram consumidos na sua totalidade durante a fase de fartura, e a taxa de consumo foi significativamente menor em relação ao SBR 1, 3 e 5. Na tabela 10 verifica-se que foram consumidos 2,8 Cmmol AOVs/h no SBR 4, 6,86 no SBR1, 15,6 no SBR 3 e 9,22 no SBR 5. Comparando os valores de TOC e AOVs verifica-se que estes não foram a principal fonte de carbono na alimentação correspondendo a cerca de 40% em base CQO (figura 9) o que sugere que outros compostos tais como açúcares e proteínas tenham também sido consumidos. A percentagem de PHA armazenada foi a mais baixa registada, com cerca de 11% molPHA/molSSV (Tabela 10). O enriquecimento desta cultura demonstrou não ter sido o mais eficiente comparativamente com as restantes

condições. Possivelmente as proteínas e açúcares contribuíram para a produção de glicogênio em vez de PHAs, outro biopolímero (polissacarídeo) utilizado também como carbono de reserva para as necessidades celulares.

**Tabela 11** Taxas de consumo de TOC e TN para as condições 3, 4 e 5

	<b>SBR 3</b>	<b>SBR 4</b>	<b>SBR 5</b>
<b>TOC consumido (% Cmol)*</b>	93%	83%	97%
<b>-r<sub>TOC</sub> fase fartura (Cmmol/L.h)</b>	8,3	14,6	14,3
<b>TN consumido (% Nmol)</b>	57%	34%	21%**
<b>-r<sub>TN</sub> fase fartura (Nmmol/L.h)</b>	0,19	0,22	0,96

\*O carbono total consumido excluindo o teor que surgiu após a fase de fartura

\*\*Este valor corresponde apenas ao consumo na fase de fartura. Na fase de fome ocorreu um aumento de azoto

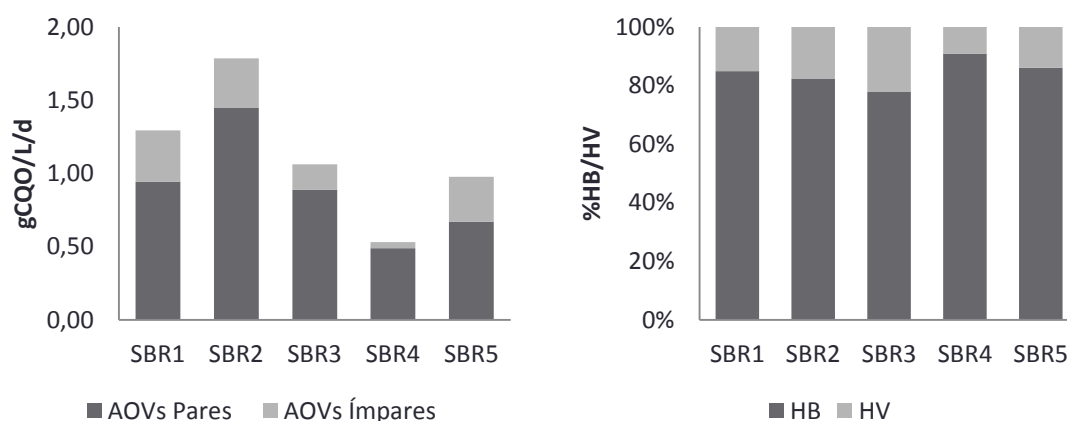
O carbono orgânico presente no meio nunca foi consumido na totalidade em nenhum dos SBRs (tabela 11 - 93%, 83% e 97% do TOC inicial (Cmol). Adicionalmente observou-se um aumento de TOC após o final da fase de fartura (figura 10 - 7h, 2h30 e 5h30 nas condições 3, 4 e 5 respectivamente), sendo que no SBR 3 a fase de fartura terminou às 2h30, no SBR 4 às 2h e no SBR 5 às 4h sensivelmente. O aumento de TOC poderá ser explicado com a passagem de alguma matéria orgânica que se encontrava suspensa para o estado solúvel. Esta matéria orgânica poderá ter tido origem na lise celular dos microrganismos que não têm capacidade de armazenar polímero. Nenhum fenômeno semelhante foi encontrado na literatura. Mesmo com aumento de carbono externo disponível, o consumo deste ao longo da fase de fome foi residual para os SBRs 3 e 5 (tabela 11 - 0,08 e 0,001 Cmmol/L.h respectivamente). No SBR 4 a taxa de consumo de TOC foi um pouco maior (0.2 Cmmol/L.h) e a de AOVs menor (2,6 Cmmol/L.h), comparativamente com as restantes condições, provavelmente por haver 60% de material na alimentação que não era AOVs.

Relativamente ao consumo de azoto, uma análise mais detalhada é feito no subcapítulo 4.1.5.

#### 4.1.3. Efeito do teor e composição de AOVs na alimentação

O teor de AOVs na alimentação utilizada no enriquecimento da CM em microrganismos acumuladores de PHA é de elevada importância já que são estes os compostos que permitem os microrganismos armazenarem o carbono sob a forma de PHA e não em glicogénio (Albuquerque *et al.*, 2010). Se o teor de AOVs for baixo significa que outros compostos como proteínas e açúcares estarão presentes na alimentação podendo estes serem usados ou para o crescimento ou permitindo que outros microrganismos não acumuladores de PHA sejam igualmente selecionados, ambos fenómenos indesejados. A composição de AOVs também desempenha um importante papel no enriquecimento das CM sobretudo na constituição do tipo de polímero produzido (Serafim *et al.*, 2008). A presença de AOVs com número ímpar de carbonos permitirá uma produção de monómeros HV possibilitando a formação do copolímero PHB-HV (Pardelha *et al.*, 2012).

O estudo deste parâmetro foi feito em função do efluente acidificado disponível e não como parâmetro de controlo.



**Figura 11** Correspondência do teor de AOVs com o armazenamento de PHA e composição de polímero

Em todas as condições a concentração de AOVs com número par de carbonos (ácido acético e butírico) foi sempre superior à concentração de AOVs com número ímpar (ácido propiónico e valérico) o que conduziu a uma maior capacidade de armazenamento do monómero HB (figura 11). Os ácidos com número par de carbonos deram origem ao Acetil-CoA que serve de precursor à produção de HB. Os ácidos com número ímpar de carbono puderam ser convertidos a Acetil-CoA ou a Propionil-CoA, este último servindo de precursor ao monómero HV.

No SBR 1 obteve-se a maior taxa de armazenamento de polímero (53% molPHA/molSSV), conforme descrito na tabela 10. Nesta condição obteve-se um copolímero com fração molar HB:HV de 81:19.

No SBR 2 embora a quantidade de AOVs introduzida no reator tenha sido superior, houve uma perda na capacidade de armazenamento de PHA devido à elevada carga orgânica aplicada. O aumento da produção volumétrica de PHA não se verificou exatamente por esta condição ter conduzido a uma seleção ineficiente da cultura.

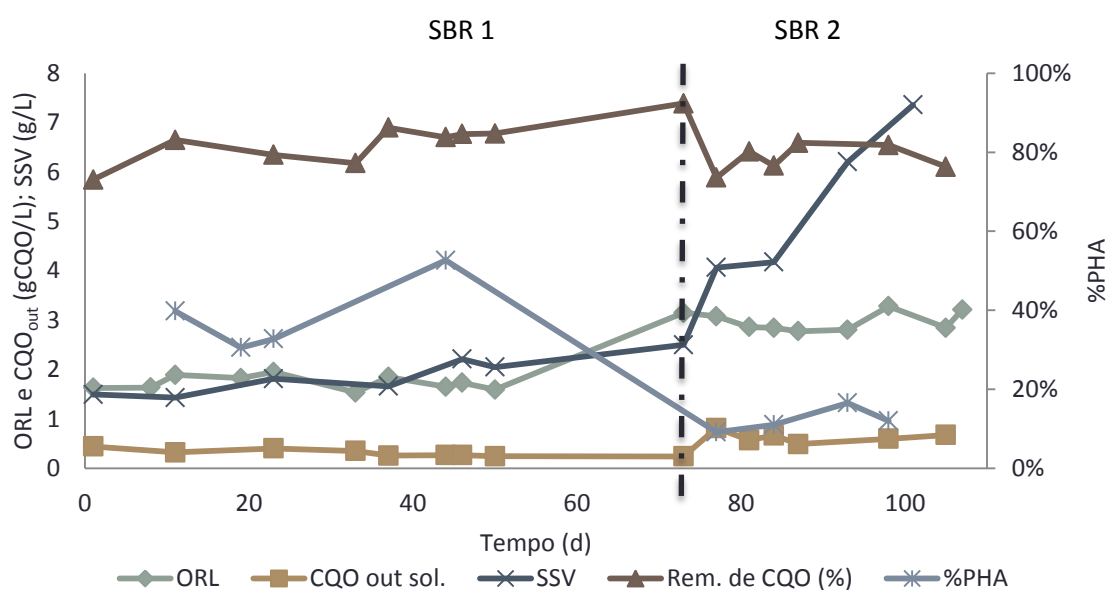
No SBR 3 obteve-se o armazenamento de um copolímero com maior teor de HV na fração molar (77-23 de HB-HV), embora o substrato que lhe tenha dado origem não tivesse o maior teor de ácidos ímpares. Diferentes microrganismos, com maior capacidade de síntese e armazenamento do monômero HV poderão ter sido selecionados já que as lamas utilizadas na inoculação deste reator (ETAR Prio) tiveram uma origem diferente das lamas utilizadas no SBR 1 (ETAR Norte da SIMRIA)

O substrato acidificado utilizado na condição 4 teve um teor de AOVs significativamente mais baixo que os restantes (figura 9). O teor de ácidos, associado à carga orgânica aplicada (e conseqüentemente à quantidade de ácidos introduzida no reator) afetou sobretudo a capacidade total de armazenamento de PHAs. Comparativamente com os reatores que operaram com cargas orgânicas semelhantes (condições 1, 3, e 5) o armazenamento das culturas foi menor (11% ao contrário de 53%, 26% e 35% molPHA/molSSV respetivamente). Nesta condição os AOVs não foram a principal fonte de carbono ao longo do processo de seleção da CM o que não conduziu a um enriquecimento eficiente em microrganismos acumuladores de PHAs. No ciclo completo, os ácidos foram consumidos a uma taxa menor (2,6 Cmmol/L.h) que nas restantes condições (6,86 – 16,6 Cmmol/L.h) de acordo com a tabela 10. Comparativamente com o TOC, outros compostos terão também sido usados pelos microrganismos.

#### 4.1.4. Efeito da carga orgânica

As condições do SBR 1 (Tabela 10, ORL –  $1,7 \pm 0,1$  gCQO/L/d) foram tidas como condição base. Nestas condições o SBR1 teve um comportamento estável (figura 12, esquerda) sobretudo a partir do dia 35, altura em que atingiu o máximo de remoção de CQO (85%).

Amostras para quantificação de PHA foram retiradas no final da fase de fatura (de acordo com o perfil de oxigénio). Foi atingido um máximo de 53% de PHA com uma composição molar HB:HV de 83:17.



**Figura 12** Evolução do SBR 1 e SBR 2 ao longo dos dias. À esquerda da linha a tracejado o SBR operou a um ORL de  $1,7$  gCQO/L/d (condição 1) e à direita a um ORL de  $3,0$  gCQO/L/d (condição 2)

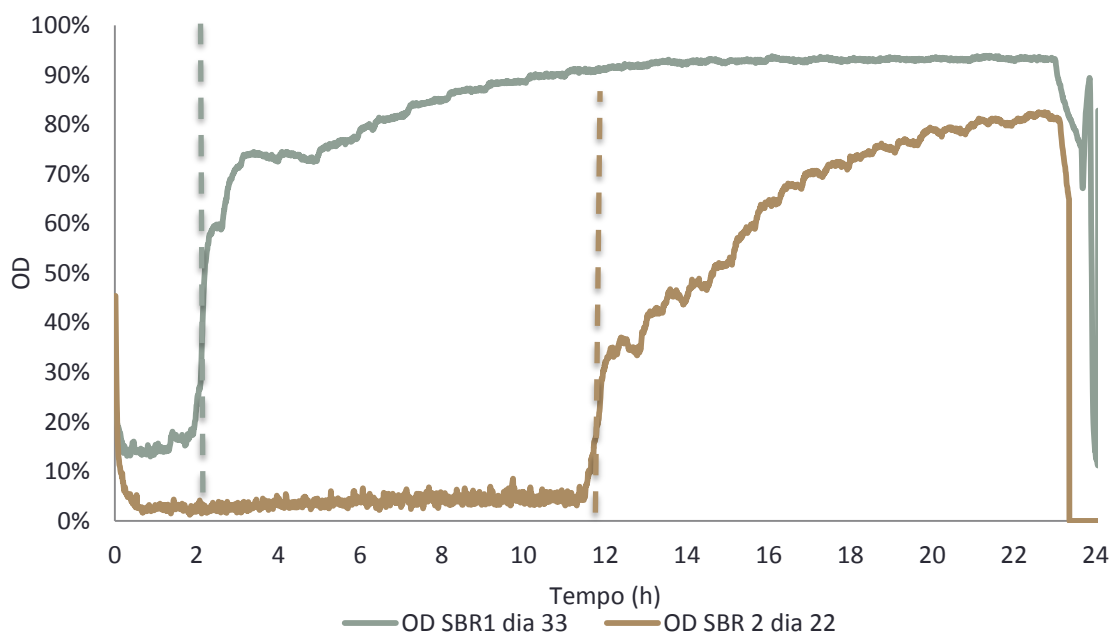
As CM selecionadas no SBR 1 foram sujeitas posteriormente a um aumento da carga orgânica, tendo esta sido elevada para  $3,0 \pm 0,2$  gCQO/L/d (figura 12, direita). O aumento da carga orgânica foi induzido aumentando a concentração de substrato na alimentação (Dionisi *et al.*, 2006).

O primeiro efeito observado causado pelo aumento deste parâmetro o decréscimo da remoção de CQO. Fenómenos descritos por Dionisi *et al.* (2006) foram igualmente observados, embora as cargas orgânicas aplicadas pelo autor tenham sido significativamente maiores ( $8,5$ – $31,25$  gCQO/L/d). Observou-se um aumento significativo da biomassa (de  $2,5$  para  $7,5$  gSSV/L), tendo inclusivamente

impossibilitado o normal funcionamento do reator com a formação de agregados de biomassa com baixas características de sedimentação. A constituição destes agregados espessos de biomassa sugere que estariam a ser selecionadas bactérias filamentosas ou a formação de exopolíssacarídeos (EPS). Já que o substrato estava a ser usado para crescimento, observou-se, como esperado, um decréscimo na acumulação de polímero, tendo este correspondido a um máximo de 23% (molPHA/molSSV). De facto observou-se igualmente um aumento significativo na duração da fase de fartura o que terá reduzido a seletividade dos microrganismos produtores de PHA.

### ***Efeito da carga orgânica no rácio F/F***

O aumento da carga orgânica induziu um aumento significativo na duração da fase de fartura a que os microrganismos estiveram sujeitos (figura 13). Foram tidos em conta os perfis de oxigénio para analisar a duração das fases de fome e fartura.



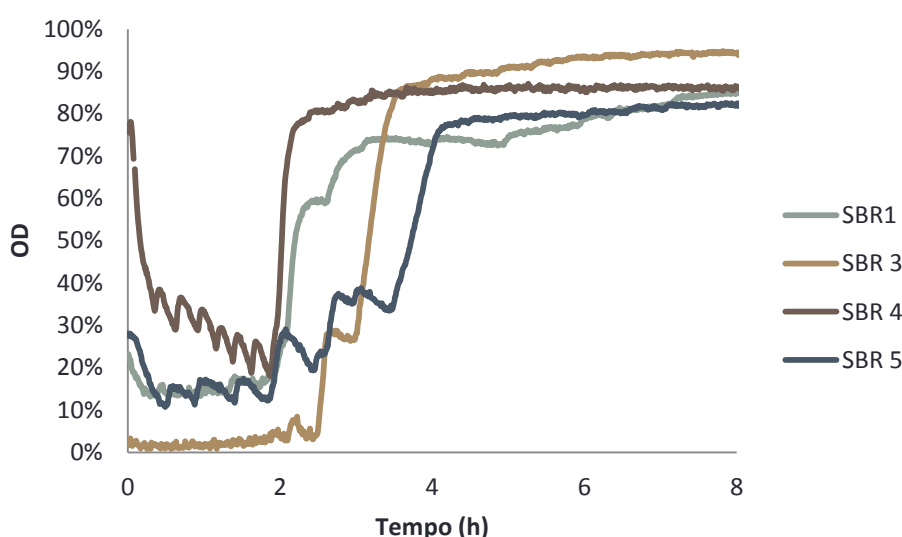
**Figura 13** Comparação da duração da fase de fartura para os SBR 1 e 2. As fases de fartura correspondem ao período de tempo até à linha tracejada

A duração da fase de fartura após 30 dias de operação no SBR1 foi de  $2\text{h} \pm 15$  min o que correspondeu a um rácio de F/F de 0,09. NO SBR 2 e para um ORL de  $3,0 \pm 0,2$  gCQO/L/d a fase de fartura foi significativamente maior (10 vezes superior), chegando a atingir 12 horas, o que corresponde um rácio de F/F de 1. Um período de



fatura tão extenso como o que foi observado para o SBR 2 demonstrou não ser eficiente no enriquecimento da cultura mista, indo de encontro ao constatado por diversos autores na literatura (Dionisi *et al.*, 2006; Albuquerque *et al.*, 2010). Um rácio F/F tão elevado possibilita a sobrevivência de microrganismos com menor capacidade de armazenamento já que são sujeitos a um período de fome mais curto e favorece o crescimento biológico, explicando assim a diminuição na capacidade de armazenamento de PHA por parte da CM (Dionisi *et al.*, 2006). Dionisi *et al.* (2006) afirmou ainda que, para evitar a seleção de microrganismos com um rápido crescimento, o rácio de F/F deverá ser sempre inferior a 0,25.

Dado que a na carga orgânica de 3,0 gCQO/L/d o SBR se tornou inoperável, optou-se por utilizar cargas mais próximas da condição do SBR 1 nos ensaios seguintes (SBR 3, 4 e 5).



**Figura 14** Comparação da duração da fase de fatura para os SBR 1, 3, 4 e 5

A pequena redução da carga orgânica da condição 3 em relação à da 1 não parece ter tido influência significativa. Verificou-se que o rácio F/F aumentou de 0,09 para 0,16 quando comparado com o SBR 1, o que traduz num aumento de 1 hora e 30 minutos na fase de fatura, contrariando a tendência verificada anteriormente. Este efeito não estará relacionado com a redução da carga orgânica mas com o facto de os SBR 1 e 3 terem sido inoculados com lamas de origens diferentes sendo uma proveniente da ETAR Norte da SIMRIA (SBR 1) e outra proveniente da ETEI Prio (SBR

3). Os microrganismos presentes no SBR1 poderiam ter uma velocidade menor de degradação da matéria orgânica explicando assim o aumento da fase de fartura para este caso.

#### 4.1.5. Efeito do rácio C/N

O rácio de carbono/azoto no a aplicar no início de cada ciclo do SBR é um importante parâmetro de controlo, permitindo modificar as condições de crescimento da CM. Sendo o azoto um elemento determinante no crescimento microbiológico, a limitação deste poderá fazer com que os microrganismos utilizem o substrato preferencialmente para armazenamento de polímero em deterioramento do crescimento. No entanto, em meios limitados em azoto, a competição entre os microrganismos seria feita à base deste elemento e não no carbono fazendo com que o armazenamento de carbono deixasse de ser uma vantagem competitiva (Johnson et al., 2010).

A proporção de carbono para azoto na alimentação foi avaliada nos SBR 3, 4 e 5 em que foram aplicados rácios C/N de 14, 7,6 e 5. A diminuição do C/N na condição 4 deveu-se a uma diminuição da matéria orgânica na alimentação e na condição 5 foi concretizada com o aumento da concentração de amónia adicionada à alimentação.

Pela figura 15 é possível fazer uma análise mais detalhada ao consumo de azoto e carbono ao longo de um ciclo para os SBR 3, 4 e 5. Em todas as condições houve consumo de azoto, sobretudo na fase de fartura (tabela 11). No teor considerado estava englobado o azoto proveniente da amónia adicionada e outros compostos não contabilizados, como as proteínas. A análise deste parâmetro será feita considerando que a amónia representava a maior percentagem de azoto total.

Na figura 14 é possível observar que houve consumo de azoto em todas as condições. 57%, 34% e 21% de azoto total foram removidos nos SBR 3, 4 e 5 respetivamente (tabela 11). Este consumo deu-se sobretudo na fase de fartura. Na condição 3 (figura 14 a) parece ter havido um consumo de azoto também durante a fase de fome, mesmo que tenha ocorrido nas primeiras horas após o final da fase de fartura. Este consumo parece ter ocorrido na ausência de consumo de carbono externo. De facto, o valor de carbono orgânico total solúvel no meio aumentou, possivelmente com a passagem de material suspenso ao estado solúvel. Caso o

consumo de azoto durante a fase de fome tenha ocorrido sem consumo da fonte de carbono externo pode significar que foram os microrganismos produtores de PHA a consumir o azoto para crescimento celular e que tenham substituído o substrato pelas suas reservas de carbono (PHA intracelular). O mesmo fenómeno foi descrito por Albuquerque *et al.* (2009).

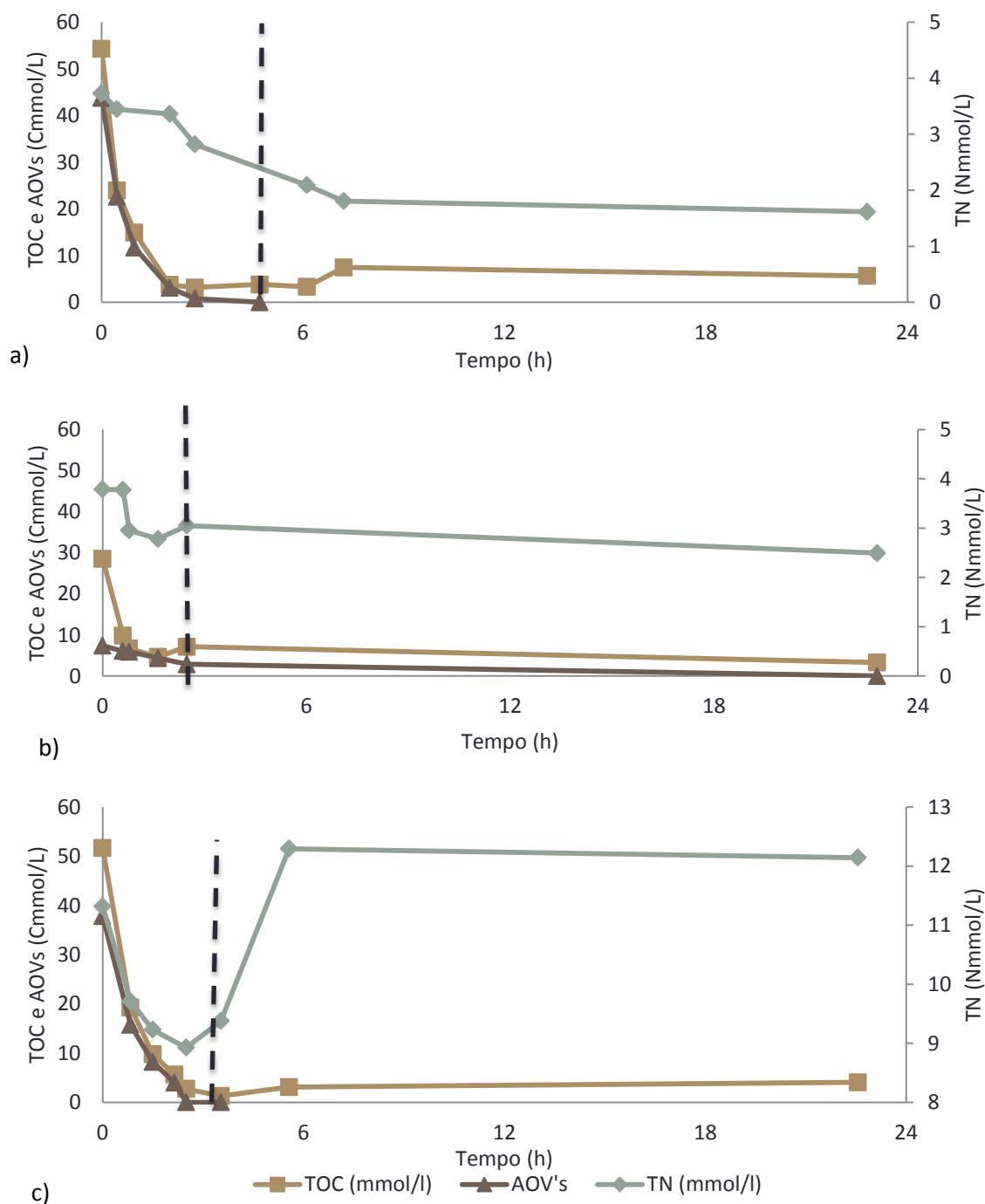


Figura 15 TOC e TN ao longo de um ciclo nas condições 3, 4 e 5 (a, b e c respetivamente). A linha a tracejado indica o final da fase de fartura

Na condição 4 (figura 15 b), observou-se que houve um ligeiro consumo de carbono externo ao longo da fase de fome, a par do consumo de azoto (0,2 Cmol/L.h). Esta condição não era expectável e não vantagens competitivas dos microrganismos produtores de PHA podem ter sido comprometidas, já que outros poderão ter usado o carbono externo para sobreviver à fase de fome.

Na condição 5 (figura 15c) impôs-se um teor de amónia superior às restantes condições (C/N= 5 em base molar). Neste SBR a cultura esteve fortemente limitada em carbono, no entanto o consumo de azoto foi menor do que nas condições 3 e 4. Uma explicação para o azoto não ter sido consumido em maior quantidade nesta condição poderá dever-se ao facto de o teor de tioureia na alimentação não ter sido devidamente ajustado para o aumento da concentração de amónia, tendo ocorrido nitrificação.

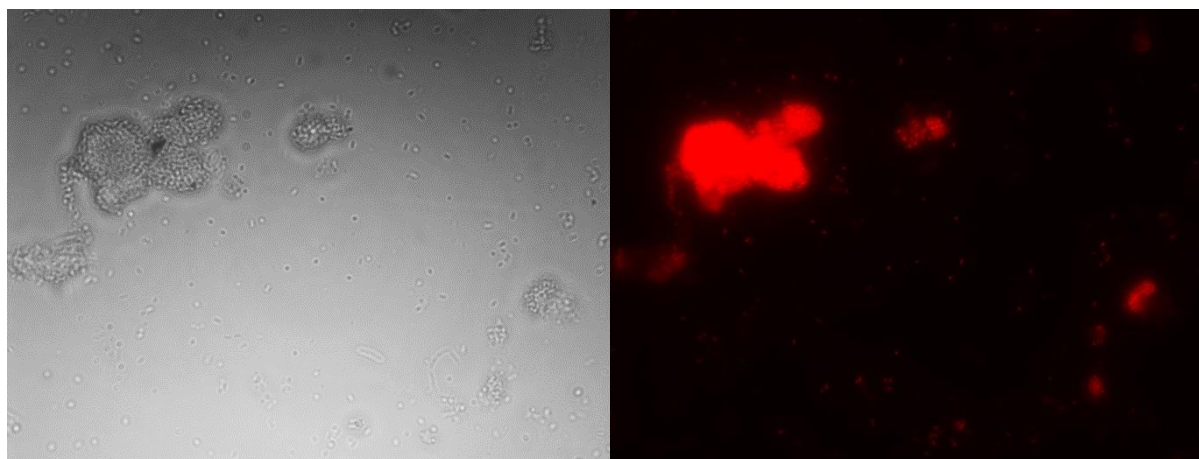
Em todas as condições houve uma maior remoção de carbono orgânico do que de azoto e nas condições 3 e 5 a principal fonte de carbono foi consumida na sua totalidade durante a fase de fartura. As culturas estiveram portanto claramente limitadas em carbono, o que fez com que os microrganismos competissem pela fonte de carbono, efeito favorável ao enriquecimento da CM em microrganismos acumuladores de PHA (Johnson *et al.*, 2010).

Desta forma os rácios C/N aplicados parecem não ter tido uma influência determinante na capacidade de armazenamento da cultura, já que todas estiveram com excesso de azoto. Não se observou nenhuma tendência na capacidade de armazenamento em função da diminuição do C/N. Os diferentes valores de %PHA terão sido influenciados por outros parâmetros, nomeadamente o teor de AOVs.

Quando o rácio C/N foi definido para 5 verificou-se que o teor de polímero armazenado foi superior quando o rácio foi 14.

#### 4.1.6. Observação da cultura mista enriquecida ao microscópio ótico (com coloração de azul de Nilo)

A observação da cultura mista enriquecida ao microscópio permitiu a confirmação de acumulação de polímero in vivo. A amostra foi retirada no final da fase de fartura do SBR 5.



Observação em campo claro  
Ampliação 1000x

Observação com coloração azul nilo  
Ampliação 1000x

**Figura 16** Observação da cultura enriquecida em campo claro e com coloração azul de Nilo

O Azul de Nilo é um método mais específico e sensível de visualização de grânulos de PHA através da detecção da resposta de fluorescência que aumenta com o aumento da concentração de PHA e portanto pode ser usado para avaliar a variação da quantidade acumulada de PHA durante experiências de acumulação anaeróbias/aeróbias (Hui 2005).

Pela análise da figura 16 é possível observar os microrganismos em observação em campo claro. Com a sobreposição da imagem com coloração azul de Nilo é possível verificar a fluorescência dos grânulos no interior dos microrganismos (apenas as zonas a vermelho correspondem a grânulos de polímero).

## 4.2. Ensaios Batch de Acumulação de Polímero

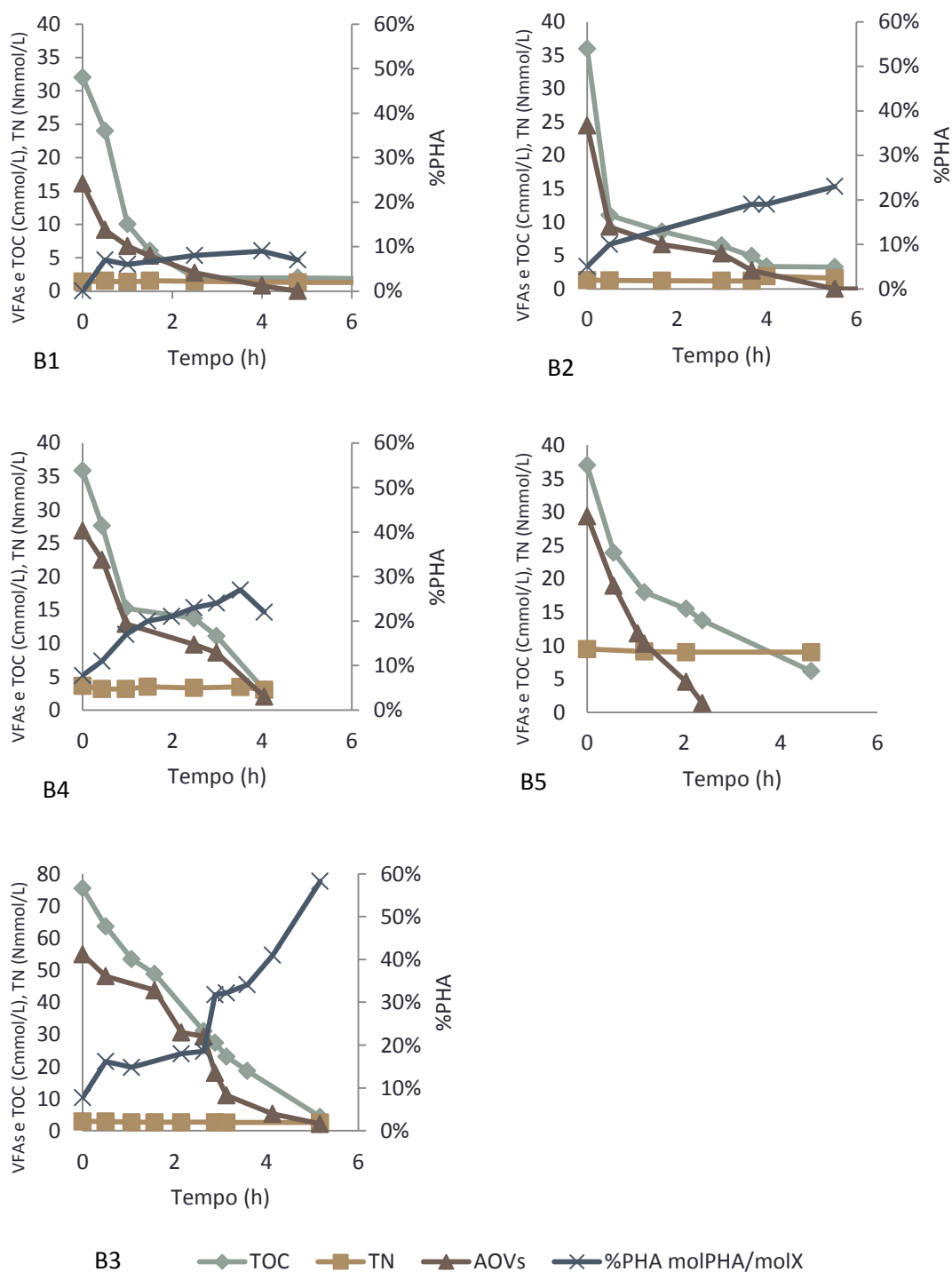
Foram realizados ensaios batch utilizando as CM enriquecidas nas condições 3, 4 e 5 (SBR3, 4 e 5). Nestes ensaios foram aplicadas diferentes cargas orgânicas e teores de AOVs (Tabela 12). Foram também ensaiados um batch com controlo de pH (B4) e um batch em que as proteínas presentes no soro acidificado foram precipitadas (B5). Através dos ensaios batch foi possível também analisar os efeitos que resultam das diferentes condições aplicadas a culturas provenientes do mesmo enriquecimento.

**Tabela 12** Resultados Gerais dos 5 ensaios Batch

Condições aplicadas						Resultados		
Nome	Inoculação	ORL (gCQO/L)	%AOV <sub>sin</sub> (base CQO)	SSV (g/L)	Outras condições	% PHA máx (molPHA/molSSV)	y <sub>PHA</sub> (Cmol/Cmol)	-r <sub>AOVs</sub> (Cmmol AOVs/h)
B1	SBR4	1,5	40%	3,08		9	0,31	3,15
B2	SBR3	1,5	71%	2,17		23	0,59	5,3
B3	SBR3	3	73%	2,15		58	0,62	4,42
B4	SBR3	1,5	73%	2,35	pH=9	27	0.84	6,01
B5	SBR5	1,5	88%	2,4	Substrato s/proteína	n.d	n.d	13,02

n.d. Não definido. Por razões de logística não foi possível quantificar o teor de polímero armazenado e produzido no batch 5 até à data de entrega da dissertação

O objetivo da terceira fase foi a acumulação de PHA. Neste ponto de vista é necessário analisar o rendimento de produção do polímero em função dos AOVs consumidos. Amostras de AOVs e de PHA foram retiradas ao longo da operação dos reatores e os teores foram convertidos a Cmmol/L.



**Figura 17** Perfis de TOC, TN, AOVs e %PHA para os batch 1, 2, 3, 4 e 5 (B1, B2, B3, B4 E B5 respetivamente)

O batch 1 foi ensaiado como teste das culturas enriquecidas na condição 4. Tendo-se verificado baixos valores de armazenamento de PHA ao longo da operação do SBR 4, teve-se a intenção de verificar se teria havido algum tipo de seleção

microbiana neste reator. As condições aplicadas ao batch 1 foram idênticas à fase de enriquecimento no SBR 4, não tendo sido adicionada amónia.

Com a cultura enriquecida no SBR 3 foi ensaiado um primeiro batch com condições idênticas às da operação do SBR3 (Tabela 12 B2). Seguidamente foi testado um batch com uma carga orgânica superior (B3), utilizando culturas do mesmo enriquecimento e finalmente dois batch, um com controlo de pH (B4) e outro com soro acidificado e proteínas precipitadas (B5). O batch 5 foi já ensaiado com a cultura enriquecida no SBR 5.

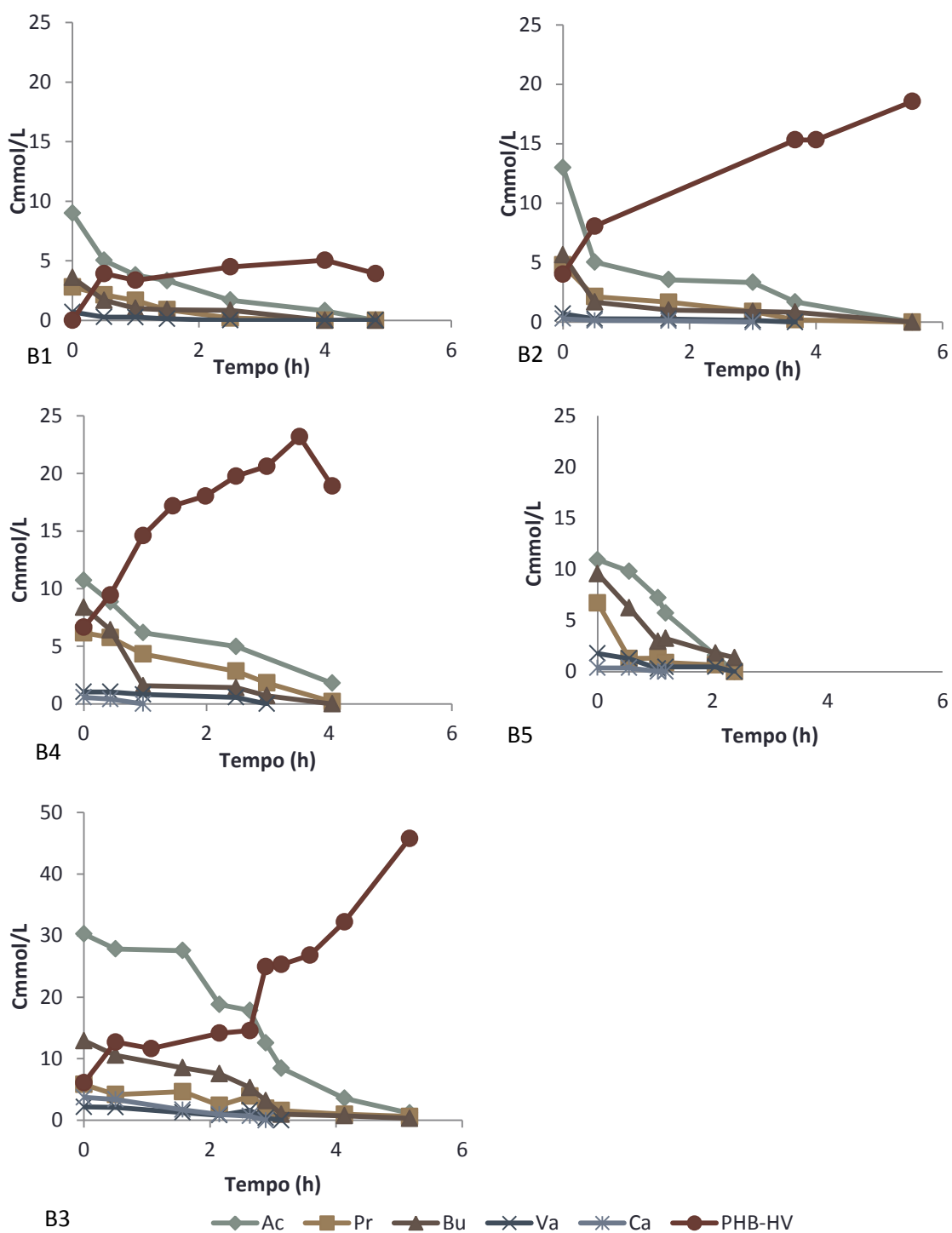
Todos os ensaios batch foram realizados sem adição de amónia. O azoto presente nos reatores proveio do final do ciclo do SBR que veio juntamente com as lamas purgadas e esteve apenas em concentrações residuais. O consumo deste elemento foi residual em todas as condições (7%, 15%, 14%, 16% e 5% respetivamente do azoto total inicial, em base Nm<sub>ol</sub>)

Pode-se afirmar que o meio se encontrava fortemente limitado em azoto conduzindo a uma limitação do crescimento biológico. Este efeito foi benéfico para a fase de produção de polímero permitindo que o substrato consumido fosse maioritariamente para acumulação de PHA.

#### 4.2.1. Teor e composição de AOVs na alimentação

O teor e a composição de AOVs presentes na alimentação desempenharam um papel determinante na fase de acumulação já que são estes os únicos compostos convertidos em PHAs.





**Figura 18** Consumo específica do de AOVs ao longo dos 5 ensaios batch e moles de carbono do copolímero produzidos

Pela figura 18 é possível verificar que foi no batch 3 (ensaio com carga orgânica mais elevada) que se deu uma maior produção do copolímero (45,79

Cmmol/L de PHB-HV). Neste ensaio batch, como a quantidade de ácidos introduzido no reator foi a mais elevada devido ao aumento da carga orgânica era expectável que houve um aumento da produção volumétrica do polímero.

Em todos os ensaios batch realizados predominaram os ácidos com número par de carbonos (ácido acético e butírico), tendo-se verificado uma produção superior do monómero HB (tabela 13).

**Tabela 13** Produção do copolímero PHB-HV e respetivas frações molares

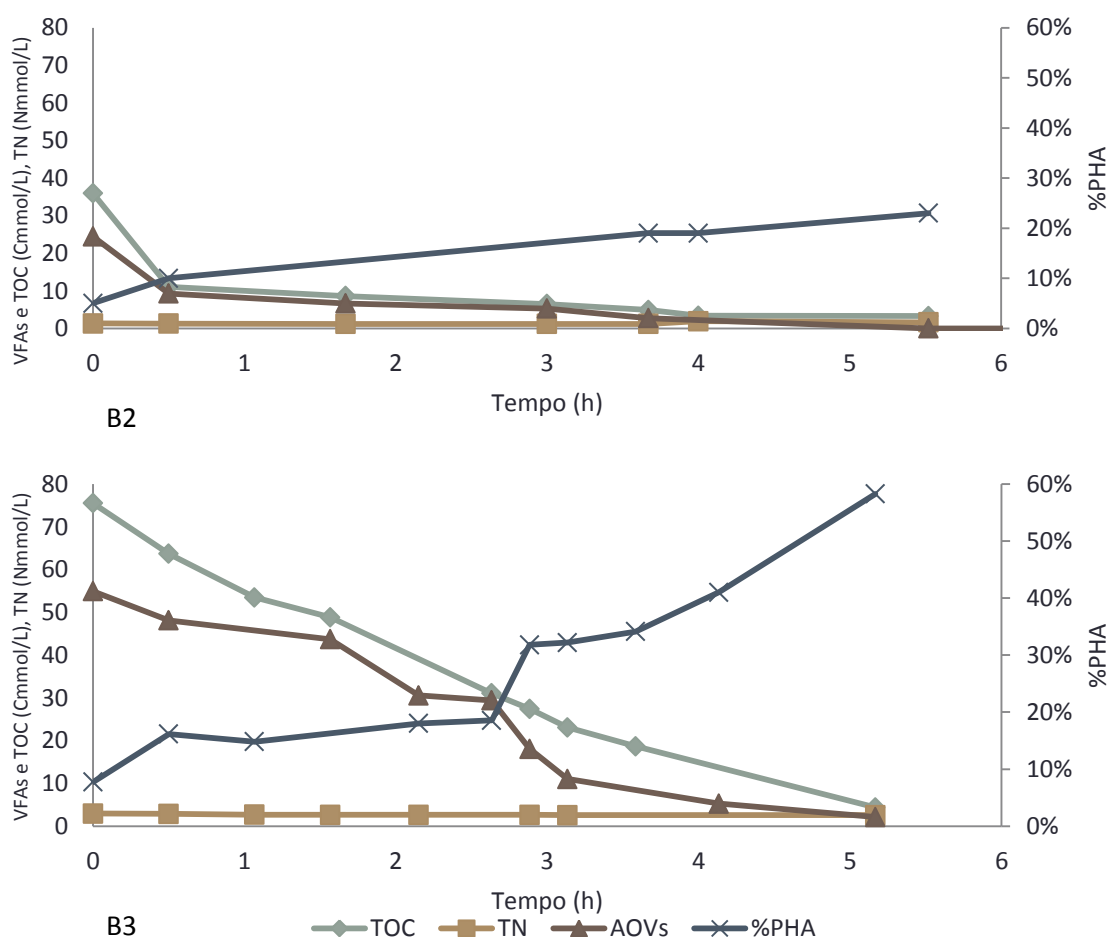
	PHB-HV (Cmmol/L)	%HB	%HV
<b>B1</b>	5,05	85%	15%
<b>B2</b>	18,54	80%	20%
<b>B3</b>	45,79	79%	21%
<b>B4</b>	23,19	88%	12%

O batch 1 foi operado com a concentração mais baixa de AOVs (16 Cmmol AOVs/L) o que se traduziu numa menor produção de polímero, atingindo um máximo de 5,05 Cmmol PHA/L. Novamente os microrganismos apresentaram uma baixa acumulação de polímero (Tabela 12 – 9% molPHA/molSSV). A conversão de AOVs a polímero também foi reduzida quando comparada com os restantes batch (Tabela 12 - 0,31 CmolPHA/CmolAOVs). A própria cultura (SBR4) não tinha sido eficientemente enriquecida o que explica a baixa taxa de conversão de ácidos a polímeros.

Nos restantes batch a taxa de conversão foi significativamente elevada, o que demonstrou que as culturas foram eficientemente enriquecidas em microrganismos produtores de polímero (Tabela 12 – 0,59 0,62, 0,84 CmolPHA/CmolAOVs). As taxas de acumulação não foram as mais elevadas comparativamente com a literatura. Johnson *et al.* (2009), com ácidos puros, obteve taxas de acumulação na ordem dos 80% molPHA/molSSV Albuquerque *et al.* (2011), com uma mistura heterogénea de AOVs provenientes da acidificação de um efluente industrial, obteve resultados na ordem dos 60% molPHA/molSSV. Os baixos teores observados de acumulação de polímero nos batch, comparativamente com aqueles encontrados na bibliografia, podem ser explicados pela baixa fração de AOVs para a quantidade de microrganismos presentes. A análise do efeito da carga orgânica permitiu constatar isso mesmo.

#### 4.2.2. Efeito da carga orgânica

A análise do efeito da carga orgânica foi feita através dos ensaios Batch 2 e 3. As culturas provenientes da mesma seleção (SBR 3) foram sujeitas a uma carga orgânica de 1,5 e 3,1 gCQO/L (35 e 75 Cmmol/L) respetivamente, do mesmo efluente acidificado.



**Figura 19** Comparação dos batch 2 e 3 para da análise da influência do aumento do ORL

O batch 2 decorreu sensivelmente da mesma forma que um ciclo do SBR3. A carga orgânica aplicada foi igual à da seleção da cultura. Foi atingido uma acumulação máxima de 23% (molPHA/molSSV) o que correspondeu a uma produção de 18,54 CmmolPHA/L.

No batch 3, a cultura foi sujeita a uma carga orgânica superior àquela que tinha sido induzida na fase de enriquecimento. Pela figura 19 é possível observar que na primeira meia hora o consumo do substrato foi mais lento comparativamente com

o batch 2 ( $-r_{AOVs\ B2} = 30,2$  Cmmol/L.h e  $-r_{AOVs\ B3} = 13,7$  Cmmol/L.h). A concentração de substrato era mais elevada e a própria cultura não estava adaptada a esta nova condição. O aumento da concentração de substrato permitiu a obtenção do maior teor de PHA acumulado observado em todo o trabalho, 58% molPHA/molSSV (Tabela 12). Como a proporção de ácidos foi maior para um mesmo teor de biomassa (comparativamente com o Batch 2, tabela 12), foi espectável que tal acontecesse. A produção volumétrica do copolímero PHB-HV foi de 45,79 CmmolPHA/L que teve uma fração molar dos monómeros HB/HV de 79%-21% (tabela 13).

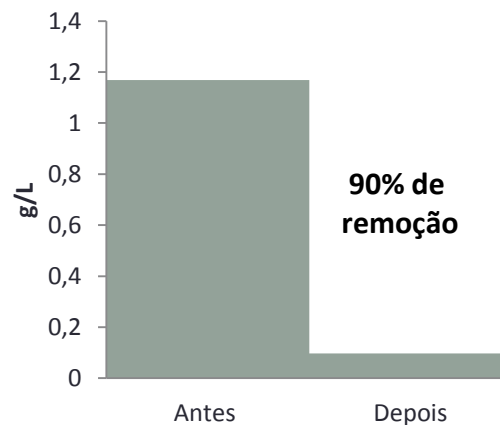
#### 4.2.3. Efeito do controlo de pH

No Batch 4 o ensaio foi realizado num meio alcalino, com o pH a ser ajustado para 9, através da injeção de hidróxido de sódio. Durante a fase de acumulação e com os AOVs a serem consumidos, foi injetado periodicamente ácido clorídrico por forma a manter o pH igual a 9. Villano *et al.* (2010) verificaram que o aumento do pH da fase de enriquecimento para a fase de acumulação (a CM foi selecionada a um pH de 8) permitiu um aumento do teor de PHA produzido bem como um aumento no rendimento na conversão de AOVs para PHA. Obteve os melhores resultados (46% PHA (gPHA/gSSV) e 0,43 Cmmol PHA/Cmmol AOVs) para o batch realizado a pH 9,5 com uma cultura selecionada a 8,5.

O batch 4 com o controlo de pH a 9 teve um aumento no teor de PHA produzido comparativamente com o batch 2 tendo-se obtido 27% e 23% CmolPHA/CmolSSV máximo acumulado respetivamente (tabela 12) embora pouco significativo. Em termos de rendimento de polímero produzido por AOVs consumido, o resultado foi significativamente melhor (0,84 e 0,59 CmmolPHA/CmmolAOVs para o batch 4 e 2 respetivamente). O batch 2 decorreu sem controlo de pH sendo que as lamas foram aclimatizadas a um pH de 8, igual à condição de operação do SBR. O consumo de AOVs no batch 4 numa fase inicial foi inferior ao registado no batch 2 devido a necessidade de adaptação da cultura à nova condição. Na primeira hora o batch 4 verificou-se uma taxa de consumo de AOVs de 0,027 e no Batch 2 de 0,329 (Cmmol AOVs/h).

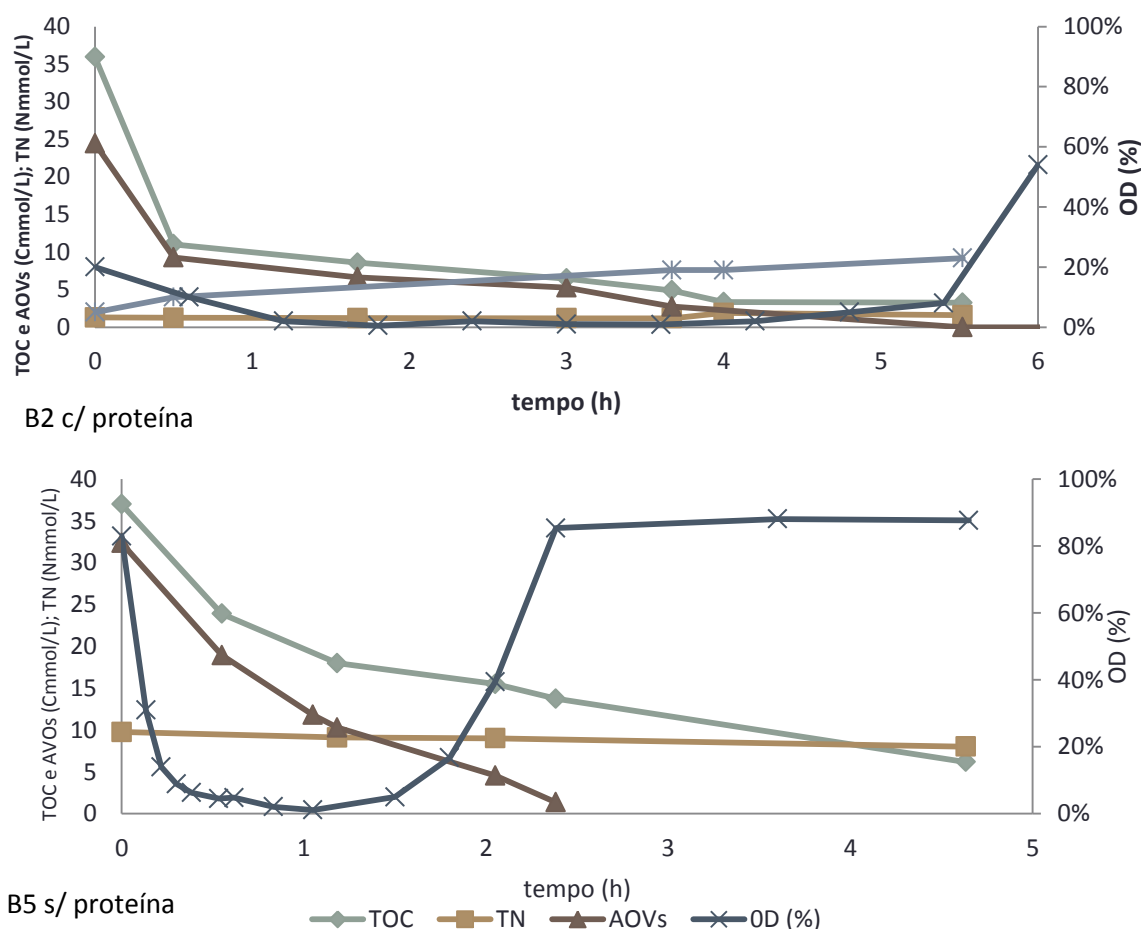
#### 4.2.4. Ensaio de precipitação de proteínas

Para a realização do batch 5 optou-se por aplicar condições semelhantes ao batch 2 mas retirando as proteínas do substrato. As proteínas são compostos que teoricamente podem influenciar o metabolismo celular levando à produção de outro tipo de polímeros, nomeadamente glicogénio, que não especificamente o PHA (Albuquerque, 2009). Sendo compostos azotados, as proteínas também podem ser usadas para crescimento celular, em deterioramento da acumulação de polímero. Foi realizado o ensaio para tentar comprovar o mesmo.



**Figura 20** Teor de Proteínas antes e depois da precipitação

Pelo método biureto foi avaliado o teor de proteínas antes e depois da precipitação (figura 20). Observou-se que 1,1 g/L de proteínas foram precipitadas o que correspondeu a uma remoção de 90%. A precipitação de proteínas não comprometeu a presença dos AOVs no substrato. Desta forma a percentagem dos AOVs no substrato total foi consideravelmente superior aos restantes batch obtendo-se 88% do TOC correspondente a AOVs (tabela 12).



**Figura 21** Comparação dos perfis de TOC, TN, AOVs e %OD do batch 2 com proteínas (ORL:1,5 gCQO/L e 77%AOVs<sub>in</sub>) com batch 5 sem proteínas (ORL: 1,5 gCQO/L e 88% AOVs<sub>in</sub>)

Não foram quantificados os teores de PHA por problemas de logística até à data de entrega da dissertação, já que o cromatógrafo estava a ser utilizado para quantificação de AOVs.

A figura 21 permite a comparação dos Batch 2 e 5. Estes reatores funcionaram em condições em tudo semelhantes exceto no facto das proteínas, presentes na alimentação do batch 5, terem sido precipitadas e removidas.

Na análise desta figura é possível verificar que os AOVs foram consumidos na sua totalidade mais rapidamente que o batch 2, com  $-r_{AOVs_{B5}} = 13,06$  Cmmol AOVs/h e  $-r_{AOVs_{B3}} = 4,42$  CmmolAOVs/h (tabela 12,). Sendo a fração de AOVs do carbono orgânico total presente superior aos restantes batch (88% do TOC correspondia a AOVs contra os 40%, 70%, 73% e 73% dos batch 1,2,3 e 4 respetivamente), seria espectável que tal acontecesse. Contudo o consumo de AOVs na primeira meia hora

foi mais acentuado no batch 2 do que no batch 3. Este fenómeno pode ter ocorrido devido a uma melhor adaptação da cultura do batch 2 à alimentação proporcionada, que era idêntica à utilizada na etapa de enriquecimento ( 73% e 75% de AOVs presentes na alimentação respetivamente).

Neste batch esteve também presente um elevado teor de azoto total, proveniente da purga das lamas efetuada no final do ciclo do SBR 5. Não foi adicionada amónia ao reator descontínuo. Verificou-se que este teor de azoto não foi consumido durante a operação do batch. Tal acontecimento sugere que o azoto estaria sob a forma de compostos que os microrganismos não eram capazes de degradar. Uma hipótese para este caso é que tenha ocorrido nitrificação da amónia durante o enriquecimento desta cultura no reator SBR.

Pela análise dos dados analisados é possível que tenha havido uma melhoria na produção do polímero para o ensaio B5. Uma maior percentagem de AOVs na alimentação e a remoção de um composto quem podem ser utilizados pelos microrganismos para crescimento celular em deterioramento da produção de PHA traduzir-se-á num aumento da produção do polímero. No entanto tal não pode ser confirmado sem a quantificação do teor de polímero na biomassa.

A análise do perfil de oxigénio dissolvido neste ensaio batch permite enaltecer outras observações. Tendo em conta que a acumulação máxima de PHA no Batch 2 e nos SBRs realizados ocorre quando os valores de oxigénio dissolvido atingem valores próximos do máximo de saturação (100%), é expectável que o mesmo aconteça no Batch 5. Neste ensaio, conjugando o facto de que a mudança da fase de fartura para a fase de fome se deu cerca de 3 horas antes do Batch 2, de acordo com o perfil de oxigénio (figura 21), e que o final do consumo de AOVs coincidiu com a mudança de fases indica que o máximo de PHA acumulado tenha sido atingido mais rapidamente do que no batch 2.

Desta forma, a remoção das proteínas da alimentação permitiu que a produção de PHA se desse a uma maior velocidade, fazendo com que o máximo de PHA acumulado fosse atingido mais rapidamente, comparativamente com o Batch 2.





## 5. Conclusões

Durante a operação dos reatores SBRs foram aplicadas condições de modo a testar a influência de alguns parâmetros no enriquecimento das culturas mistas: a carga orgânica, o teor de ácidos orgânicos voláteis na alimentação e o rácio C/N.

Na perspetiva de tratamento de efluentes, todas as condições operadas permitiram remoções superiores a 80% de CQO, o que é bastante satisfatório.

No ponto de vista de produção de PHA concluiu-se que nas condições SBR 1, 3 e 5, onde foram aplicadas as cargas orgânicas de 1,7; 1,4 e 1,4 gCQO/L/d respetivamente, utilizados substratos com teor de ácidos superiores a 60% em base CQO e rácios C/N de 14 (SBR 1 e 3) e 5 (SBR 5), obteve-se um enriquecimento das CM em microrganismos produtores e acumuladores de PHA. Verificou-se que nestas condições se obteve 53%, 26% e 35% molPHA/molSSV, valores estes que se aproximam aos encontrados na literatura, para condições semelhantes. Ao longo da operação destes reatores verificou-se que a capacidade de armazenamento de polímero aumentou, o que demonstra que as condições aplicadas foram propícias a um enriquecimento em microrganismos acumuladores de PHA.

No ensaio de enriquecimento de culturas em que foi aplicada uma carga orgânica de 3,0 gCQO/L/d à cultura selecionada a uma carga orgânica de 1,7 gCQO/L/d, verificou-se uma perda da capacidade de acumulação de PHA, de 53% para os 17% molPHA/molSSV. Este ORL, que fez com que o rácio F/F fosse cerca de 10 vezes superior ao verificado na condição anterior demonstrou ter sido desadequado para um enriquecimento eficiente da cultura. Nestas condições os microrganismos consumiram o substrato para crescimento em deterioramento da acumulação, tornando inclusive o reator inoperável. As cargas orgânicas de 1,7 e 1,4 gCQO/L/d demonstraram terem sido adequadas para um enriquecimento da CM.

No SBR 4 quando foram aplicadas os seguintes parâmetros: ORL de 1,4 gCQO/L; teor de AOVs na alimentação de 40% em base CQO; rácio C/N de 7,6 obteve-se os piores resultados de acumulação de PHA no SBR, com apenas 11% do peso da biomassa a corresponder a PHA (molPHA/molSSV). Quando testada na etapa de acumulação em batch, verificou-se igualmente um baixo teor de polímero acumulado (9% molPHA/molSSV) e uma baixa conversão de AOVs em polímero (0,31 CmolPHA/CmolAOV). Esta cultura terá sempre usado a fonte de carbono

preferencialmente para outros metabolismos celulares que não a produção de PHA ou para crescimento. O baixo teor de ácidos nesta condição parece ter sido determinante para o insucesso no enriquecimento desta cultura.

De uma forma geral as alimentações com teor de ácidos superiores a 69% foram adequadas ao enriquecimento da cultura mista.

Relativamente às condições de C/N aplicadas nos diferentes SBRs estas conduziram sempre a um meio limitado em azoto. Os efeitos que os diferentes rácios produziram na capacidade dos microrganismos armazenarem polímero não foram evidentes. Não se observou uma tendência clara na produção de PHAs quando se reduziu o rácio C/N de 14 para 7,6 e para 5, tendo-se verificado teores acumulação de polímero de 26%, 11% e 35% molPHA/molSSV. Os diferentes teores de polímero acumulado nas condições 3, 4 e 5 terão estado mais relacionados com os diferentes teores de AOVs na alimentação utilizada e não concretamente com o rácio C/N.

Os ensaios batch permitiram confirmar que o enriquecimento da CM da condição 3 tinha sido eficiente, permitindo atingir uma taxa de acumulação máxima de 58% molPHA/molSSV, e um rendimento de conversão de 0,84 CmolPHA/CmolAOVs. Foi possível atingir a taxa de acumulação 58% molPHA/molSSV quando se impôs uma carga orgânica de 3,0 gCQO/L, tendo a cultura sido selecionada a um ORL de 1,4 gCQO/L.. O aumento da carga orgânica permitiu uma produção volúmica de PHAs de 45,79 CmolPHA/L, bastante superior aos restantes batch que atingiram um máximo de 23,19 CmmolPHA/L. Este fenómeno era espectável visto que tinha sido introduzida uma quantidade superior de AOVs no reator.

Embora as frações de polímero produzido por massa de microrganismos não tenha sido muito elevadas comparativamente com a literatura (Dionisi *et al.*, 2004; Johnson *et al.*, 2010; Mato *et al.*, 2010; Albuquerque *et al.*, 2011), o rendimento de conversão de AOVs para polímero bastante positivo, chegando a atingir 0,84 CmolPHA/CmolAOVs, quando se induziu um pH de 9,5, valor este superior ao pH imposto no SBR (8). Este fenómeno que já havia sido verificado na literatura estará relacionado com a capacidade de adaptação da cultura à nova condição mais desfavorável, optando por uma maior acumulação de polímero em deterioramento do crescimento.

A precipitação das proteínas também sugeriu trazer benefícios ao processo de produção de PHA, sobretudo na velocidade de produção do copolímero. Embora não tenham sido quantificados os teores de PHAs, a análise dos consumos de AOVs do perfil de oxigénio, sugere que o máximo de polímero acumulado tenha sido atingido 3 horas mais cedo que no Batch 2, que o atingiu 5 horas e 40 minutos após o início de operação do reator.

### **5.1. Perspetivas Futuras**

Neste trabalho ficou demonstrado o potencial do sistema de produção de PHAs em 3 etapas utilizando culturas mistas. O soro de queijo demonstrou ser uma fonte de carbono viável à produção de ácidos orgânicos voláteis com vista a produção de PHAs. Através do soro de queijo acidificado foi possível a obtenção de culturas enriquecidas em microrganismos produtores de PHA bem como a produção do biopolímero. No entanto são necessários mais estudos para determinar as condições ideais. Foi verificado que a produção e acumulação de PHA está fortemente dependente do teor de ácidos usados no substrato, e conseqüentemente do rendimento de produção destes compostos na 1ª etapa de acidificação. É portanto necessário determinar quais as condições ideais de operação dos reatores MBBR e/ou CSTR da fase de acidificação, para que sejam produzidos substratos com o máximo teor de ácidos possível. Para rentabilização das etapas de enriquecimento e acumulação seria interessante analisar com mais detalhe a influência que outros compostos presentes no soro acidificado, nomeadamente proteínas e açúcares têm, e caso se verifique um efeito inibitório evidente proceder à sua remoção se possível. Seria interessante analisar outros parâmetros, como por exemplo a influência da temperatura. Neste trabalho as 2ª e 3ª etapas decorreram à temperatura ambiente, sendo que o controlo deste parâmetro possa otimizar os processos. Seria igualmente interessante testar rácios C/N superiores aqueles utilizados no enriquecimento das culturas. Os rácios utilizados fizeram com que no meio o azoto estivesse sempre em excesso e não foram testados rácios que conduzissem a meios em que o azoto estivesse presente como elemento limitante.

Por fim é necessário conduzir testes de extração de polímero, sendo a sua importância evidente. O próprio estudo deste procedimento já decorre no projeto “Polibio”.

Do ponto de vista económico, parece evidente que o sistema tem um potencial elevado para a sua introdução no mercado industrial, podendo no futuro substituir os processos atuais de produção de PHAs e quiçá a substituição dos plásticos de origem petroquímica. No entanto será sempre necessário realizar um balanço económico ao sistema e as suas vantagens e desvantagens.

## 6. Bibliografia

- Ahn, W. S., S. J. Park and S. Y. Lee (2000). "Production of poly(3-hydroxybutyrate) by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli* with a highly concentrated whey solution." Applied and Environmental Microbiology **66**(8): 3624-3627.
- Albuquerque, M. G. E. (2009). Production of polyhydroxyalkanoates (PHA) from sugar cane molasses by mixed microbial cultures. Doutorado, Universidade Nova de Lisboa.
- Albuquerque, M. G. E., M. Eiroa, C. Torres, B. R. Nunes and M. A. M. Reis (2007). "Strategies for the development of a side stream process for polyhydroxyalkanoate (PHA) production from sugar cane molasses." Journal of Biotechnology **130**(4): 411-421.
- Albuquerque, M. G. E., V. Martino, E. Pollet, L. Averous and M. A. M. Reis (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): 66-76.
- Albuquerque, M. G. E., C. A. V. Torres and M. A. M. Reis (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): 3419-3433.
- Álvarez-Chávez, C. R., S. Edwards, R. Moure-Eraso and K. Geiser (2012). "Sustainability of bio-based plastics: general comparative analysis and recommendations for improvement." Journal of Cleaner Production **23**(1): 47-56.
- Bengtsson, S., A. Werker, M. Christensson and T. Welander (2008). "Production of polyhydroxyalkanoates by activated sludge treating a paper mill wastewater." Bioresource Technology **99**(3): 509-516.
- Bioplastics, E. (2013). "<http://en.european-bioplastics.org/bioplastics/>." Retrieved 19-09-2013, 2013, from <http://en.european-bioplastics.org/bioplastics/>.
- Braunegg, G., G. Lefebvre and K. F. Genser (1998). "Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects." Journal of Biotechnology **65**(2-3): 127-161.
- Byrom, D. (1987). "Polymer synthesis by microorganisms: technology and economics." Trends in Biotechnology **5**(9): 246-250.
- Chanprateep, S. (2010). "Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates." Journal of Bioscience and Bioengineering **110**(6): 621-632.
- Chemists, A. A. o. C. (1972). Standard methods of clinical chemistry, Academic Press.
- Chen, G.-Q. (2009). "A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry." Chemical Society Reviews **38**(8): 2434-2446.
- Chen, G.-Q. (2010). Plastics Completely Synthesized by Bacteria: Polyhydroxyalkanoates. Plastics from Bacteria. G. G.-Q. Chen, Springer Berlin Heidelberg. **14**: 17-37.
- Coats, E. R., F. J. Loge, W. A. Smith, D. N. Thompson and M. P. Wolcott (2007). "Functional stability of a mixed microbial consortium producing PHA from waste carbon sources." Applied Biochemistry and Biotechnology **137**: 909-925.
- Crank, M., F. Marscheider-Weidemann and F.-I. f. S. u. I. Karlsruhe (2004). Techno-economic Feasibility of Large-scale Production of Bio-based Polymers in Europe: (PRO-BIP); Final Report, Prepared for the Europeans Commission's Institute for Prospective Technological Studies (IPTS), Sevilla, Spain, Fraunhofer-Institut für Systemtechnik und Innovationsforschung.
- Dias, J. M. L., P. C. Lemos, L. S. Serafim, C. Oliveira, M. Eiroa, M. G. E. Albuquerque, A. M. Ramos, R. Oliveira and M. A. M. Reis (2006). "Recent advances in polyhydroxyalkanoate

- production by mixed aerobic cultures: From the substrate to the final product." Macromolecular Bioscience **6**(11): 885-906.
- Dionisi, D., G. Carucci, M. P. Papini, C. Riccardi, M. Majone and F. Carrasco (2005). "Olive oil mill effluents as a feedstock for production of biodegradable polymers." Water Research **39**(10): 2076-2084.
- Dionisi, D., M. Majone, V. Papa and M. Beccari (2004). "Biodegradable polymers from organic acids by using activated sludge enriched by aerobic periodic feeding." Biotechnology and Bioengineering **85**(6): 569-579.
- Dionisi, D., M. Majone, G. Vallini, S. Di Gregorio and M. Beccari (2006). "Effect of the applied organic load rate on biodegradable polymer production by mixed microbial cultures in a sequencing batch reactor." Biotechnology and Bioengineering **93**(1): 76-88.
- Dircks, K., J. J. Beun, M. van Loosdrecht, J. J. Heijnen and M. Henze (2001). "Glycogen metabolism in aerobic mixed cultures." Biotechnology and Bioengineering **73**(2): 85-94.
- Eaton, A. D., M. A. H. Franson, A. P. H. Association, A. W. W. Association and W. E. Federation (2005). Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater, American Public Health Association.
- Elnashar, M. (2011). Biotechnology of Biopolymers, InTech.
- Feng, L. D., T. Watanabe, Y. Wang, T. Kichise, T. Fukuchi, G. Q. Chen, Y. Doi and Y. Inoue (2002). "Studies on comonomer compositional distribution of bacterial poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate)s and thermal characteristics of their fractions." Biomacromolecules **3**(5): 1071-1077.
- Harper, C. A. (2000). Modern Plastics Handbook, McGraw-Hill.
- Holmes, P. A., Lim, G.B. (1984). Separation process. European Patent No. 145,233.
- Jarpa, M., G. Pozo, R. Baeza, M. Martinez and G. Vidal (2012). "Polyhydroxyalkanoate biosynthesis from paper mill wastewater treated by a moving bed biofilm reactor." Journal of Environmental Science and Health Part a-Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering **47**(13): 2052-2059.
- Johnson, K., Y. Jiang, R. Kleerebezem, G. Muyzer and M. C. M. van Loosdrecht (2009). "Enrichment of a Mixed Bacterial Culture with a High Polyhydroxyalkanoate Storage Capacity." Biomacromolecules **10**(4): 670-676.
- Johnson, K., R. Kleerebezem and M. C. M. van Loosdrecht (2010). "Influence of the C/N ratio on the performance of polyhydroxybutyrate (PHB) producing sequencing batch reactors at short SRTs." Water Research **44**(7): 2141-2152.
- Johnson, K., J. van Geest, R. Kleerebezem and M. C. M. van Loosdrecht (2010). "Short- and long-term temperature effects on aerobic polyhydroxybutyrate producing mixed cultures." Water Research **44**(6): 1689-1700.
- Kessler, B., R. Weusthuis, B. Witholt and G. Eggink (2001). "Production of microbial polyesters: Fermentation and downstream processes." Biopolyesters **71**: 159-182.
- Krishna, C. and M. C. M. Van Loosdrecht (1999). "Effect of temperature on storage polymers and settleability of activated sludge." Water Research **33**(10): 2374-2382.
- Lee, S. Y. (1996). "Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria." Trends in Biotechnology **14**(11): 431-438.
- Loo, C. Y., W. H. Lee, T. Tsuge, Y. Doi and K. Sudesh (2005). "Biosynthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from palm oil products in a *Wautersia eutropha* mutant." Biotechnology Letters **27**(18): 1405-1410.
- Mato, T., M. Ben, C. Kennes and M. C. Veiga (2010). "Valuable product production from wood mill effluents." Water Science and Technology **62**(10): 2294-2300.
- Morgan-Sagastume, F., S. Pratt, A. Karlsson, D. Cirne, P. Lant and A. Werker (2011). "Production of volatile fatty acids by fermentation of waste activated sludge pre-treated in full-scale thermal hydrolysis plants." Bioresource Technology **102**(3): 3089-3097.

- Ostle, A. G. and J. G. Holt (1982). "Nile Blue-A As a fluorescent stain for Poly-beta-Hidroxybutirato." Applied and Environmental Microbiology **44**(1): 238-241.
- Pardelha, F., M. G. E. Albuquerque, M. A. M. Reis, J. M. L. Dias and R. Oliveira (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): 336-345.
- PekaSys. (2012). from <http://www.pekasys.com/products/bubbler/what-is-sbr>.
- Prieto, M. A. (2007). "From Oil to Bioplastics, a Dream Come True?" Journal of Bacteriology **189**(2): 289-290.
- Seidel, A. (2008). Characterization and Analysis of Polymers, Wiley.
- Serafim, L. S., P. C. Lemos, M. G. E. Albuquerque and M. A. M. Reis (2008). "Strategies for PHA production by mixed cultures and renewable waste materials." Applied Microbiology and Biotechnology **81**(4): 615-628.
- Serafim, L. S., P. C. Lemos, R. Oliveira and M. A. M. Reis (2004). "Optimization of polyhydroxybutyrate production by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding conditions." Biotechnology and Bioengineering **87**(2): 145-160.
- Stein, R. S. (1992). "Polymer Recycling - Opportunities and Limitations." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **89**(3): 835-838.
- Sudesh, K., H. Abe and Y. Doi (2000). "Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters." Progress in Polymer Science **25**(10): 1503-1555.
- Suriyamongkol, P., R. Weselake, S. Narine, M. Moloney and S. Shah (2007). "Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants — A review." Biotechnology Advances **25**(2): 148-175.
- Third, K. A., M. Newland and R. Cord-Ruwisch (2003). "The effect of dissolved oxygen on PHB accumulation in activated sludge cultures." Biotechnology and Bioengineering **82**(2): 238-250.
- van Loosdrecht, M. C. M., M. A. Pot and J. J. Heijnen (1997). "Importance of bacterial storage polymers in bioprocesses." Water Science and Technology **35**(1): 41-47.
- Villano, M., M. Beccari, D. Dionisi, S. Lampis, A. Miccheli, G. Vallini and M. Majone (2010). "Effect of pH on the production of bacterial polyhydroxyalkanoates by mixed cultures enriched under periodic feeding." Process Biochemistry **45**(5): 714-723.
- Villano, M., S. Lampis, F. Valentino, G. Vallini, M. Majone and M. Beccari (2010). Effect of hydraulic and organic loads in Sequencing Batch Reactor on microbial ecology of activated sludge and storage of polyhydroxyalkanoates. Ibic2010: 2nd International Conference on Industrial Biotechnology. E. Bardone and A. Viglia. **20**: 187-192.
- Wang, F. L. and S. Y. Lee (1997). "Poly(3-hydroxybutyrate) production with high productivity and high polymer content by a fed-batch culture of *Alcaligenes latus* under nitrogen limitation." Applied and Environmental Microbiology **63**(9): 3703-3706.
- Williamson, D. H. and J. F. Wilkinson (1958). "The isolation and estimation of the poly-beta-hydroxybutyrate inclusions of *Bacillus* species." Journal of general microbiology **19**(1): 198-209.
- Zhang, X. J., R. C. Luo, Z. Wang, Y. Deng and G. Q. Chen (2009). "Application of (R)-3-Hydroxyalkanoate Methyl Esters Derived from Microbial Polyhydroxyalkanoates as Novel Biofuels." Biomacromolecules **10**(4): 707-711.
- Zhu, S. C., Z. L. Xu, H. J. Meng, J. Zhou and H. Chen (2012). "Effect of magnetic field on the accumulation of polyhydroxyalkanoates (PHAs) by microorganism in activated sludge." Bioprocess and Biosystems Engineering **35**(6): 985-991.