



Emanuel Ferreira Moreira

Licenciado em Bioquímica

**Estudos de mecanismos associados à acumulação de P
em culturas puras e mistas**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Biotecnologia

Orientador: Doutora Gilda Carvalho, Investigadora Principal, Faculdade de
Ciências e Tecnologias, Universidade Nova de Lisboa

Co-orientador: Doutora Filomena Feitas, Investigadora Principal, Faculdade
de Ciências e Tecnologias, Universidade Nova de Lisboa



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro 2017

Emanuel Ferreira Moreira

Licenciado em Bioquímica

**Estudos de mecanismos associados à acumulação de P
em culturas puras e mistas**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Biotecnologia

Orientador: Doutora Gilda Carvalho, Investigadora Principal, Faculdade de
Ciências e Tecnologias, Universidade Nova de Lisboa

Co-orientador: Doutora Filomena Feitas, Investigadora Principal, Faculdade
de Ciências e Tecnologias, Universidade Nova de Lisboa

Setembro 2017

Emanuel Ferreira Moreira, FCT-UNL, UNL

Os direitos de cópia da dissertação **Estudos de mecanismos associados à acumulação de P em culturas puras e mistas** pertencem ao autor, à Faculdade de Ciência e Tecnologias e à Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologias e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Gostaria desde já gratificar a minha orientadora, Dr. Gilda Carvalho, assim com a minha co-orientadora, Dr. Filomena Freitas, por toda a ajuda, suporte e esclarecimento ao longo do desenvolvimento desta tese. Não poderia de deixar de agradecer, ao Dr. Ricardo Marques, pelo apoio que deu, assim como pelos esclarecimentos e ensinamentos.

Um especial agradecimento a todo o grupo BioEng pela forma como me receberam e ajudaram, sem esquecer o pessoal do Lab. 606/608.

Por fim gostaria de agradecer à minha família, que de certo modo ajudou na realização deste trabalho. Assim como, aos grandes amigos que a faculdade me proporcionou!

Abstract

Biological P (phosphorus) removal from wastewater is performed in alternated anaerobic/aerobic conditions (enhanced biological phosphorus removal, EBPR) by polyphosphate accumulating organisms (PAO). The most known PAO, *Accumulibacter*, stores polyhydroxyalkanoates (PHA) anaerobically, which are used for growth and P storage in the aerobic phase.

Cupriavidus necator, an organism with great PHA storage capacity, was investigated by its potential to store also P. It was subjected to EBPR conditions and several parameters were adjusted, such as C (carbon) source, nutrients concentrations. However, it was not possible to stimulate growth and/or polymer storage in anaerobic or microaerophilic conditions. Fully aerobic conditions were then tested, adding pulses of C or N (nitrogen) (fed-batch), which favored cellular growth and stimulated the accumulation of PHA and some P. Both mechanisms were probably a response of *C. necator* to resource limiting conditions (N).

Other PHA storing organisms were also tested: *Cupriavidus necator*, *Pseudomonas oleovorans*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas resinovorans* *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas chlororaphis*. The two latter bacteria were also tested in bioreactor, showing also that N availability influences the relationship between accumulation of PHA and P content in the biomass of these two organisms.

This thesis also investigated the P accumulation mechanism in another group of PAOs that is still not fully understood: the *Tetrasphaera*-PAOs. They were enriched by imposing EBPR conditions and a specific feed of casein hydrolysate. In a batch experiment fed with a mixture of 22 amino acids, 54.5% of C were removed, with preference for the following: proline, lysine, glycine, tyrosine, arginine and cysteine. In other experiments performed with casein hydrolysate and real wastewater, the culture presented good C and P removal performance (53-55% of C and attaining levels of 10-16% of P in TSS), showing the essential role of these PAOs in full scale EBPR systems.

Keywords: *C. necator*, physiology of storage of P and PHA, *Tetrasphaera*-PAOs, biological removal of P

Resumo

A remoção biológica de fósforo (P) de águas residuais é realizada em condições alternadas de anaerobiose e aerobiose (*enhanced biological phosphorus removal*, EBPR) por organismos acumuladores de polifosfato (*polyphosphate accumulating organisms*, PAO). A mais conhecida PAO, *Accumulibacter*, armazena poli-hidroxialcanoatos (PHA) anaerobicamente, usando este C para crescimento e armazenamento de P na fase aeróbia.

A *Cupriavidus necator*, um organismo com uma grande capacidade de armazenamento de PHA, foi investigada pelo seu potencial de acumular também P. Foi submetida a condições EBPR e foram ajustados vários parâmetros, como a fonte de carbono e concentrações de nutrientes. No entanto, não foi possível estimular o crescimento celular e/ou a acumulação de polímero em condições de anaerobiose microaerofilia. Testaram-se então condições totalmente arejadas, em que se adicionaram pulsos de C ou N (*fed-fetch*), favorecendo assim o crescimento celular e estimulando a acumulação de PHA e uma ligeira acumulação de P, sendo ambas provavelmente mecanismos de resposta da *C. necator* a condições de limitação de recursos (N).

Foram também testadas outras bactérias acumuladoras de PHA: *Cupriavidus necator*, *Pseudomonas oleovorans*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas resinovorans*, *Pseudomonas putida* e *Pseudomonas chlororaphis*. As duas últimas foram também testadas em bioreactor, observando-se, igualmente, que a disponibilidade de N influencia a relação entre a acumulação de PHA e o conteúdo de P na biomassa neste dois organismos.

Foi também investigado o metabolismo de acumulação de fósforo de um outro grupo de PAOs que se encontra ainda pouco explicado: as *Tetrasphaera*-PAOs. Foram enriquecidas pela imposição de condições EBPR e uma alimentação específica de hidrolisado de caseína. Num ensaio em *batch* alimentado com uma mistura de 22 aminoácidos, observou-se uma remoção de 54,5% de carbono, sendo consumidos preferencialmente os seguintes aminoácidos: prolina, lisina, glicina, tirosina, arginina e cisteína. Em outros ensaios realizados com hidrolisado de caseína e águas residuais reais, a cultura apresentou bom desempenho de remoção de C e P (53-55% de C e atingindo níveis de 10-16% de P em TSS), demonstrado o papel fundamental que estas PAOs aparentam ter em sistemas EBPR à escala real.

Palavras-chave: *C. necator*, fisiologia de armazenamento de P e PHA, *Tetrasphaera*-PAOs, remoção biológica de P.

Índice

Agradecimentos	iii
Abstract	v
Resumo	vii
Índice de Figuras	xii
Índice de Tabelas	xv
Lista de Abreviaturas	xvi
Capítulo 1	1
1. Introdução.....	1
1.1. O impacto da utilização de Fósforo (P)	2
1.2. A Aplicação do Sistema EBPR	2
1.3. A importância do Polifosfato: Uma Fonte de Energia.....	4
1.4. <i>C. necator</i> - A provável relação entre grânulos de PHA e de Polifosfato.....	4
1.5. <i>P. putida</i> - A provável relação entre grânulos de PHA e de Polifosfato	6
1.6. O impacto das <i>Tetrasphaera</i> -PAOs em Sistemas EBPR	7
1.7. Motivação e Objetivos.....	11
Capítulo 2	13
2. Testes com <i>C. necator</i> em condições EBPR	13
2.1. Materiais e Métodos.....	15
2.1.1. Microrganismo: Preparação do pré-inóculo – Reativação da Cultura	15
2.1.2. Meios de cultivo.....	15
2.1.3. Operação do reator	15
2.1.4. Técnicas analíticas.....	16
2.1.4.1. Determinação do crescimento celular	16
2.1.4.2. Quantificação do carbono.....	16
2.1.4.3. Quantificação de N e P no sobrenadante	17
2.1.4.4. Determinação do conteúdo de P na biomassa	17
2.1.4.5. Quantificação e composição do conteúdo de polímero na biomassa	17
2.1.4.6. Coloração por Azul de Nilo.....	17
2.2. Resultados e Discussão	18
2.2.1. Reator A	18
2.2.2. Reator B	19

2.2.3. Reator C.....	21
2.2.4. Reator D.....	24
2.2.5. Reator E.....	26
2.3. Conclusões.....	30
Capítulo 3	31
3. Testes em <i>Fed-batch</i> e em Aerobiose - <i>C. necator</i>	31
3.1. Materiais e Métodos	32
3.1.1. Microrganismo: Preparação do pré-inóculo – Reativação da Cultura.....	32
3.1.2. Meios de cultivo	33
3.1.3. Operação do reator.....	33
3.1.4. Preparação dos Pulsos de C e N	33
3.1.5. Técnicas analíticas	34
3.1.5.1. Determinação do crescimento celular.....	34
3.1.5.2. Quantificação do carbono	34
3.1.5.3. Quantificação de N no sobrenadante, do conteúdo de polímero e P na biomassa	34
3.2. Resultados e Discussão.....	34
3.2.1. Reator F	34
3.2.2. Reator G	38
3.3. Conclusões.....	43
Capítulo 4	45
4. Testes com outras estirpes produtoras de PHA	45
4.1. Materiais e Métodos	46
4.1.1. Ensaio em <i>Erlenmeyer</i>	46
4.1.1.1. Microrganismo: Preparação do pré-inóculo – Reativação da Cultura	46
4.1.1.2. Preparação dos Ensaio em <i>Erlenmeyer</i>	46
4.1.2. Ensaio em <i>Fed-batch</i> (Reator H e I).....	46
4.1.2.1. Microrganismo: Preparação do pré-inóculo – Reativação da Cultura	46
4.1.2.2. Operação dos reatores H e I.....	47
4.1.2.3. Preparação dos Pulso de C	47
4.1.3. Técnicas analíticas	47
4.2. Resultados e Discussão.....	47

4.2.1. Ensaio em <i>Erlenmeyer</i>	47
4.2.2. <i>P.putida</i> – Reator H.....	50
4.2.3. <i>P. Chlororaphis</i> – Reator I.....	53
4.3. Conclusões	57
Capítulo 5	59
5. Testes com <i>Tetrasphaera</i> -PAOs com Diferentes Fontes de Carbono.....	59
5.1. Materiais e Métodos.....	60
5.1.1. Operação do reator J	60
5.1.2. Ensaio em <i>Batch</i>	61
5.1.2.1. Meios de cultura dos Ensaio em <i>Batch</i>	61
5.1.2.2. Mix (22 aminoácidos).....	61
5.1.2.3. Hidrolisado de caseína	62
5.1.2.4. Águas residuais	62
5.1.3. Técnicas analíticas.....	62
5.1.3.1. Determinação da concentração dos aminoácidos	62
5.1.3.2. Determinação da concentração de glicogénio na biomassa.....	62
5.1.3.3. Microbiologia: FISH – Caracterização microbiológica	63
5.2. Resultados e Discussão	63
5.2.1. Ensaio em SBR – <i>Tetrasphaera</i> -PAOs.....	63
5.2.2. FISH – Caracterização da comunidade microbiológica	66
5.2.3. Ensaio em <i>Batch</i> – <i>Tetrasphaera</i> -PAOs	70
5.3. Conclusões	77
Capítulo 6	79
6. Conclusões e Perspectivas Futuras	79
Bibliografia	83

Índice de Figuras

Figura 1.1: Perfil de comportamento dos diferentes componentes num sistema EBPR, pelas PAOs. Imagem adaptada de He <i>et al.</i> , (2011).	2
Figura 1.2: Vias metabólicas de EBPR no genoma da <i>Accumulibacter clade</i> IIA. Imagem adaptada de He <i>et al.</i> , (2011).	3
Figura 1.3: Vias metabólicas do genoma da <i>C. necator</i> . Imagem adaptada de Lu <i>et al.</i> , (2016)..	5
Figura 1.4: Imagens TEM da formação de grânulos de polímero – PHB (textura mais clara definida) e grânulos de polifosfato - PP (mais escuro, sem camada superficial), no início (2,50 h) e no final do ensaio (24 h). Barra 200 µm. Imagem adaptada de Beeby <i>et al.</i> , (2011).	6
Figura 1.5: Imagens TEM da <i>Pseudomonas putida</i> CA-3, contendo os grânulos de PHA (textura mais clara definida) e os grânulos de polyP (mais escuro, sem camada superficial). A: no início (5 h) e B: no final do ensaio (48 h). Barra 200 µm. Imagem adaptada de Tobin <i>et al.</i> , (2007).	7
Figura 1.6: Imagens FISH de <i>Tetrasphaera</i> -PAO em lamas ativadas. A verde as bactérias presentes nas lamas ativadas, a laranja: Tet 3-654 (a); Tet 2-892 (b) e Tet 2-174 (c). As setas, os círculos e os quadrados indicam as diferentes morfologias: filamento finos, hastes ramificadas e filamentos finos. Imagem adaptada de Nguyen <i>et al.</i> , (2011).	8
Figura 1.7: Modelo metabólico anaeróbico para as <i>Tetrasphaera</i> -PAOs com diferentes fontes de carbono (glucose e aminoácidos). As diferentes fontes de carbono são armazenadas na forma de glicogénio e/ou fermentadas para acetato. Imagem adaptada de Marques <i>et al.</i> , (2017).	9
Figura 2.1: Representação dos diferentes ciclos de SBR , usados nos diferentes ensaios: 1 - Purga; 2 - Alimentação; 3 - Borbulhar com N ₂ ou ar, conforme a fase e 4 - ar através do <i>headspace</i> , durante a fase microaerofílica (Reator B, C, D e E).....	16
Figura 2.2: Variação da concentração de carbono (▲) e de DO (□) ao longo de um ciclo de operação do reator A (dia 7).	19
Figura 2.3: Variação da concentração de carbono (▲) e de DO (□) ao longo de um ciclo de operação do reator B (dia 2) e variação do pO ₂ (B2.1), no respetivo ciclo; B2: Variação da concentração de carbono (▲) e de DO (□) ao longo de um ciclo de operação do reator B (dia 3); e variação do pO ₂ (B2.2), no respetivo ciclo.	20
Figura 2.4: Variação da concentração de carbono (▲) e de DO (□) ao longo de um ciclo de operação do reator B (dia 11).	21
Figura 2.5: Coloração das células de <i>C.necator</i> com azul do Nilo, no início da fase microaerofílica (A), no início da fase aeróbia (B), no fim da fase aeróbia (C), ao longo do ciclo de operação do reator B (dia 11) (x1000) Zeiss Imager D2 a 1000 X.....	21
Figura 2.6: Variação da de DO (□) ao longo de um ciclo de operação do reator C (dia 20).	23

Figura 2.7: Variação da concentração de carbono (▲) e da quantidade de PHB (□) ao longo de um ciclo de operação do reator C (dia 20).	23
Figura 2.8: Variação da concentração de N (▲) e de P (□), no sobrenadante ao longo de um ciclo de operação do reator C (dia 20).	24
Figura 2.9: Variação da de DO (□) ao longo de um ciclo de operação do reator D (dia 9).	25
Figura 2.10: Variação da concentração de carbono (▲) e da quantidade de PHB (□) ao longo de um ciclo de operação do reator D (dia 9).	25
Figura 2.11: Variação da concentração de N (▲) e de P (□), no sobrenadante ao longo de um ciclo de operação do reator D (dia 9).	26
Figura 2.12: Variação da de DO (□) ao longo de um ciclo de operação do reator E (dia 23).	27
Figura 2.13: Variação da concentração de carbono (▲) e da quantidade de PHB (□) ao longo de um ciclo de operação do reator E (dia 23).	27
Figura 2.14: Variação do conteúdo de P (▲) e de PHB (□) na biomassa ao longo de um ciclo de operação do reator E (dia 23).	28
Figura 2.15: Variação da concentração de N (▲) e de P (□), no sobrenadante ao longo de um ciclo de operação do reator E (dia 23).	29
Figura 3.1: Variação da agitação (—) e do pO ₂ no meio (- - -), ao longo da operação do reator F (o pO ₂ foi controlado a 30% pela variação automática da agitação entre 200 e 1000 rpm).	35
Figura 3.2: Variação da concentração de carbono (▲) e de N (□) ao longo da operação do reator F.	37
Figura 3.3: Variação do conteúdo de P (▲) e de PHA (□) na biomassa, ao longo da operação do reator F.	37
Figura 3.4: Variação da quantidade da concentração de biomassa (■) ao longo da operação do reator F.	38
Figura 3.5: Variação da agitação (—) e do pO ₂ no meio (- - -), ao longo da operação do reator G (o pO ₂ foi controlado a 30% pela variação automática da agitação entre 200 e 1000 rpm).	39
Figura 3.6: Variação da concentração de carbono (▲) e de N (□), ao longo da operação do reator G.	41
Figura 3.7: Variação do conteúdo de P (▲) e de PHA (□) na biomassa, ao longo da operação do reator G.	41
Figura 3.8: Variação da quantidade da concentração de biomassa (■) ao longo da operação do reator G.	42
Figura 4.1: Conteúdo de P na biomassa (●) e CDW (■), no final do ensaio em <i>Erlenmeyer</i> (72 h).	49

Figura 4.2: Conteúdo de polímero na biomassa (●) e CDW (■), no final do ensaio em <i>Erlenmeyer</i> (72 h).....	50
Figura 4.3: Variação da agitação (—) e do pO ₂ no meio (- - -), ao longo da operação do reator H com a bactéria <i>P. putida</i> (o pO ₂ foi controlado a 30% pela variação automática da agitação entre 200 e 1000 rpm).....	51
Figura 4.4: Variação do conteúdo de P (▲) e de PHA (□) na biomassa, ao longo da operação do reator H com a bactéria <i>P. putida</i>	53
Figura 4.5: Variação da quantidade da concentração de biomassa (■) ao longo da operação do reator H com a bactéria <i>P. putida</i>	52
Figura 4.6: Variação da agitação (—) e do pO ₂ no meio (- - -), ao longo da operação do reator I (o pO ₂ foi controlado a 30% pela variação automática da agitação entre 200 e 1000 rpm) com a bactéria <i>P. chlororaphis</i>	54
Figura 4.7: Variação do conteúdo de P (▲) e de PHA (□) na biomassa, ao longo da operação do reator I com a bactéria <i>P. chlororaphis</i>	56
Figura 4.8: Variação da concentração de biomassa (■) ao longo da operação do reator I, com a bactéria <i>P. chlororaphis</i>	56
Figura 5.1: Variação de TSS (●), de carbono removido na fase anaeróbia (■), libertação de P, na fase anaeróbia (■) e acumulação de P na fase aeróbia (■), ao longo dos dias de operação do Reator J.....	64
Figura 5.2: Variação de glicogénio (●), de carbono (▲), e de P no sobrenadante (□) ao longo do ciclo, no 52º dia de operação do Reator J.	66
Figura 5.3: Imagens de FISH das lamas do SBR do reator J. As EUBMIX encontram-se a verde e PAOMix e GAOMix a laranja, nos diferentes dias de operação.	67
Figura 5.4: Imagens de FISH das lamas do SBR do reator J. As EUBMIX encontram-se a verde e as diferentes de Tet 1-266, Tet 2-174, Tet 2-892 e Tet 3-654 a laranja, nos diferentes dias de operação.	68
Figura 5.5: Variação do conteúdo de carbono removido entre os diferentes aminoácidos na fase anaeróbia, no ensaio em <i>batch</i> Mix (mistura 22 aminoácidos).	71
Figura 5.6: Variação de glicogénio (●), de carbono (▲), e de P no sobrenadante (□) ao longo do ciclo, no ensaio em <i>batch</i> Mix (mistura 22 aminoácidos).	73
Figura 5.7: Variação de glicogénio (●), de carbono (▲), e de P no sobrenadante (□) ao longo do ciclo, no ensaio em <i>batch</i> com hidrolisado de caseína.	74
Figura 5.8: Variação de glicogénio (●), de carbono (▲), de acetato (▲), de propionato (▲) e de P no sobrenadante (□) ao longo do ciclo, no ensaio em <i>batch</i> com águas residuais.....	76

Índice de Tabelas

Tabela 2.1: Diferentes componentes usados na preparação dos meios de cultivo dos ensaios.	15
Tabela 3.1: Diferentes componentes usados na preparação dos meios de cultivo dos ensaios.....	33
Tabela 5.1: Morfologia das diferentes estirpes de <i>Tetrasphaera</i> . Adaptado de Ngunyen <i>et al.</i> , (2012).....	68
Tabela 5.2: Comparação dos dados obtidos da operação do ciclo de SBR, com dados reportados em ensaios com <i>Tetrasphaera</i> e <i>Accumulibacter</i>	70
Tabela 5.3: Comparação dos dados obtidos nos ensaios em batch (<i>Tetrasphaera</i> + <i>Accumulibacter</i>), com diferentes fontes de carbono testadas.	74

Lista de Abreviaturas

ATP – *Adenosine Triphosphate* (Trifosfato de adenosina)

CDW – *Cell Dry Weight* (Peso Seco das Células)

DO – Densidade Ótica

EBPR – *Enhanced Biological Phosphorus Removal* (Remoção Biológica de Fósforo)

ETARs – Estações de Tratamento de Águas Residuais

FISH – *Fluorescence in situ Hybridization*

GC – *Gas Chromatography* (Cromatografia Gasosa)

HB – Hidroxibutirato

HD – Hidroxidecanoato

HDd – Hidroxidodecanoato

HHx – Hidroxihexanoato

HO – Hidroxioctanoato

HPLC – *High-Performance Liquid Chromatography* (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)

HTd – Hidroxitradecanoato

HV – Hidrovalerato

Mcl-PHA – *Medium-chain-length-PHA* (Poli-hidroxiAlcanoato de cadeia média)

PAOs – *Poliphosphate Accumulating Organisms* (Organismos Acumuladores de Polifosfato)

PHA – Poli-HidroxiAlcanoatos

PHB – Poli- Hidroxibutirato

P_i – Ortofosfato

pO₂ – percentagem de O₂

PolyP – *Polyphosphate* (Polifosfato)

rpm – rotações por minutos

SBR – *Sequential Batch Reactor* (Reator Descontínuo Sequencial)

Sci-PHA – *Small-chain-length-PHA* (Poli-hidroxiAlcanoato de cadeia curta)

TEM – *Transmission Electron Microscopy*, (Microscópio Eletrônico de Transmissão)

TOC – *Total Organic Carbon* (Carbono Total Orgânico)

TRH – Tempo de Retenção Hidráulica

TRL – Tempo de Retenção de Lamas

TSS – *Total Suspended Solids* (sólidos suspensos totais)

VFAs – *Volatile Fatty Acids* (ácidos gordos voláteis)

VSS – *Volatile Suspended Solids* (sólidos suspensos voláteis)

Capítulo 1

1. Introdução

1.1. O impacto da utilização de Fósforo (P)

O fósforo (P) é um dos principais nutrientes essenciais para o crescimento celular e desenvolvimento biológico. O incremento do uso de fertilizantes contendo P tem vindo a aumentar para corresponder ao crescimento da produção agrícola. Para a produção de fertilizantes de P, a principal matéria-prima, rocha de fosfato tem sido usada excessivamente, sendo que em 2011 a produção global atingiu as 191 000 kt (Karunanithi *et al.*, 2015). No entanto, a principal matéria-prima é um recurso escasso e finito, e estima-se que a sua disponibilidade diminua nos próximos 50-100 anos (Karunanithi *et al.*, 2015; Ye *et al.*, 2017). Por outro lado, o uso de fertilizantes de P na agricultura tem-se refletido na poluição da água e os seus ecossistemas. O uso de fertilizantes agrícolas é a principal fonte de poluição de nutrientes destes ecossistemas, por toda a parte do mundo. O nutriente mais problemático é o P, sendo que a presença deste nutriente em meios aquáticos em concentrações superiores a 0,02 mg/L pode levar ao crescimento de algas e outros microrganismos fotossintéticos, como cianobactérias, fenómeno conhecido como eutrofização (Khalil *et al.*, 2017).

Com o crescimento abundante de algas e cianobactérias, ocorre o aumento de toxinas provenientes destes microrganismos. O seu crescimento abundante leva também a outros efeitos negativos como a redução da penetração de luz solar, da quantidade de oxigénio dissolvido, ocorrendo por consequência a destruição dos ecossistemas e habitats aquáticos e a diminuição da qualidade da água (Smith *et al.*, 2003; Glibert *et al.*, 2016). Atualmente as estações de tratamento de águas residuais (ETARs) utilizam processos físico-químicos (coagulação/floculação) ou processos biológicos para a redução de emissão de P para o meio aquático, minimizando o impacto da eutrofização. O sistema *enhanced biological phosphorus removal* (EBPR) é o mais importante processo biológico de remoção de P (Wang *et al.*, 2014)

1.2. A Aplicação do Sistema EBPR

O processo EBPR tem sido aplicado desde 1950 em várias ETARs, devido à sua elevada capacidade de remoção de P das águas residuais, assim como ao menor custo de operação em comparação aos processos químicos (Wilmes *et al.*, 2008). A configuração básica deste sistema consiste na utilização de lamas ativadas, a partir da sua recirculação em condições anaeróbias e aeróbias, promovendo assim a remoção de P das águas residuais (Fig.1.1). O principal grupo de microrganismos presentes nas lamas ativadas, responsável pela remoção de P são as bactérias acumuladoras de fósforo ou *Polyphosphate accumulating organisms* (PAOs) (Crocetti *et al.*, 2000).

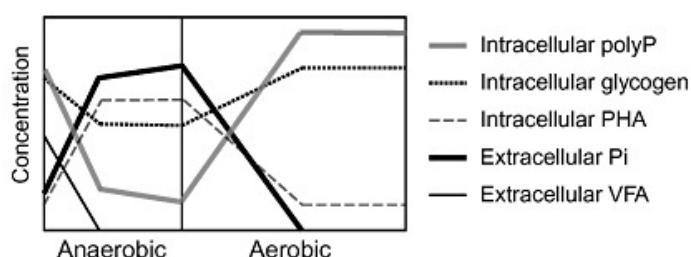


Figura 1.1: Perfil de comportamento dos diferentes componentes num sistema EBPR, pelas PAOs. Imagem adaptada de He *et al.*, (2011).

Entre as PAOs que integram a comunidade microbiológica presente nas lamas ativadas, o principal microrganismo responsável pela remoção de P é *Candidatus Accumilibacter phosphatis* ou *Accumilibacter* (Albertsen *et al.*, 2012). Este grupo de bactérias gram-negativas pertencentes à subclasse das β -Proteobacteria é constituído por dois subgrupos (*clade I* e a *clade II*), e foi identificado na maioria das ETARs, que utilizam o sistema EBPR (entre 4-22% das bactérias da comunidade microbiológica) (Garcia *et al.*, 2006; Oehmen *et al.*, 2007)

Como se encontra representado na Fig. 1.1, na fase anaeróbia, as PAOs consomem os ácidos gordos voláteis (*volatile fatty acids*, VFAs) presentes nas águas residuais, como acetato ou propionato, que convertem em poli-hidroxicanoatos (PHA) que são acumulados intracelularmente como reservas de energia e carbono. De modo a que isto seja possível, o polifosfato (polyP) intracelular é degradado formando trifosfato de adenosina (ATP), que é utilizado como fonte de energia para assimilação de carbono ocorrendo libertação de ortofosfato (P_i) para o meio. Segundo Garcia *et al.*, (2006) o poder de redução e a energia adicional são provenientes da degradação do glicogénio intracelular e/ou do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) (Fig. 1.2). Na fase aeróbia, o carbono armazenado anaerobicamente, sob a forma de PHA é utilizado como fonte de energia para crescimento celular e regeneração das reservas de energia, glicogénio e polyP. O PHA é degradado, resultando na formação de acetil-CoA e/ou propanil-CoA, que através do ciclo TCA são usados como fonte de carbono e energia, enquanto ocorre acumulação de P_i para a regeneração das reservas polyP (Garcia *et al.*, 2006; He *et al.*, 2011).

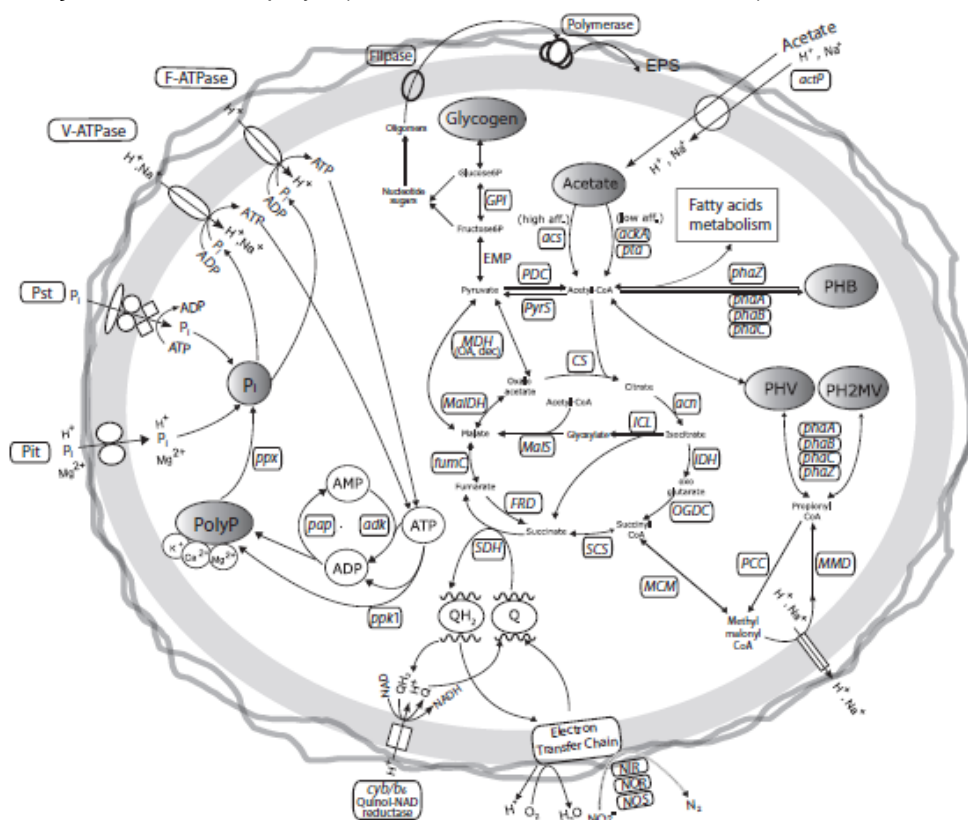


Figura 1.2: Vias metabólicas de EBPR no genoma da *Accumilibacter clade IIA*. Imagem adaptada de He *et al.*, (2011).

Segundo Welles *et al.*, (2015), diferentes propriedades fisiológicas e morfológicas foram observadas entre os diferentes *clades* de PAOs. As diferentes *clades* podem apresentar relações entre a fisiologia de C e de P, assim como, diferentes vias metabólicas para as conversões anaeróbias/aeróbias. Por outro lado, é possível que outros organismos possam também, apresentar uma relação entre os grânulos de polifosfato e PHA e capacidade de libertação/acumulação de P, se submetidos às condições ideais.

1.3. A importância do Polifosfato: Uma Fonte de Energia

As reservas de energia têm um papel crucial nas vias metabólicas dos microrganismos. Certos microrganismos podem ter diferentes reservas de energia, como lípidos, glicogénio, PHA e polifosfato (Tobin *et al.*, 2007; Dai *et al.*, 2008; Nielsen *et al.*, 2010). No caso das PAOs, que têm uma ligação entre a acumulação de P_i , a degradação de glicogénio e a regeneração de PHA (Oehmen *et al.*, 2007; Acevedo *et al.*, 2012). Outros organismos têm em comum o polifosfato como reserva de energia, entre os quais foram reportados: bactérias, fungos, plantas e animais (Sharfstein *et al.*, 1994). Segundo Achbergerová *et al.*, (2011), os grânulos de polifosfato são sintetizados tanto para energia como para armazenamento de fosfato. Essas reservas são degradadas para produzir energia, posteriormente utilizada na produção de moléculas vitais, como aminoácidos, açúcares ou lípidos.

Ao longo dos anos, organismos produtores de PHA foram submetidos a ensaios, devido aos diferentes tipos de PHA. Entre as quais encontra-se reportada a *C. necator* ou a *P. oleovorans*, que são produtoras de *short-chain-length* PHA (scl-PHA), consistem em cadeias de monómeros de 4-5 átomos de carbono (Wu *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2016). No caso da *P. putida*, da *P. chlororaphis* ou da *P. resinovrans* são bactérias produtoras de *medium-chain-length*-PHA (mcl-PHA), consistem em cadeias de monómeros de 6-14 átomos de carbono (Steinbüchel *et al.*, 2003; Kenny *et al.*, 2012; Poblete-Castro *et al.*, 2014). Entre as diversas bactérias produtoras de PHA, apenas um número muito reduzido foi já sujeito a estudos sobre a sua capacidade para acumular polyP. Entre elas encontra-se a *C. necator* (Beeby *et al.*, 2012; Tumlirsch *et al.*, 2015) e a *P. putida* (Tobin *et al.*, 2007; Nikel *et al.*, 2013).

1.4. *C. necator* - A provável relação entre grânulos de PHA e de Polifosfato

Ao longo dos últimos 50 anos, a *Cupriavidus necator* (anteriormente denominada como (*Ralstonia eutropha*) tem sido investigada e usada como modelo de estudo, devido à elevada capacidade de acumulação de PHA, podendo obter-se valores superiores a 90% de conteúdo de polímero na biomassa (Wang *et al.*, 2010; Yousuf *et al.*, 2016). Esta bactéria, gram-negativa pertencente à classe β -Proteobacteria, possui a capacidade de crescimento e de produção de polímero a partir de várias fontes de carbono, tais como: açúcares, VFAs, lípidos, ácidos orgânicos e CO_2 . As diferentes fontes de carbono são assimiladas por diferentes vias metabólicas para produção de polímero, sendo o precursor final comum o Acetil-CoA (Fig 1.3) (Lu *et al.*, 2016).

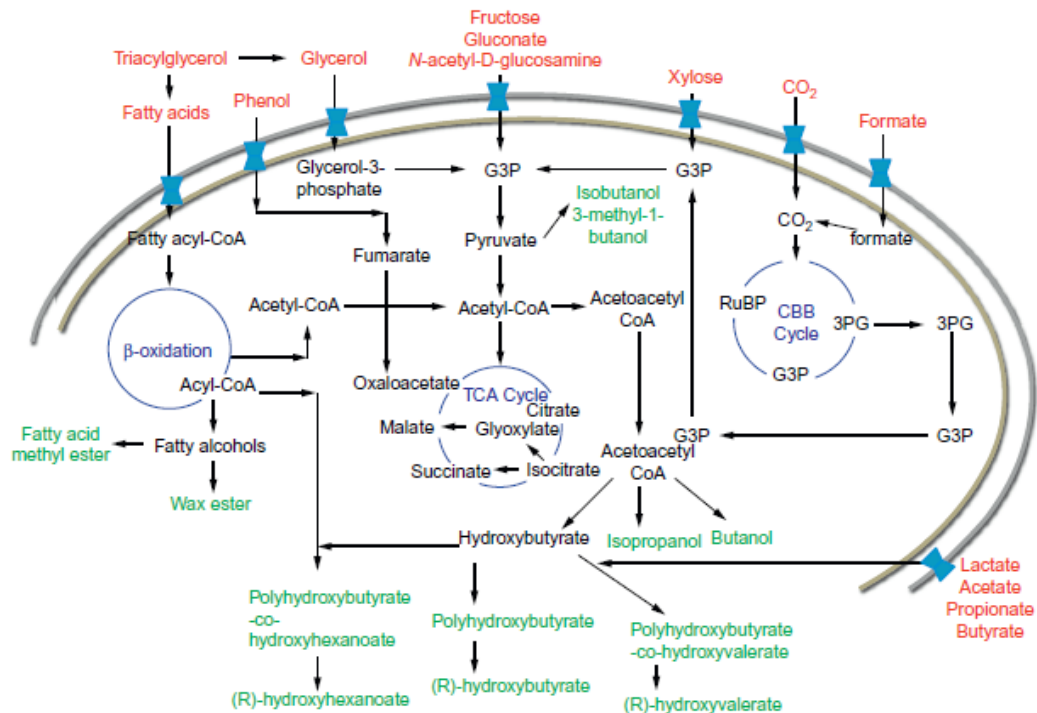


Figura 1.3: Vias metabólicas do genoma da *C. necator*. Imagem adaptada de Lu *et al.*, (2016).

A produção microbiológica de PHA despertou interesse na indústria devido às interessantes propriedades deste polímero. A produção de polímero pela *C. necator* ocorre como resposta a condições submetidas pelo meio, como a fonte de carbono em excesso ou a utilização da concentração limitantes de nutrientes, como azoto (N) ou fósforo (P). A utilização de diferentes fontes de carbono e de diferentes concentrações de nutrientes pode resultar na produção de polímero com diferentes características (Mozumder *et al.*, 2016). No caso da produção de PHB e de outros co-polímeros como P(3HB-4HB) [poli (3-hidroxibutirato-4-hidroxibutirato)] e P(3HB-3HV) [poli (3-hidroxibutirato-3-hidroxyvalerato)] chamaram a atenção pela sua biocompatibilidade e biodegradabilidade e das propriedades termoplásticas semelhantes aos plásticos provenientes de olefinas. As propriedades físicas dos polímeros estão relacionadas com as frações molares de (3HV) e (3HB). A alteração dessas frações pode ser proporcionada através da utilização de condições ou componentes precursores específicos ao longo do cultivo (Choi *et al.*, 2003; Fukui *et al.*, 2014).

A manipulação genética da *C. necator* também tem servido de modelo em estudos das vias metabólicas, para uma melhor compreensão do seu metabolismo e da acumulação de polímero. Embora haja vasto conhecimento bioquímico sobre a produção de polímero, em relação à maquinaria envolvida da produção/crescimento dos grânulos não se encontra tão claro (Zhang *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2015; Lu *et al.*, 2016).

Num ensaio realizado por Beeby *et al.* (2011), para compreensão do crescimento e localização dos grânulos de polímero (PHA) da *C. necator*. Beeby *et al.* (2011) acompanharam a evolução da acumulação dos grânulos ao longo do ensaio, a partir de microscópio eletrônico de

transmissão (*transmission electron microscopy*, TEM). No entanto, observaram “*darker granules*”, que viriam a reportar ser grânulos de polifosfato, devido à densidade da massa atômica que apresentavam, consistente com a abundância de fósforo. Na fase inicial do ensaio, os grânulos de polifosfato eram razoavelmente visíveis, mas ao longo do ensaio iam diminuindo e os grânulos de polímero aumentando (Fig. 1.4). Os “*darker granules*” já tinham sido observados por *Tian et al.*, (2005), mas não perceberam imediatamente do que se tratava. Segundo *Tumlirsch et al.*, (2015), os grânulos de polifosfato encontram-se na vizinhança dos grânulos de polímero (PHA). Contudo, ainda não foi comprovado, que exista uma relação metabólica ou fisiológica entre a formação das duas reservas de energia.

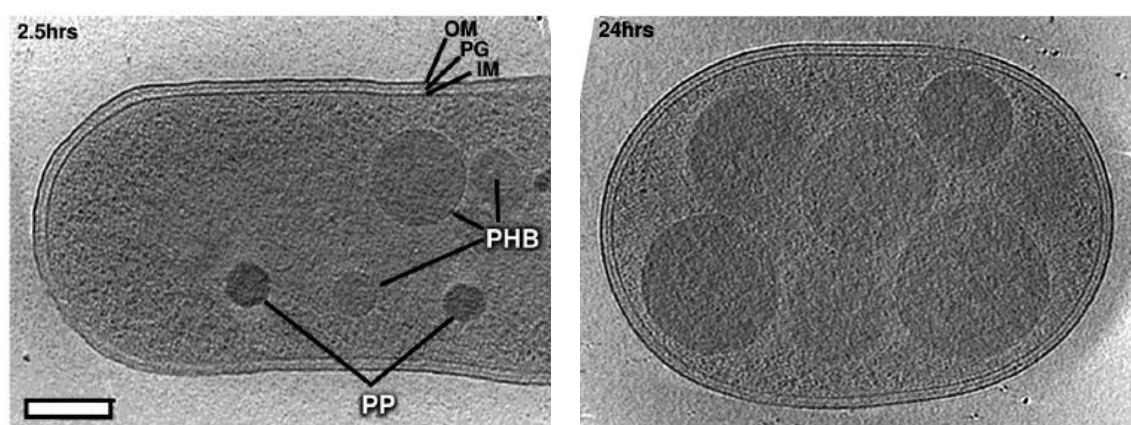


Figura 1.4: Imagens TEM da formação de grânulos de polímero – PHB (textura mais clara definida) e grânulos de polifosfato - PP (mais escuro, sem camada superficial), no início (2,50 h) e no final do ensaio (24 h). Barra 200 μm . Imagem adaptada de *Beeby et al.*, (2011).

1.5. *P. putida* - A provável relação entre grânulos de PHA e de Polifosfato

Outro organismo, que provavelmente possa apresentar uma relação entre grânulos de polifosfato e de polímero é a *P. putida*, uma bactéria há muito anos estudada, por causa da sua capacidade de produção de mcl-PHA e as propriedades do polímero, semelhantes às dos elastômeros (*Jiang et al.*, 2013; *Nikel et al.*, 2013). A *P. putida* é uma bactéria que tem capacidade de usar várias fontes de carbono e de crescimento em diversos habitats. As suas características refletem-se na sua capacidade metabólica e de se adaptar às condições submetidas pelo meio. *Tobin et al.*, (2007), realizaram um ensaio com a *P. putida* CA-3, em que testaram esta estirpe sob condições aeróbicas de crescimento. O objetivo da realização deste ensaio consistia em acompanhar a produção de mcl-PHA e de polifosfato, ao longo do tempo (Fig. 1.5). Na fase inicial do ensaio observaram crescimento celular, contudo, quando N se encontrava limitante no meio, ocorreu em simultâneo a acumulação de PHA e de polifosfato. *Nikel et al.*, (2013) observaram que a acumulação de polifosfato, no caso da *P. putida* KT2440 permite resistência metabólica a condições de stress submetidas pelo meio, como a limitação de nutrientes. Indicando que provavelmente, a acumulação de P_i ocorre para aumentar as reservas de energia requisitadas para a acumulação de PHA, quando outros recursos energéticos se encontram limitantes.

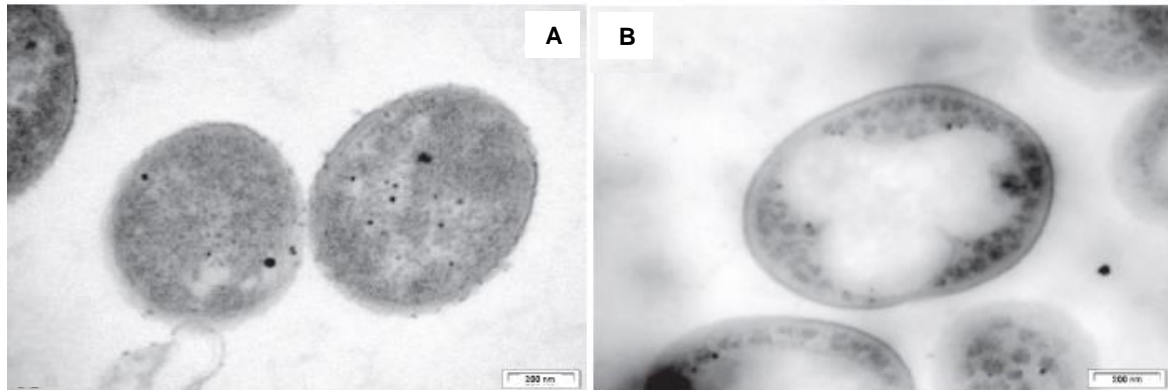


Figura 1.5: Imagens TEM da *Pseudomonas putida* CA-3, contendo os grânulos de PHA (textura mais clara definida) e os grânulos de polyP (mais escuro, sem camada superficial). A: no início (5 h) e B: no final do ensaio (48 h). Barra 200 μm . Imagem adaptada de Tobin *et al.*, (2007).

1.6. O impacto das *Tetrasphaera*-PAOs em Sistemas EBPR

Embora o sistema EBPR, seja aplicado em ETARs desde 1950, segundo Nielsen *et al.*, (2010), o desenvolvimento do sistema EBPR ocorreu sem uma compreensão total do fator principal, os micróbios. Como a função das ETARs é determinada pela composição e função da comunidade microbológica presente nas lamas ativadas. O desenvolvimento na microbiologia tem sido um fator limitante para o avanço do processo. Entre os principais processos de tratamento como a nitrificação e desnitrificação ou a remoção de fósforo, apenas nos últimos 15 anos, os avanços nos métodos independentes de cultura forneceu ferramentas capazes de identificar os principais microrganismos (Garcia *et al.*, 2006; Ya-nan *et al.*, 2007).

A partir do enriquecimento de organismos PAOs em sistemas EBPR à escala laboratorial é possível uma melhor compreensão das suas vias metabólicas. Como o estudo com culturas puras não é viável, vários estudos têm sido realizados com enriquecimentos em escala laboratorial, que permitiu a aplicação dos métodos independentes de cultura (Burow *et al.*, 2008). O desenvolvimento dessas técnicas como hibridação fluorescente *in situ* (*fluorescence in situ hybridization*, FISH), reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction*, PCR) ou eletroforese em gel de gradiente desnaturante (*denaturing gradient gel electrophoresis*, DGGE) permitiram o desenvolvimento da análise da comunidade microbológica (Eschenhagen *et al.*, 2003; Kong *et al.*, 2005). A partir da utilização de FISH, Kong *et al.*, (2005) observaram em ETARs (Dinamarca) que usam o sistema EBPR, a abundância de bactérias gram-positivas, *Tetrasphaera* (*Actinobacteria*) como presumível importância na remoção biológica de fósforo. Segundo Nguyen *et al.*, (2011) e Stokholm-bjerregaard *et al.*, (2017) a abundância das *Tetrasphaera* é superior às das *Accumulibacter*, em sistemas EBPR (Dinamarca), entre 18-30% da comunidade microbológica identifica através de FISH. Contudo, estas bactérias não têm um metabolismo totalmente idêntico às *Accumulibacter*. Em condições aeróbias são capazes de realizar a acumulação de P_i e conseqüentemente a formação de polifosfato, caso tenham consumido aminoácidos na fase anaeróbia. No entanto, as *Tetrasphaera* não conseguem acumular PHA, embora consigam

consumir acetato e sintetizar glicogênio (Kong *et al.*, 2005; Nguyen *et al.*, 2011; Marques *et al.*, 2017). Além de isso, as *Tetrasphaera* partilham semelhanças com as *Accumulibacter*, em relação aos genes envolvidos na produção/degradação de polifosfato. Como o ppk1 (polifosfato quinase 1), o ppk2 (polifosfato quinase 2), o polifosfato AMP fosfotransferase (pap) e adenilato quinase (adk). Assim como os transportadores, situadas na membrana celular, o transportador específico de fosfato de alta afinidade (Pst) e o transportado de baixa afinidade (Pit) (Kristiansen *et al.*, 2013). Possuem ferramentas metabólicas que lhes permitem participar na remoção de P em sistemas EBPR.

Kristiansen *et al.*, (2013) sugeriram um modelo (baseado na operação de um SBR enriquecido por *T. elongata*) em que as *Tetrasphaera* conseguem usar como fonte de carbono, a glucose presente nos sistemas EBPR. Em condições anaeróbias, fermenta a glucose e consome-a, nesta fase ocorre produção de glicogênio, a energia necessária é obtida através da degradação do polifosfato, e conseqüentemente ocorre libertação de P_i para o meio. Aerobicamente, ocorre degradação do glicogênio armazenado para fornecer carbono e energia para o crescimento celular, ocorrendo acumulação de P_i , para aumentar as reservas de energia de polifosfato.

Segundo Nguyen *et al.*, (2011) existem 3 clades de *Tetrasphaera* [Clade 1 (Tet 1-266), Clade 2 (Tet 2-174 e Tet 2-892) e Clade 3 (Tet 3-654)] (Fig. 1.6), com diferenças filogenéticas e diversas morfologias, entre as quais: pequenos coccus, aglomerados de tetracoccus, bastonetes pequenos ou grandes e filamentosas. Entre as espécies isoladas a partir de lamas ativadas de sistemas EBPR, a Clade 1 possui clones relacionados com a sequência da *T. elongata* e *T. duodecadis*, a Clade 2 está relaciona com *T. jenkinsii*, *T. australiensis*, *T. veronensis* e a filamentosa "*Candidatus Nostocoida limicola*", enquanto a Clade 3 encontra-se apenas relacionada com sequências de clones isolados (Nguyen *et al.*, 2011; Kristiansen *et al.*, 2013; Muszyński *et al.*, 2015). Segundo Kristiansen *et al.*, (2013) e Nguyen *et al.*, (2015) as clades isoladas conseguem usar com fonte de carbono: glucose, glutamato, glicina e aspartato, enquanto as *Accumulibacter* não conseguem assimilar estes substratos como fonte de carbono.

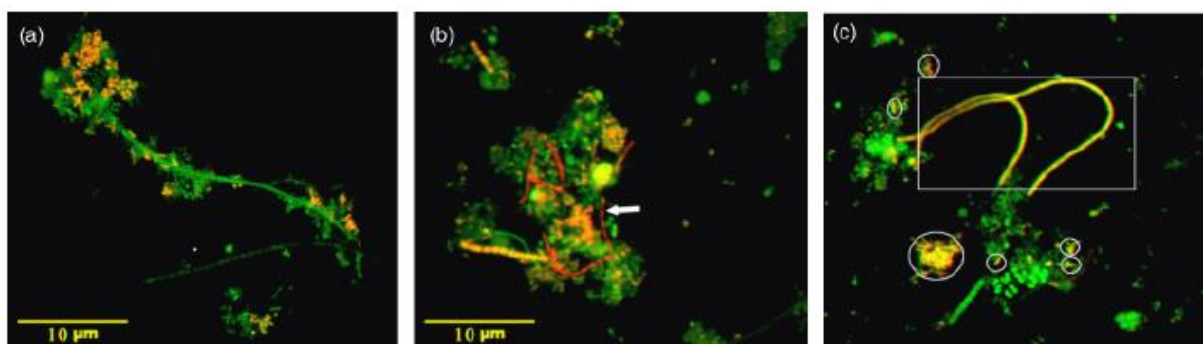


Figura 1.6: Imagens FISH de *Tetrasphaera*-PAO em lamas ativadas. A verde as bactérias presentes nas lamas ativadas, a laranja: Tet 3-654 (a); Tet 2-892 (b) e Tet 2-174 (c). As setas, os círculos e os quadrados indicam as diferentes morfologias: filamentosas, bastonetes ramificadas e filamentos finos. Imagem adaptada de Nguyen *et al.*, (2011).

Como referido anteriormente, ensaios com sistemas EBPR (escala laboratorial) com culturas enriquecidas por PAOs permite uma melhor compreensão do seu metabolismo. Em ensaios realizados por Marques *et al.*, (2017), a partir da utilização de uma mistura de aminoácidos (hidrolisado de caseína), como fonte de carbono. observaram uma cultura enriquecida por *Tetrasphaera*, (Tet 1-266, 38,5%; Tet 2-892, < 1,0%; Tet 2-174, < 1,0%; Tet 3-654, 31,0%, da fração total de biomassa) e a presença de *Accumulibacter* e GAOs (21,7% e < 1,0% da fração total de biomassa, respetivamente). No ensaio operado em modo *batch* sequencial (*sequential batch reactor*, SBR), observaram semelhanças metabólicas (Fig. 1.6) e fisiológicas a ensaios reportados com as *Accumulibacter*, em que as fontes de carbono foram acetato e propionato. Entre essas semelhanças destacavam-se as taxas similares de libertação de P_i e de consumo de glicogénio por consumo de substrato, na fase anaeróbia. Igualmente, na fase aeróbia, observaram que o conteúdo de P nos sólidos totais suspensos (*total suspended solids*, TSS) era também semelhante, 8-19% no caso das *Tetrasphaera* e 7-17% nos ensaios reportados para *Accumulibacter* por Oehmen *et al.*, (2007). A partir da comparação desses ensaios, observaram produção de glicogénio no final da fase aeróbia, como ocorreu com as *Accumulibacter*.

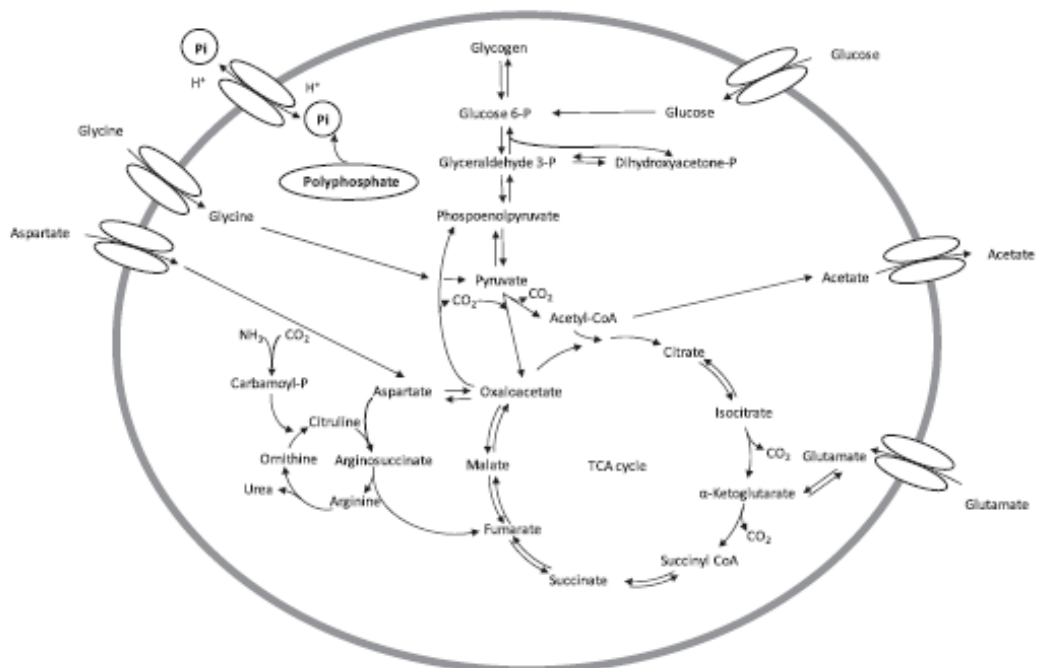


Figura 1.7: Modelo metabólico anaeróbico para as *Tetrasphaera*-PAOs com diferentes fontes de carbono (glucose e aminoácidos). As diferentes fontes de carbono são armazenadas na forma de glicogénio e/ou fermentadas para acetato. Imagem adaptada de Marques *et al.*, (2017).

Marques *et al.*, (2017) reportaram outro ensaio (*batch*) com o mesmo enriquecimento microbiano em que a fonte de carbono consistia numa mistura de aminoácidos (3,0 C mM), com acetato (3,0 C mM) e propionato (3,0 C mM). A partir desse ensaio, na fase anaeróbia, observaram consumo total do propionato, 88% do acetato total e 66% do hidrolisado de caseína total,

acompanhado de liberação de P_i para o meio e consumo de glicogénio, como ocorre com as *Accumulibacter* (Oehmen *et al.*, 2007). Nguyen *et al.* (2011) observaram que algumas *clades* de *Tetrasphaera* têm a capacidade de assimilar acetato, como fonte de carbono. Por outro lado, Marques *et al.*, (2017) consideram que os VFAs foram consumidos pelas *Accumulibacter*, já que estas bactérias têm preferência por usar VFAs como fonte de carbono e as *Tetrasphaera* os aminoácidos (Nguyen *et al.*, 2011; Kristiansen *et al.*, 2013). Na fase aeróbia, observaram acumulação de P_i e regeneração do glicogénio ao longo desta fase, semelhante ao comportamento que as *Accumulibacter* apresentam. Nestes ensaios reportados por Marques *et al.*, (2017) observaram que o perfil dos diferentes componentes ao longo do ciclo foram similares aos de um sistema EBPR pelas PAOs (Fig. 1.1). Contudo, segundo Nguyen *et al.*, (2011), Kristiansen *et al.*, (2013) e Marques *et al.*, (2017), embora as *Tetrasphaera* e as *Accumulibacter* partilhem entre si semelhanças metabólicas, é necessário a realização de outros ensaios de modo a clarificar as suas vias metabólicas.

1.7. Motivação e Objetivos

A relação entre a fisiologia de C e de P nas *Accumulibacter* foi observado tanto à escala laboratorial como em estações de tratamento de águas residuais operados em ciclos de SBR. Contudo, é possível que outros organismos possam ter a capacidade de libertação/acumulação de P, caso sejam submetidas às condições ideais. A partir de ensaios em *Erlenmeyer* realizados por Beeby *et al.*, (2011), para compreensão do crescimento e localização dos grânulos de polímero da *Cupriavidus necator*. Beeby *et al.*, (2011) utilizaram TEM para acompanhar a evolução e acumulação de PHA ao longo do ensaio, contudo, observaram “*darker granules*”, que viriam a reportar ser grânulos de polifosfato. Segundo Tumlirsch *et al.*, (2015), os grânulos de polifosfato encontram-se na vizinhança dos grânulos de polímero. Contudo, ainda não foi comprovado que exista uma relação metabólica ou fisiológica entre a formação das duas reservas de energia. Outra bactéria que possivelmente possa apresentar essa relação é a *Pseudomonas putida*, que se encontra reportado na literatura por Tobin *et al.*, (2007) e Nikel *et al.*, (2013). No entanto, nesses ensaios não obtiveram uma conclusão definitiva para a possível relação entre os dois tipos de grânulos.

Na fase inicial dos ensaios, de modo a compreender o funcionamento de acumulação de P pela *C. necator*, realizou-se ensaios em reatores sob condições normalmente utilizadas por PAOs, em regime SBR. Ao longo do tempo, realizam-se modificações, como a fonte de carbono, a duração das fases, as condições de arejamento e a utilização de diferentes concentrações de nutrientes (P e N), de modo a avaliar o impacto que tinham no crescimento da cultura e na acumulação de polímero, durante o processo em SBR.

Em modo de operação *fed-batch*, em condições de aerobiose (pO_2 superior a 30%) realizaram-se ensaios com a *C. necator*, sob condições favoráveis para o seu crescimento, dando-se pulsos de C ou N, ao longo do tempo, de modo a obter-se uma cultura com bom crescimento celular e observar a variação do conteúdo de P na biomassa em ensaios em reator.

Entre as diferentes bactérias produtoras de PHA, não existem estudos relativamente à relação entre a acumulação de polifosfato e a acumulação de polímero. Apenas um número muito reduzido foi já sujeito a estudos sobre a presença de grânulos de polyP, sendo essas bactérias a *C. necator* e a *P. putida* (Tobin *et al.*, 2007; Beeby *et al.*, 2012; Nikel *et al.*, 2013; Tumlirsch *et al.*, 2015). Neste estudo realizaram-se ensaios em *Erlenmeyer* com as seguintes bactérias: *Cupriavidus necator*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas oleovorans*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas stutzeri*, e *Pseudomonas resinovorans*. Através da análise dos dados obtidos no final dos ensaios, como a concentração celular, a produção de polímero, e o conteúdo de P na biomassa, selecionaram-se duas estirpes para ensaios em bioreator. Optou-se pela realização de ensaios em modo de operação *fed-batch*, avaliando a acumulação de polímero e a variação de conteúdo de P na biomassa ao longo do tempo, de modo, a elucidar a relação metabólica ou fisiológica que possa existir entre o conteúdo de P e os grânulos de polímero nos diferentes organismos produtores de PHA.

Outro grupo de organismos que apresenta uma relação fisiológica entre C e P, como as *Accumulibacter*, é o caso das *Tetrasphaera*-PAOs. Segundo Nguyen *et al.*, (2011) e Lanham *et al.*, (2014), a abundância das *Tetrasphaera* é superior às das *Accumulibacter*, em sistemas EBPRs (Dinamarca e Portugal). A partir da realização de ensaios em SBR e em *batch* à escala laboratorial, enriquecidos por *Tetrasphaera*, foi possível uma melhor compreensão do seu metabolismo. Apesar da preferência das *Tetrasphaera* por aminoácidos, não se conhece a existência de preferência entre os diferentes aminoácidos. No caso das *Tetrasphaera*-PAOs, foram realizados diferentes ensaios, em relação às bactérias produtoras de PHA. A cultura foi submetida a ensaios com diferentes fontes de carbono (hidrolisado de caseína, uma mistura de aminoácidos, e águas residuais), para analisar a preferência das *Tetrasphaera* por diferentes aminoácidos e a sua capacidade de remoção de C e P, em diferentes condições. Uma maior eficiência de remoção de P por C consumido poderá levar a otimização em sistemas EBPRs.

Capítulo 2

2. Testes com *C. necator* em condições EBPR

A eutrofização é um problema alarmante ao longo dos últimos anos, que tem afetado a qualidade da água potável dos ecossistemas. O principal nutriente que está relacionado com este problema é o fósforo (P). Para a remoção de P das águas residuais, o sistema normalmente utilizado é o EBPR, que consiste na utilização de lamas ativadas constituídas principalmente por organismos acumuladores de P (PAOs) (Wilmes *et al.*, 2008). Este sistema utiliza fontes de carbono, comuns em águas residuais, com acetato ou outros ácidos gordos voláteis. No processo de EBPR, são alternadas condições anaeróbias com aeróbias, de modo a promover primeiro a libertação e depois a acumulação de P pela biomassa. A quantidade de fósforo armazenada é maior que a libertada devido ao crescimento microbiano que tem lugar na fase aeróbia, sendo o P removido do processo pela purga de parte da biomassa ao fim do ciclo. Para esta alternância de condições à escala laboratorial são normalmente utilizados reatores descontínuos sequenciais (SBR) (Crocetti *et al.*, 2000). Este modo de operação envolve a aplicação de ciclos sequenciais no mesmo reator, que incluem uma fase anaeróbia, seguida de uma fase aeróbia. As PAOs utilizam o carbono durante a fase anaeróbia, para armazenar sob forma de grânulos de PHA. Na fase seguinte, aeróbia, utilizam o polímero armazenado como fonte de energia para o seu crescimento e metabolismo. Ao longo desta fase, acumulam P, que se encontra no meio, armazenando-o sob a forma de grânulos de polifosfato. (Fig. 1.2, 1. Introdução) (Oehmen, *et al.*, 2007).

Esta relação entre a fisiologia de C e do P em bactérias acumuladoras de P foi observada tanto à escala laboratorial como em estações de tratamento de águas residuais operadas com ciclos de EBPR. O organismo mais conhecido em EBPR é uma bactéria não isolada, a *Accumulibacter*, pertencente à classe β -Proteobacteria (Burow *et al.*, 2008). No entanto, é possível que outros organismos possam ter esta capacidade se dadas as condições adequadas para a libertação/acumulação de P. Outro organismo, que possivelmente pode apresentar uma relação entre os grânulos de polifosfato e de polímero é a *C. necator*, uma outra β -Proteobacteria (Lu *et al.*, 2016). Foi identificada a presença de grânulos de polifosfato em células de *C. necator* que se encontram na vizinhança de grânulos de polímero. (Beeby *et al.*, 2012; Tumlirsch *et al.*, 2015). Esta bactéria é há muito anos estudada e usada como referência pela sua capacidade de produção de PHA, normalmente recorrendo a condições totalmente arejadas (Grousseau *et al.*, 2013; Lu *et al.*, 2016). No entanto, é possível que a *C. necator* seja também capaz de armazenar quantidades elevadas de polifosfato quando sujeita a condições adequadas para EBPR (condições de anaeróbias/aeróbias), o que poderia ser interessante dadas as elevadas quantidades de PHA que pode armazenar em comparação com a *Accumulibacter*.

De forma a compreender a possível existência de uma relação entre a acumulação de grânulos de polifosfato e de PHA, pela *C. necator*, foram realizados testes num SBR operado com condições EBPR, o que nunca foi reportado anteriormente. Foram realizados cinco ensaios (Reatores: A, B, C, D e E), onde foram testadas diferentes condições de operação, tais como diferentes concentrações de nutrientes no meio de cultivo (P e N), a influência do oxigénio dissolvido no meio, bem como a duração das fases do ciclo.

2.1. Materiais e Métodos

2.1.1. Microrganismo: Preparação do pré-inóculo – Reativação da Cultura

A estirpe usada nos ensaios do Capítulo 2 foi a *Cupiravidus necator* DSM 428, que se encontrava preservada em pequenos círculos de papel de filtro (3 mm de diâmetro). A cultura foi reativada a partir da inoculação de 2/3 papéis de filtro em 200 mL de meio LB constituído por: peptona (10,0 g/L), extrato de levedura (5,0 g/L) e NaCl (10,0 g/L), previamente esterilizado na autoclave (121 °C, 1 bar). O pré-inóculo foi incubado num shaker a 200 rpm e 30°C, durante 48 h. O mesmo método foi usado na preparação de cada pré-inóculo usado nos ensaios em SBR (Reatores: A, B, C, D e E).

2.1.2. Meios de cultivo

O meio de cultivo usado nos ensaios em SBR (Reatores: A, B, C, D e E) foi o Meio E*, constituído por: K_2HPO_4 , KH_2PO_4 e $(NH_4)_2HPO_4$, no entanto foram usadas diferentes concentrações dos componentes para cada ensaio (Tabela 2.1). Em todos os ensaios, o meio continha 100 mM de $MgSO_4$ (10 mL de $MgSO_4$ /L de meio de cultivo) e com 10 mL de solução de micronutrientes por 1,0 L de meio de cultivo. A solução de micronutrientes era constituída por: $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (2,78 g), $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ (1,98 g), $CoSO_4 \cdot 7H_2O$ (2,81 g), $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (1,67 g), $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ (0,17 g) e $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,29 g) por 1,0 L de 1 N HCl. Além desses componentes, o meio foi suplementado com a fonte de carbono que foi extrato de levedura (1,0 g/L) no Reator A, e CH_3COONa nos restantes (0,10 g/L no Reator B e 0,30 g/L nos Reatores C, D e E).

Tabela 2.1: Diferentes componentes usados na preparação dos meios de cultivo dos ensaios.

Reator	Componentes (g/L)			
	K_2HPO_4	KH_2PO_4	$(NH_4)_2HPO_4$	Fonte de Carbono
A	5,80	3,70	3,30	1,00 - Extrato de levedura
B	5,80	3,70	3,30	0,10 - CH_3COONa
C	0,58	0,37	3,30	0,30 - CH_3COONa
D	-	-	1,98	0,30 - CH_3COONa
E	-	-	1,00	0,30 - CH_3COONa

2.1.3. Operação do reator

Os ensaios foram realizados com um volume de trabalho de 1 L de meio E* suplementado com os diferentes constituintes para cada ensaio, no bioreactor (BioStat®B-Plus, Sartorius). O pH e a temperatura foram controlados a $7,0 \pm 0,1$ e a $30 \pm 0,1$ °C, respetivamente. O pH foi controlado pela adição automática das seguintes soluções: 1 M de NaOH ou 1 M de HCl. Os diferentes ensaios foram operados em modo SBR, o reator A com ciclos de anaerobiose/aerobiose e os restantes reatores (B, C, D e E) com ciclos de microaerofilia/aerobiose. Na Fig. 2.1 estão representados os esquemas dos ciclos SBR aplicados em cada ensaio. Em todos os ciclos, havia

entrada de solução de alimentação (com duração de 14 min no Reator A e B e nos restantes 5 min) no início da fase anaeróbia/microaerofílica, seguida da fase aeróbia, no final da qual era efetuada a purga do reator (14 min no Reator A e B e 5 min nos Reactores C, D e E). O volume da alimentação era igual ao da purga (300 mL Reator A e B e 100 mL nos Reactores C, D e E). Durante a purga, dava-se início ao borbulhar do meio de cultivo com azoto. O controlo do pO₂ durante a fase microaerofílica era feito a partir da agitação (entre 200 e 400 rpm), com o *setpoint* estabelecido a 1%. Foram realizadas amostragem para acompanhar o comportamento da *C. necator* ao longo do ciclo, nos diferentes ensaios.

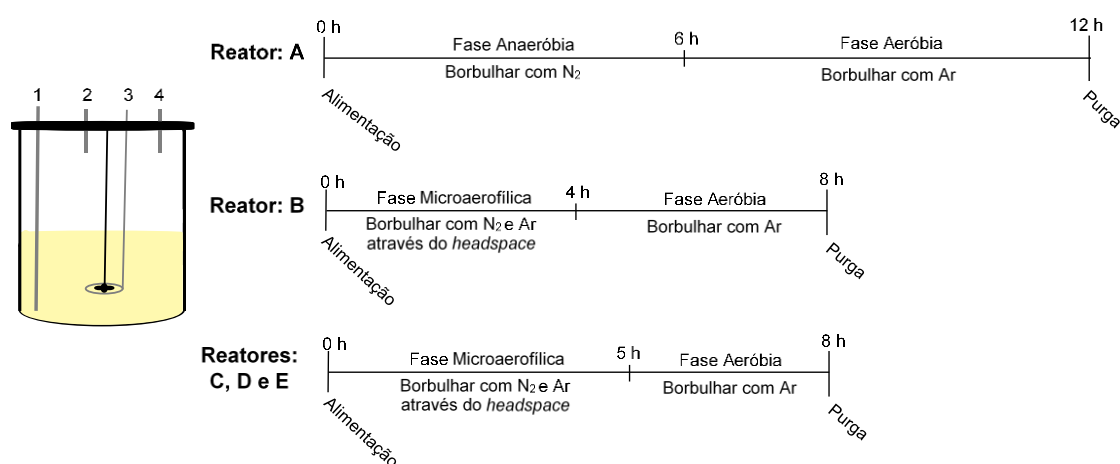


Figura 2.1: Representação dos diferentes ciclos de SBR, usados nos diferentes ensaios: 1 - Purga; 2 - Alimentação; 3 - Borbulhar com N₂ ou ar, conforme a fase e 4 - ar através do *headspace*, durante a fase microaerofílica (Reator B, C, D e E).

2.1.4. Técnicas analíticas

2.1.4.1. Determinação do crescimento celular

O crescimento celular foi acompanhado a partir da variação da densidade ótica, medida ao comprimento de onda de 600 nm (DO_{600nm}). No início da medição era traçado o branco, com água desionizada, após isso era realizada a leitura das amostras com diluição de 1:2 no espectrofotómetro (ThermoSpectonic).

2.1.4.2. Quantificação do carbono

No reator A, a determinação da concentração de carbono no sobrenadante foi realizada a partir da análise de carbono total orgânico (*total organic carbon*, TOC). Este método consiste na medição da concentração de dióxido de carbono, após a oxidação catalítica dos compostos de carbono através de elevadas temperaturas (680 °C), num ambiente rico em oxigénio. (TOC-VCSH Shimadzu) ("TOC Applications Handbook"; site consultado: www.ssi.shimadzu.com). As amostras foram diluídas (1:10), com água MilliQ perfazendo um volume total de 10 mL. Os padrões encontram-se definidos no sistema, com concentrações entre 20 e 500 mg/L.

Nos restantes reatores, a determinação da concentração da fonte de carbono (acetato) foi realizada por *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC). As análises foram realizadas na coluna Biorad acoplada com um detetor infravermelho a 50 °C, o eluente usado foi o ácido sulfúrico (H₂SO₄, 0,01 N) com caudal de 0,60 mL/min. A preparação dos padrões de acetato de sódio foi feita com uma concentração de 0,50 g/L, sucessivamente diluída para concentrações de 0,25 g/L, 0,13 g/L, 0,06g/L e 0,03 g/L. Na preparação das amostras, o sobrenadante foi diluído (1:5) com ácido sulfúrico (H₂SO₄, 0,01 N) e filtradas, com filtradas com filtros de 0,20 µm (Whatman).

2.1.4.3. Quantificação de N e P no sobrenadante

A determinação da concentração de N e P no sobrenadante foi feita a partir de um método colorimétrico de fluxo segmentado (Skalar 5100, Skalar Analytical, The Netherlands). As amostras foram diluídas (1:200) com água MilliQ e analisadas. Como padrões foram usados NH₄Cl (Sigma) e K₂HPO₄ (Sigma), que apresentavam as seguintes concentrações: 20, 16, 12, 8 e 4 mg/L.

2.1.4.4. Determinação do conteúdo de P na biomassa

Nas amostras do reator E foi determinado o conteúdo de P na biomassa. A preparação dessas amostras consistiu na hidrólise de 1-2 mg de biomassa liofilizada com 5 mL de ácido sulfúrico a 100 °C, durante 1,50 h. Após a hidrólise, 3 mL de amostra foi centrifugada a 12 000 rpm (VWR, MicroStar), durante 2 min e filtradas com filtros 0,45 µm (Whatman). O sobrenadante foi usado diretamente para a determinação da concentração de P feita a partir do método colorimétrico (Skalar 5100, Skalar Analytical, The Netherlands). Como padrão foi usado K₂HPO₄, que apresentavam as seguintes concentrações: 20, 16, 12, 8 e 4 mg/L.

2.1.4.5. Quantificação e composição do conteúdo de polímero na biomassa

A concentração de PHA e a sua composição foi determinada a partir da hidrólise da biomassa liofilizada (2-5 mg) em 1 mL de metanol ácido (20,0% de ácido sulfúrico v/v) e 1 mL de clorofórmio, que continham heptdecano (HD), que funcionou como padrão interno para cada amostra (1,0 g/L). A hidrólise foi realizada a 100 °C, durante 3,50 h. Após a hidrólise, os tubos foram deixados a arrefecer até à temperatura ambiente, após o que foi adicionado 1 mL de água desionizada, de modo a separar as duas fases, orgânica e aquosa. A fase de inferiora (orgânica), contendo os monómeros metilados do polímero, foi extraída (1,0 mL) para *vails* de cromatografia gasosa (*Gas Chromatography*, GC). As amostras foram analisadas, a partir da injeção de 2 µL, usando hélio com gás transportador, a uma pressão constante (14,51 psi), durante 32 min de corrida. Como a temperatura do detetor é 230 °C, ocorre um aumento de temperatura ao longo da corrida. Entre 0 e 3 min a velocidade de aquecimento é 20 °C/min até 100 °C, entre 3 e 21 min a velocidade de aquecimento é 3°C/min até 155 °C e entre 21 e 32 min a velocidade de aquecimento é 20 °C/min até 220 °C. Os padrões de PHB-HV (HB: 88% e HV: 12%) de GC foram preparados com uma concentração de 2,0 g/L, 1,0 g/L, 0,5 g/L 0,25 g/L e 0,13 g/L, com diluições sucessivas (1:2) com clorofórmio, que continham HD.

2.1.4.6. Coloração por Azul de Nilo

No ensaio com o reator B, realizou-se coloração com azul do Nilo segundo a metodologia de Ostle *et al.*, (1982), para acompanhar a variação do conteúdo de PHA. Na preparação das

amostras, era adicionado 50 µL de solução aquosa de 1% de azul do Nilo às amostras do reator (1 mL) e durante 10 min eram submetidas a 50 °C. De seguida eram preparados os slides em se adicionava 20 µL e eram visualizadas por fluorescência

(comprimento de onda igual a 450 nm) no microscópio (Zeiss Imager D2 a 10x100). 2.2. Resultados e Discussão

2.2.1. Reator A

Numa primeira tentativa de compreender o funcionamento de armazenamento de P por parte da bactéria *C. necator*, o reator A, foi operado sob condições normalmente utilizadas por PAOs, um regime *SBR*. Os ciclos de operação tinham a duração de 12 h, sendo as primeiras 6 h de anaerobiose, seguidas de 6 h de aerobiose. Como meio de cultivo, foi utilizado o Meio E* (secção 2.1.2. Meio de cultivo), suplementado com extrato de levedura (1,0 g/L) como fonte de carbono. O extrato de levedura foi utilizado como fonte de carbono, devido aos seus constituintes, como diversos aminoácidos, péptidos e nutrientes ("Sigma Yeast Extract Agar"; site consultado: www.sigmaaldrich.com), que poderiam ser utilizados pela *C. necator*, durante a fase anaeróbia. O meio continha K_2HPO_4 , KH_2PO_4 e $(NH_4)_2HPO_4$ como fontes de P e N, cujas concentrações eram de 85,4 mM e 50,0 mM, respetivamente. O reator era alimentado com 0,3 L de meio de cultivo, perfazendo 1,0 L no início de cada ciclo (Fig. 2.1).

O reator A foi operado durante 15 dias. Foi realizada uma amostragem ao longo do ciclo no 7º dia de operação do *SBR*. Com objetivo de perceber se o carbono era consumido, este nutriente foi quantificado pela determinação de TOC no sobrenadante das amostras recolhidas, sendo também avaliado o crescimento da cultura através da medição de DO ao longo do ciclo. Através da análise da Fig. 2.2, pode-se observar que não ocorreu uma variação significativa da concentração de carbono ou da DO durante a fase anaeróbia, indicando que não houve crescimento celular nem consumo de substrato durante esta fase. No entanto, após o início da fase aeróbia, ocorreu um aumento de DO durante as duas primeiras horas, com uma diminuição da concentração de carbono (4,6 mM). Estes dados indicam que apenas houve crescimento e consumo da fonte de carbono durante a fase aeróbia do ciclo, o que não promove a acumulação de P por parte das células. Não foi possível a quantificação de PHA na biomassa devido à reduzida concentração celular atingida ao longo dos 15 dias de operação. Por esta razão, concluiu-se que este regime de operação não era o mais indicado, para o estudo e compreensão da acumulação de P por parte da *C. necator*.

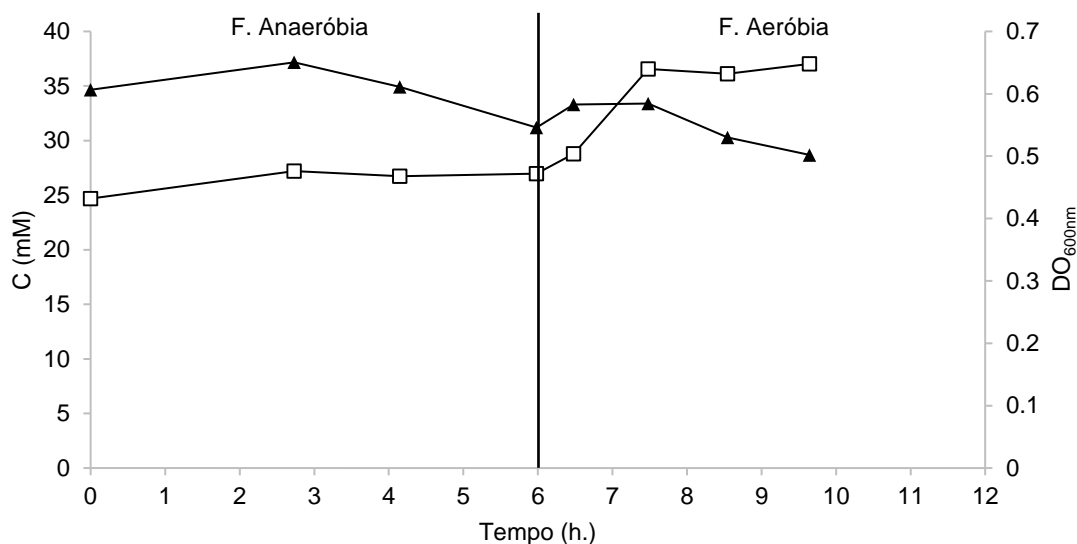


Figura 2.2: Variação da concentração de carbono (▲) e de DO (□) ao longo de um ciclo de operação do reator A (dia 7).

2.2.2. Reator B

O reator B sofreu algumas alterações em relação ao reator A. Durante a operação deste SBR, foi utilizado acetato de sódio como fonte de carbono. O acetato é um composto abundante em águas residuais e é conhecido como um dos substratos preferenciais da *Accumulibacter* para produção de PHA e subsequente armazenamento de P. (Oehmen, *et al.*, 2007). Foram aplicados ciclos de 8h, que são normalmente utilizados em sistemas de remoção de nutrientes. Como a duração de cada ciclo afeta o desempenho do sistema, optou-se por usar um sistema semelhante (Casellas *et al.*, 2006; Kargi *et al.*, 2005). Durante as primeiras 4h do ciclo, tentou-se criar um ambiente microaerófilo, nomeadamente uma concentração de oxigénio dissolvido de aproximadamente zero. Esta estratégia foi sugerida pelo Prof. Dieter Jendrossek (Universidade de Estugarda, Alemanha) em comunicação pessoal, de modo a promover o consumo de fonte de carbono nesta fase. Na fase microaerófila era borbulhado N₂ no meio de cultivo e injetado ar para o *headspace* do reator (secção 2.1.3. Operação do reator, Fig. 2.1). Segundo Carvalho *et al.*, (2012), em condições de microaerofilia nomeadamente pO₂ aproximadamente 2%, *C. necator* apresenta crescimento celular e acumulação de polímero. No entanto, é requerida mais energia pelas células, apresentando rendimentos baixos de produção de polímero (19%) (Carvalho *et al.*, 2012).

A Fig. 2.3 mostra a tentativa de criar as condições microaerófilas, no início do SBR. No início do teste do reator B (dias 2 e 3), observou-se ser difícil controlar o arejamento através do *headspace* de forma a conseguir uma percentagem próxima de zero. Analisando o gráfico B1 (dia 2), pode-se observar que houve consumo da maior parte do carbono durante as primeiras 2 h da fase microaerófila, mas provavelmente devido à presença de oxigénio dissolvido, cuja a concentração variou entre 0-20% (gráfico B1.1). No entanto, não se observaram alterações significativas da DO ao longo do ciclo, o que pode ser devido ao carbono ser maioritariamente utilizado para a acumulação de polímero e manutenção, dados os gastos energéticos maiores com

a acumulação de carbono em microaerofilia. Contudo a quantificação de PHA nas células por GC não foi possível devido ao facto de o reator não ter atingido concentração de biomassa suficiente para a realização da análise. No 3º dia de operação, ao se observar o gráfico B2, verifica-se que o consumo de carbono durante a fase microaerofílica foi mais lento, em relação ao 2º dia. Esta diminuição deveu-se ao menor pO_2 (aproximadamente zero) presente no reator nessa fase (gráfico B2.1) devido ao controlo mais apurado deste parâmetro. Durante a fase microaerofílica, no gráfico B2, observa-se um aumento de DO, indicando que houve crescimento durante esta fase, que depois se manteve constante ao longo da fase aeróbia. A microaerofilia proporcionou um maior crescimento celular, porém, continuou a ser reduzido ao longo dos ciclos, durante os 20 dias de operação do SBR. Como, se pode ver no 11º dia de operação (Fig. 2.4), a variação do consumo de carbono e de DO são semelhantes ao 3º dia de operação. Através da coloração das células com azul do Nilo (Fig. 2.5), foi possível verificar que estas continham polímero e parece haver aumento de conteúdo de PHA nas células durante a fase microaerofílica. Na Fig. 2.5 é notável uma diminuição do conteúdo em polímero durante a fase aeróbia, sendo que provavelmente houve consumo de PHA durante esta fase.

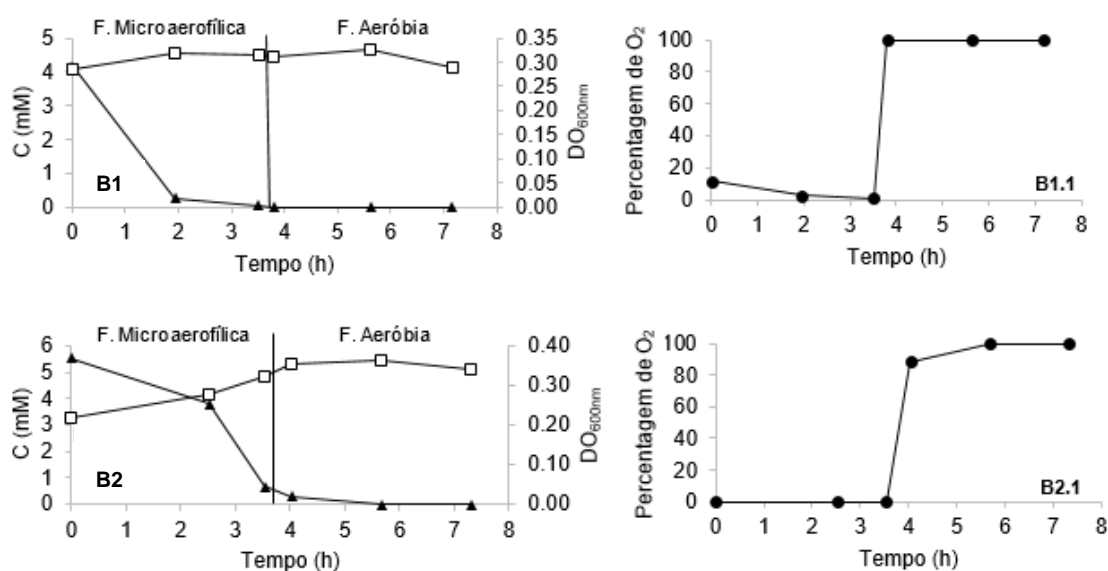


Figura 2.3: **B1:** Variação da concentração de carbono (▲) e de DO (□) ao longo de um ciclo de operação do reator B (dia 2), e variação do pO_2 (**B1.1**), no respetivo ciclo; **B2:** Variação da concentração de carbono (▲) e de DO (□) ao longo de um ciclo de operação do reator B (dia 3); e variação do pO_2 (**B2.2**), no respetivo ciclo.

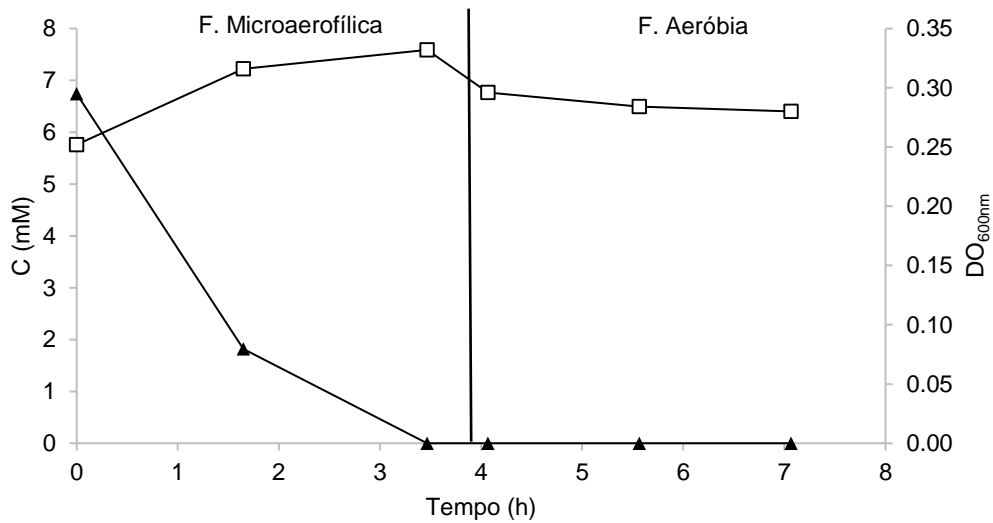


Figura 2.4: Variação da concentração de carbono (▲) e de DO (□) ao longo de um ciclo de operação do reator B (dia 11).

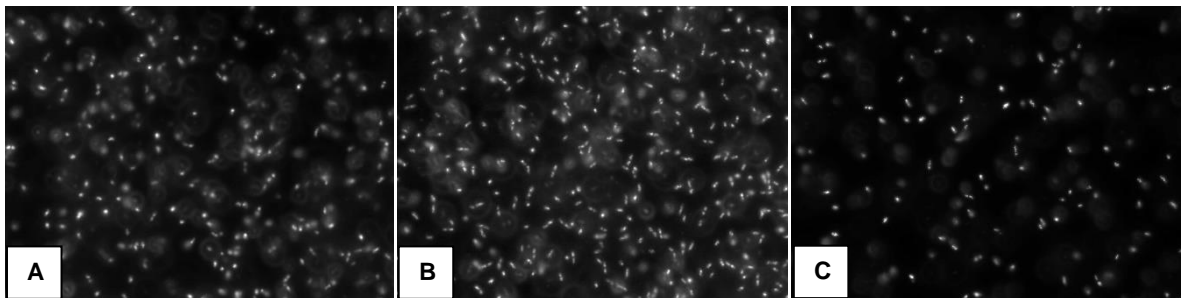


Figura 2.5: Coloração das células de *C. necator* com azul do Nilo, no início da fase microaerófila (A), no início da fase aeróbia (B), no fim da fase aeróbia (C), ao longo do ciclo de operação do reator B (dia 11) (10x100) Zeiss Imager D2 a 1000 X.

2.2.3. Reator C

De forma, a compreender melhor o comportamento da cultura durante os ciclos, era necessário atingir uma maior concentração de biomassa, para que se pudesse quantificar a variação da concentração de polímero, ao longo dos ciclos. Para tal, no reator C o volume da purga foi reduzido para 100 mL, para que esta não tivesse um impacto negativo na concentração celular. Foi, também, diminuída a concentração de P (de 85,4 para 31,0 mM), no meio. Com esta diminuição pretendeu-se observar se ocorria alguma alteração da concentração de P presente no sobrenadante. Ryu *et al.*, (1997) testaram diferentes concentrações de P, entre 70,97 – 177,42 mM, e observaram, que a concentração limitante apresentou maior produção de PHB. Contudo foi

testado em condições de operação eram diferentes das do reator C (Ryu *et al.*, 1997). Outro teste realizado com a *C. necator*, refere que concentrações limitantes de P (16,13 mM) têm um impacto positivo no crescimento e acumulação de PHB (Shang *et al.*, 2007). Devido ao volume de alimentação ter sido reduzido ($V_{\text{Alimentação}} = V_{\text{Purga}}$) e como a maior parte do carbono foi consumida durante a fase microaerófila no reator B, a concentração de carbono foi aumentada para 0,3 g/L. A duração da fase microaerófila foi, também, aumentada para 5 h e a fase aeróbia reduzida para 3 h. Posto isto, pretendia-se obter uma maior concentração celular, bem como uma cultura enriquecida numa população que apresentasse a capacidade de consumir carbono durante a fase microaerófila.

O reator C esteve em funcionamento durante 25 dias, sendo acompanhado o ciclo do 20º dia de operação. A partir da análise dos dados da Fig. 2.6, a DO ao longo da fase microaerófila apresentou uma ligeira subida de 2,16 para 2,21. Comparando estes dados, com os da Fig. 2.7, a ligeira subida da DO na primeira fase do ciclo deveu-se ao consumo de 4,3 mM de carbono, tendo havido uma redução do conteúdo de polímero na biomassa de 25,1% para 21,7%. Contudo, ocorreu maior subida na primeira hora da fase aeróbia, seguida de uma diminuição gradual ao longo desta fase, a partir das 6 h do ciclo. Essa primeira variação deveu-se ao aumento do conteúdo em polímero e ao consumo do restante carbono. Não se observou acumulação de PHB na fase microaerófila, porque o carbono foi essencialmente usado para crescimento celular. Na primeira hora da fase aeróbia, verificou-se o consumo do carbono todo e um aumento significativo da percentagem de polímero nas células (até 29,8%). Essa acumulação de PHB justifica o aumento da DO observado no início da fase aeróbia. Ao longo desta fase, como o meio não tinha carbono presente, o PHB foi provavelmente utilizado como fonte de energia, por parte das células, pelo que a DO diminuiu ao longo das duas últimas horas da fase aeróbia. Apesar da aparente diminuição da concentração de P no sobrenadante na fase microaerófila, de 29,7 para 27,4 mM (Fig. 2.8), essa diminuição não foi muito significativa e possivelmente deve-se só a utilização para crescimento. Estes dados indicam que a maior parte do carbono foi consumido na fase aeróbia. A concentração celular foi maior, comparando com os reatores A e B. No entanto, o crescimento celular continuou a ser baixo e conseqüente a quantidade de P que as células conseguiram consumir era baixo. As alterações efetuadas no reator C mostraram, aspetos positivos, como o aumento da concentração celular, que possibilitou a determinação da variação do conteúdo em polímero ao longo do ciclo. No entanto, a concentração de P no meio de cultivo, talvez fosse muito elevada, relativamente à concentração celular atingida, para que se pudesse observar uma variação ao longo do ciclo.

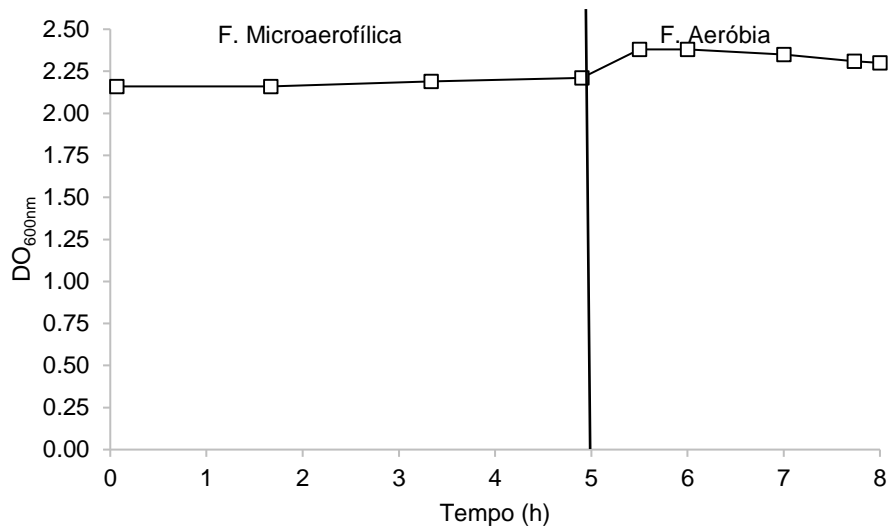


Figura 2.6: Variação da de DO (□) ao longo de um ciclo de operação do reator C (dia 20).

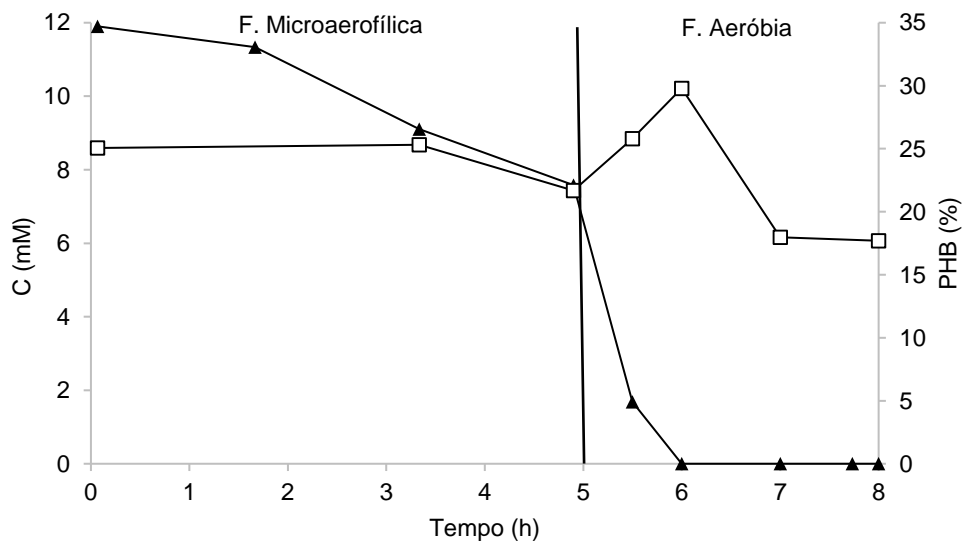


Figura 2.7: Variação da concentração de carbono (▲) e da quantidade de PHB (□) ao longo de um ciclo de operação do reator C (dia 20).

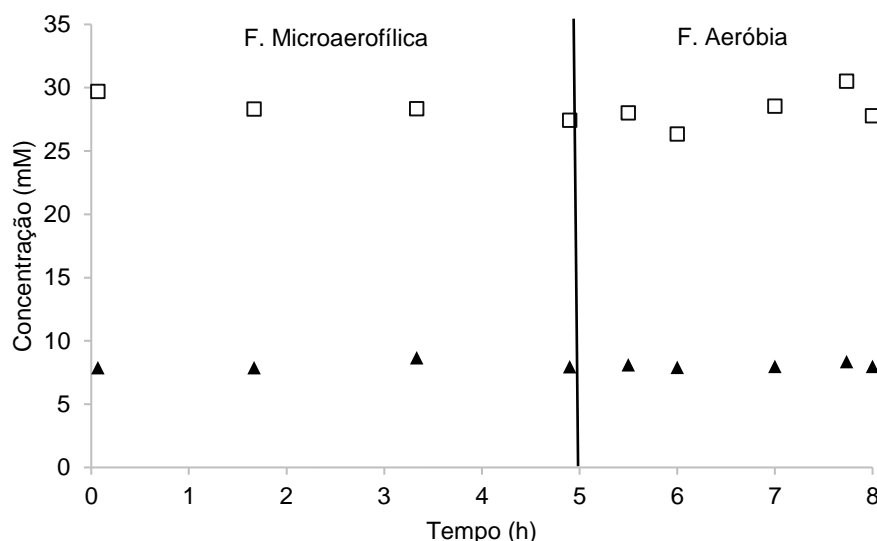


Figura 2.8: Variação da concentração de N (▲) e de P (□), no sobrenadante ao longo de um ciclo de operação do reator C (dia 20).

2.2.4. Reator D

O reator D esteve a operar durante 12 dias. Em relação ao reator C, sofreu apenas uma alteração no meio de cultivo, nomeadamente a redução da concentração de P. Foi utilizado $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ como suplemento de nutrientes (P e N), com uma concentração de 24,9 mM e 50,0 mM, respetivamente (secção 2.1.2. Meio de cultivo). Foi realizada uma amostragem no 9º dia de operação. Na Fig. 2.9 observou-se um aumento da DO ao longo da fase microaerofílica, de 1,84 para 2,12, que foi concomitante com o consumo de carbono (5,5 mM) e a acumulação de PHB (Fig. 2.10). Durante a fase aeróbia foram consumidas 2,0 mM de carbono, a maioria foi consumida na primeira hora, atingindo no final do ciclo, uma acumulação de polímero na biomassa de 50% de PHB.

A variação do conteúdo de polímero nas células pode-se observar na Fig. 2.9 e na Fig. 2.10, que variou de forma semelhante à DO e ao longo ciclo. Na fase microaerofílica houve um aumento de 28,9% para 38,9% e na fase aeróbia de 38,9% para 49,6%, aproximadamente 10% em ambos. Com a diminuição da concentração de P, pretendia-se tornar detetável uma variação da concentração de P no sobrenadante, anteriormente mascarada pela concentração muito elevada de P no meio. No entanto, a concentração de P foi praticamente constante ao longo ciclo (Fig. 2.11). A redução da concentração de P parece ter tido impacto no crescimento da cultura e no consumo de carbono durante a fase microaerofílica. Houve maior consumo de carbono, ao longo da fase microaerofílica (5,6 mM), neste SBR em comparação ao reator C (4,3 mM). Contudo, não foi possível comprovar que ocorresse acumulação de P por parte da *C.necator*.

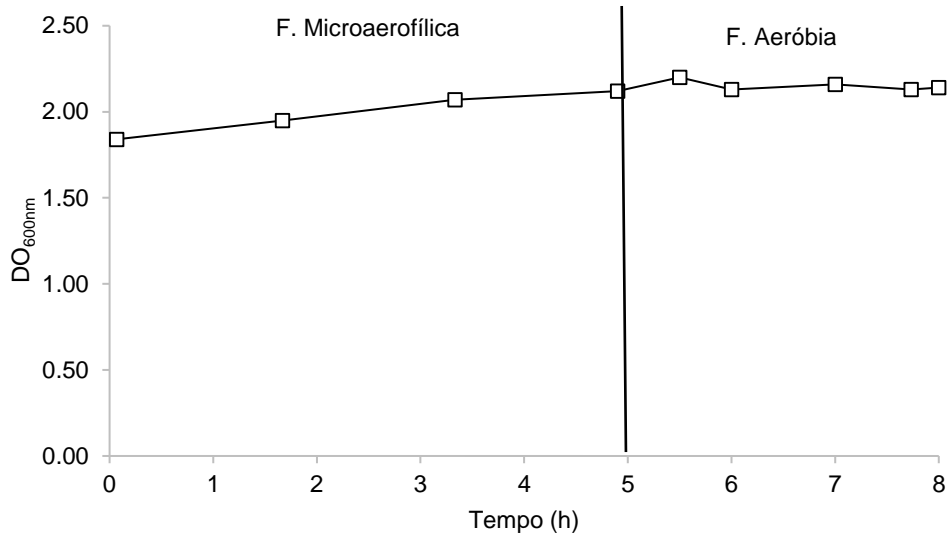


Figura 2.9: Variação da de DO (□) ao longo de um ciclo de operação do reator D (dia 9).

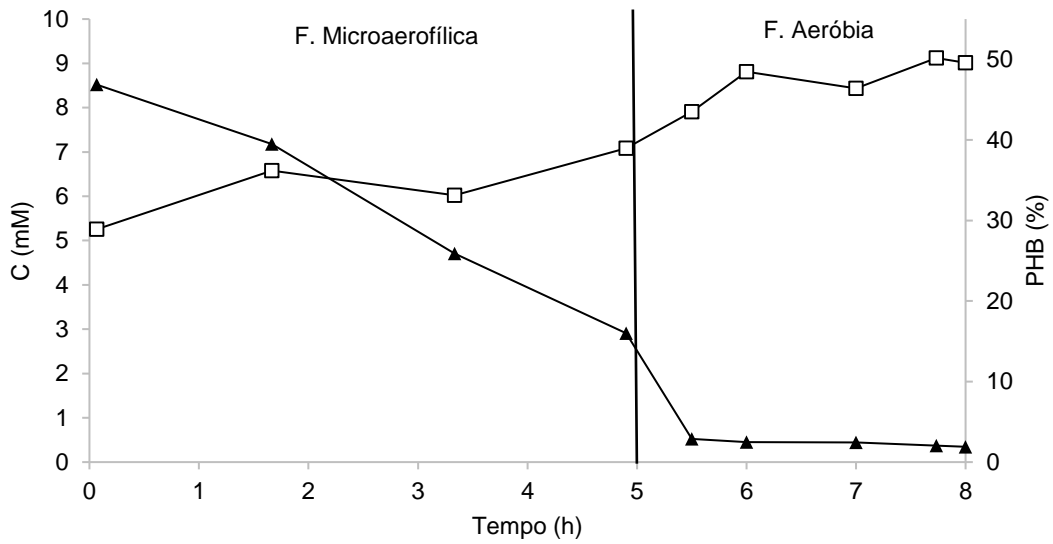


Figura 2.10: Variação da concentração de carbono (▲) e da quantidade de PHB (□) ao longo de um ciclo de operação do reator D (dia 9).

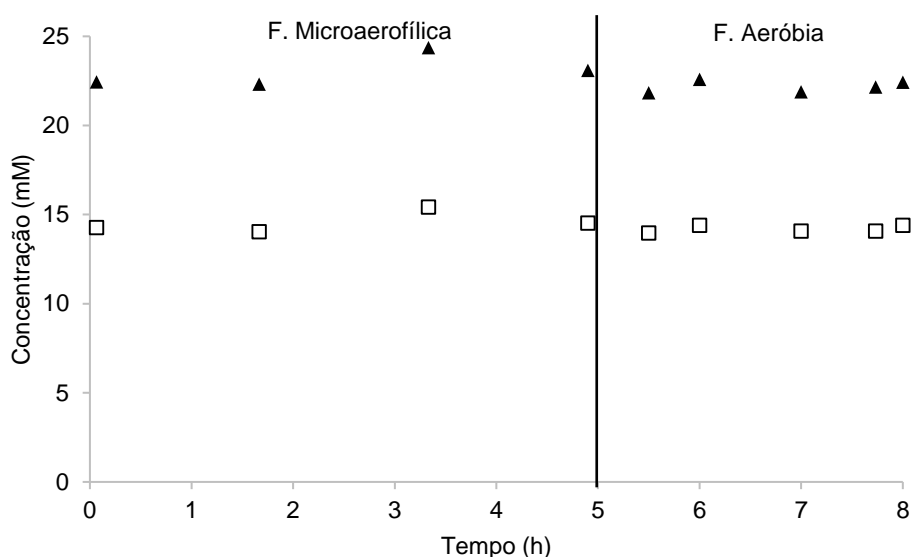


Figura 2.11: Variação da concentração de N (▲) e de P (□), no sobrenadante ao longo de um ciclo de operação do reator D (dia 9).

2.2.5. Reator E

Este SBR (reator E) foi a continuação da operação do reator D, que tinha uma concentração de P e N 24,9 mM e 50,0 mM, respetivamente. O meio de alimentação foi alterado no 12º dia de operação, com a redução da concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, correspondendo a 7,6 mM de P e 15,2 mM de N. Realizou-se uma amostragem no 23º dia de operação. Na Fig. 2.12, observou-se apenas um aumento da DO na fase aeróbia, que não ocorreu ao longo da fase microaerofílica, como tinha ocorrido nos reatores anteriormente. Durante a fase microaerofílica, não houve uma alteração significativa da DO, havendo apenas um consumo de carbono muito baixo (0,5 mM) nesta fase (Fig. 2.13). Contudo, o carbono consumido foi utilizado pela *C. necator* para a acumulação de PHB, entre as 2-3 h do ciclo, que aumentou de 29,4 para 37,3%. Nas duas horas finais da fase microaerofílica, o polímero acumulado foi utilizado como fonte de energia, sendo reduzindo para 20,8%. O carbono foi todo consumido ao longo das duas horas iniciais do ciclo aeróbio, havendo um aumento da percentagem de PHB presente na biomassa (26,8%). Como na última hora da fase aeróbia o meio não tinha carbono, as células usaram o polímero para crescimento celular, que se pode observar na Fig. 2.12.

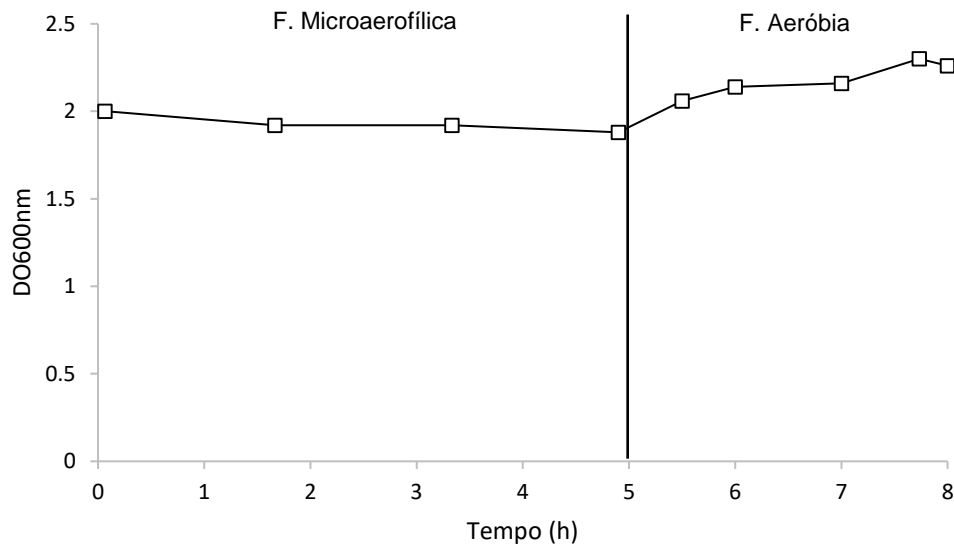


Figura 2.12: Variação da de DO (□) ao longo de um ciclo de operação do reator E (dia 23).

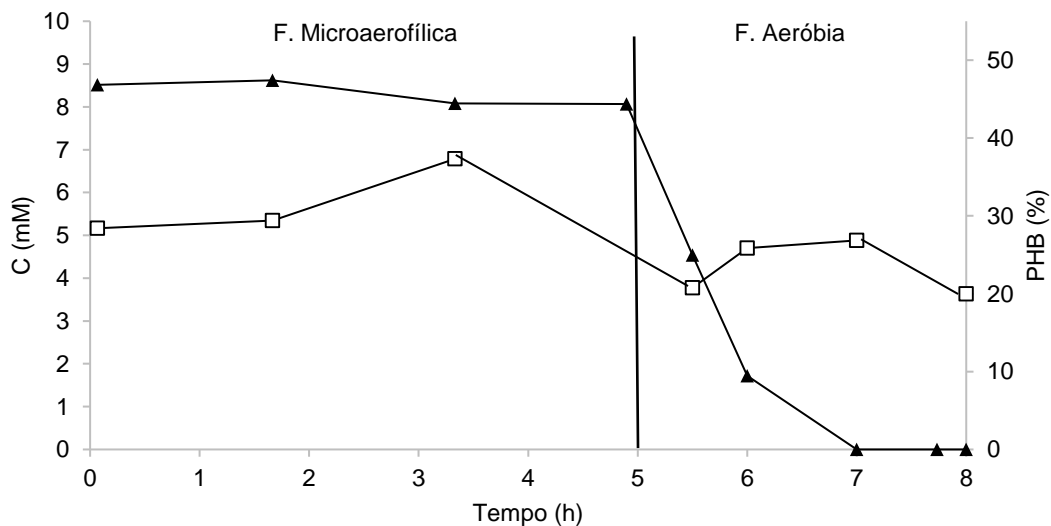


Figura 2.13: Variação da concentração de carbono (▲) e da quantidade de PHB (□) ao longo de um ciclo de operação do reator E (dia 23).

Na Fig. 2.14, a variação da percentagem de P na biomassa foi semelhante à variação da percentagem de polímero ao longo da fase aeróbia, havendo um valor máximo de acumulação de 3,5% de P às 7,73 h do ciclo. Como houve uma variação semelhante, pode-se afirmar, que provavelmente exista uma relação entre a acumulação de polímero e a acumulação de P. Na Fig. 2.15, o P presente no sobrenadante apresentou um comportamento concordante com a variação do conteúdo de P (%) na biomassa (Fig. 2.14), ao longo do ciclo. Quando ocorreu acumulação de P entre as 5,50 e as 7,73 h, na fase aeróbia, houve uma diminuição de 2,4 mM de P no sobrenadante. Num teste realizado com a *C. necator*, sob condições diferentes (arejamento constante de ar), foi demonstrado um consumo de 0,04 mM de P, durante a fase de crescimento

celular. Nessa fase a cultura não demonstrou acumulação de PHB, ocorrendo apenas durante a fase estacionária (Chakraborty *et al.*, 2012). Segundo Tumlirsch *et al.*, (2015) a bactéria *E. coli*, também demonstra uma conexão fisiológica entre o metabolismo dos grânulos de PHB e os de polifosfato. A *E. coli* em comparação aos resultados da *C. necator* apresenta maior capacidade de acumulação de P, 20,0 mM, mas menor capacidade de produção de PHA (Rao *et al.*, 1998). Os valores referidos anteriormente são semelhantes aos resultados obtidos para a *C. necator* neste estudo. A partir da Fig. 2.14, observa-se que a *C. necator* mostrou uma oscilação de valores de P presente na biomassa entre 2,6% e 3,5%, ao longo do ciclo. Como a cultura se encontrava em condições severas durante a fase microaerofílica ($pO_2=0\%$), as células necessitavam de mais energia. Contudo, apresentando assim um valor de P nas células relativamente constante durante esta fase. Durante a fase aeróbia, como se encontrava em condições mais favoráveis para o seu crescimento, observou-se uma oscilação de P (%) maior. Contudo, essa oscilação foi semelhante à variação de PHB, como referido anteriormente. Como o polifosfato é uma reserva de energia, pode ser regulado através de uma resposta de *stress* ou necessidade por parte da célula (Achbergerová *et al.*, 2011). Essa variação provavelmente deveu-se à necessidade de energia por parte da célula, para acumulação/consumo de PHB, ao longo da fase aeróbia. Contudo, a acumulação de P da *C. necator* foi baixo, comparando à capacidade que a *Candidatus accumulibacter phosphatis*, que são usadas em processos de remoção de P. Segundo Hui *et al.*; (2014) *C. accumulibacter phosphatis*, apresentou capacidade de remoção máxima de aproximadamente 90% do P presente na água. Essa remoção correspondeu aproximadamente 7,5% de P presente na biomassa, quando se encontrava estável (Hui *et al.*, 2014). Segundo, Oehmen *et al.*, (2007), as *Accumulibacter* podem conter entre 7 e 17% de P em TSS. A utilização da *C. necator* em sistemas não apresenta viabilidade no processo de remoção de P.

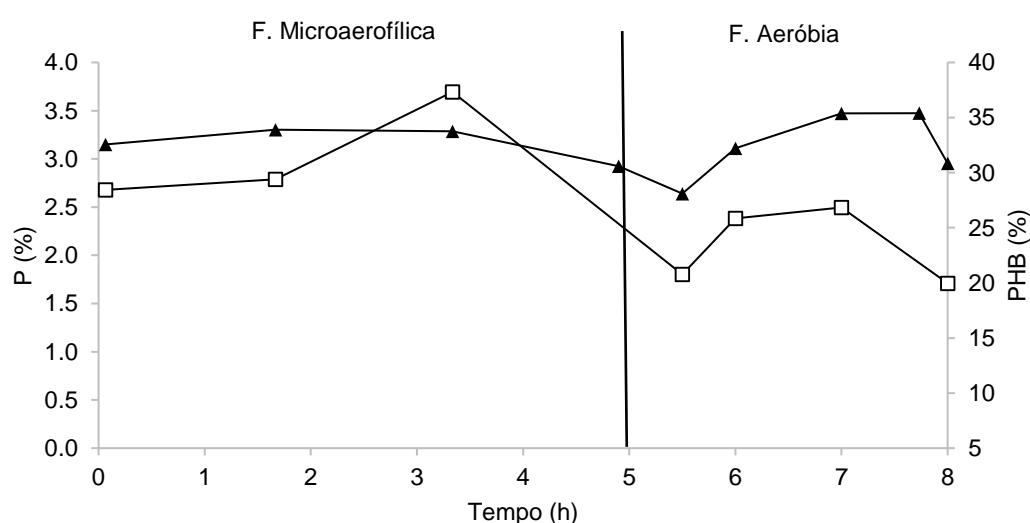


Figura 2.14: Variação do conteúdo de P (▲) e de PHB (□) na biomassa ao longo de um ciclo de operação do reator E (dia 23).

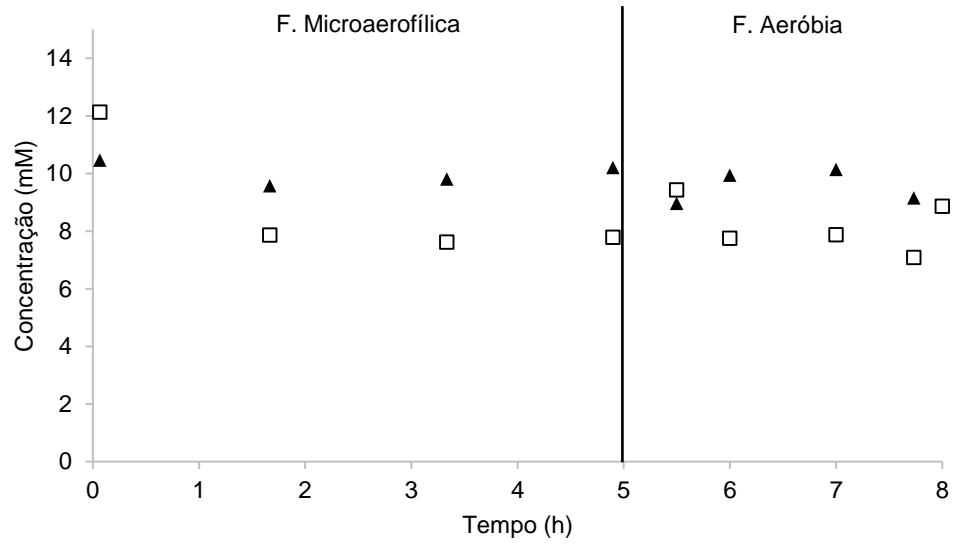


Figura 2.15: Variação da concentração de N (▲) e de P (□), no sobrenadante ao longo de um ciclo de operação do reator E (dia 23).

2.3. Conclusões

Em suma, o modo de operação utilizado neste estudo (SBR com ciclo de anaerobiose ou microaerofilia/aerobiose) não foi o mais favorável para a compreensão de uma possível relação entre a acumulação de grânulos de polifosfato e de polímero pela bactéria *C. necator*. O principal problema, que foi notável ao longo dos ensaios foi a baixa concentração celular. A cultura não se encontrava em condições favoráveis para o seu crescimento. Na maioria dos ensaios apresentava ligeiro crescimento de biomassa, durante a fase microaerofílica. A utilização da microaerofilia possibilitou uma melhoria do crescimento, relativamente aos ensaios em que a fase era anaeróbia, mas, mesmo assim, não foram atingidas densidades celulares suficientemente elevadas para a realizar o estudo. As condições mais favoráveis para o crescimento e estudo de *C. necator* descritas pela literatura envolvem geralmente a utilização de condições aeróbias (pO_2 superior a 30%), e de facto não foi possível promover o consumo de substrato em condições anaeróbias/microaerofílicas a níveis suficientes para sustentar o processo EBPR.

É possível também que os meios de cultivo utilizados nestes ensaios não fossem os mais apropriados para o estudo. No entanto, meios de cultivo com estas características ou semelhantes são utilizados no cultivo da *C. necator*, em modo *batch* ou *fed-batch*. A utilização de concentrações limitantes de P e/ou N são usadas nesses modelos, que apresentam elevado rendimento de crescimento celular e produção de PHA. No entanto, ao longo dos ensaios foi possível observar diferentes comportamentos por parte da cultura, em resposta às diferentes concentrações de nutrientes (N e P) utilizadas. Posto isto, foi postulado que a continuação do estudo com a *C. necator* para a compreensão de uma possível relação entre a acumulação de polifosfato e de grânulos de polímero, deveria ser feita sob condições favoráveis para o seu crescimento, ou seja, a partir da utilização do modelo *batch* ou *fed-batch*, sob condições aeróbias.

Capítulo 3

3. Testes em *Fed-batch* e em Aerobiose - *C. necator*

O crescimento da *C. necator* e a sua capacidade para acumulação de PHA são afetados pela concentração em oxigénio dissolvido no meio. O uso da aerobiose (pO₂ superior a 30%) ao longo dos ensaios traduz-se numa menor necessidade energética para assimilação do carbono, resultando numa elevada acumulação de polímero (superior a 40% de PHA) e de crescimento celular por parte da cultura. (Tavares *et al.*, 2004; Khanna *et al.*, 2005; Aramvash *et al.*, 2015) Obruca *et al.*, (2014) reportam que no ensaio realizado com a *C. necator* obtiveram de conteúdo de polímero, de 90,1% e 29,4 g/L de biomassa. A maior parte dos estudos que se encontram publicados sobre a produção de PHA pela *C. necator* foram realizados em modo descontínuo (*batch* ou *fed-batch*), (Islam *et al.*, 2014). Na operação de reatores em *batch* ou em *fed-batch* na fase inicial do ensaio são adicionados todos os nutrientes, componentes do meio e o inóculo. No caso de *fed-batch*, o reator pode ser alimentado no início e de forma intermitente, com base na variação do pH, da agitação ou do pO₂. Os produtos desses modelos são recuperados no final da operação (Lim *et al.*). O meio de cultivo usado em ensaios com a *C. necator* e a concentração dos seus nutrientes, também têm grande impacto no crescimento celular e na acumulação de polímero. Ao longo de vários anos esta bactéria tem sido estudada, devido à sua capacidade de acumulação de polímero e ao impacto do uso de meios com diferentes concentrações de N e P podem ter na sua acumulação de polímero e crescimento. Normalmente, o uso de um dos nutrientes em concentrações limitantes, de N ou P, pode estimular uma maior acumulação de polímero e crescimento celular (Wang *et al.*, 2007). No entanto, não existem estudos em reator em que se tenha estudado a eventual acumulação de polifosfato pela *C. necator*, nem a sua relação com a acumulação de PHA, nestas condições de cultivo. Posto isto, foram realizados dois ensaios (Reatores: F e G) em modo de operação *fed-batch*, nos quais se pretendia obter uma cultura com bom crescimento celular, evitando ao mesmo tempo a inibição por parte do substrato, de modo a tornar possível observar a variação do conteúdo do polímero e de P na biomassa ao longo dos ensaios. Deste modo, ao longo dos ensaios optou-se por dar pulso de C e/ou N para observar o comportamento referido anteriormente, nas diferentes condições submetidas pelo meio. Os ensaios foram realizados em condições totalmente arejadas, mais adequadas a este organismo do que condições anaeróbias ou de microaerofilia/aeróbias, como comprovado no capítulo anterior.

3.1. Materiais e Métodos

3.1.1. Microrganismo: Preparação do pré-inóculo – Reativação da Cultura

A estirpe usada nos ensaios do Capítulo 3 foi a *Cupriavidus necator* DSM 428, que se encontrava preservada em *crio-vials* (-80 °C), com 20% (v/v) de glicerol. A cultura foi reativada a partir da inoculação em placas de Chromagar (CHROMagar™), incubadas a 30 °C durante 48 h. Depois de obter colónias isoladas, uma colónia isolada foi inoculada em 20 mL de meio LB (Capítulo 2: Materiais e Métodos). O pré-inóculo foi incubado num shaker a 200 rpm e 30 °C, durante 24 h. Os 20 mL de pré-inóculo foram transferidos para 200 mL de meio LB e incubados num shaker a 200 rpm e 30 °C, durante 24 h. O mesmo método foi usado na preparação de cada inóculo usado nos ensaios em *fed-batch* (Reatores: F e G).

3.1.2. Meios de cultivo

No Reator F, meio de cultivo usado foi o Meio E* (Capítulo 1: Materiais e Métodos), constituído pelos principais componentes: K_2HPO_4 , KH_2PO_4 e $(NH_4)_2HPO_4$, enquanto que no Reator G foi usado $(NH_4)_2SO_4$ como fonte de N em substituição do $(NH_4)_2HPO_4$ (Tabela 3.1). Em ambos os ensaios, o meio foi suplementado com frutose (20,0 g/L) como fonte de carbono.

Tabela 3.1: Diferentes componentes usados na preparação dos meios de cultivo dos ensaios.

Reator	Componentes			
	K_2HPO_4	KH_2PO_4	$(NH_4)_2HPO_4$	$(NH_4)_2SO_4$
F	5,80 g/L	3,70 g/L	3,30 g/L	-
G	0,58 mg/L	0,37 mg/L	-	3,30 g/L

3.1.3. Operação do reator

Os ensaios foram realizados com um volume de trabalho de 2 L de meio E* suplementado com os diferentes constituintes para cada ensaio, no bioreactor (BioStat®B-Plus, Sartorius). O pH e a temperatura foram mantidos a $7,0 \pm 0,1$ e a $30 \pm 0,1$ °C, respetivamente. O pH foi controlado pela adição automática das seguintes soluções: 2 M de NaOH ou de 2 M de HCl. Com arejamento com ar comprimido a uma taxa constante de 0,2 L/min, o pO_2 foi controlado a 30%, por variação automática da agitação (entre 200 e 800 rpm). Foi realizada amostragem para acompanhar o comportamento da *C. necator* ao longo dos ensaios. O crescimento celular foi determinado a partir da quantificação de CDW (*cell dry weight*). Foi centrifugado 12 mL caldo do reator, o sobrenadante foi usado para quantificação da frutose, de amónia, e o *pellet* foi liofilizado para determinação do CDW, quantificação de PHA e do conteúdo de P na biomassa.

3.1.4. Preparação dos Pulsos de C e N

Para o reator F, foram preparados 3 pulsos de carbono e um pulso de N. O primeiro pulso de carbono fez a concentração inicial de 20,0 g/L de frutose. O 2º e o 3º pulsos foram preparados com uma concentração de 25 g/L de frutose, volume de 50 mL. Para o pulso de N foi preparado 50 mL com 1,15 g/L de $(NH_4)_2HPO_4$.

Para o reator G, foram preparados 2 pulsos de carbono e um pulso de N. O primeiro pulso de carbono fez a concentração inicial do reator de 20,0 g/L de frutose. O 2º pulso preparado com de 25,0 g/L de frutose, volume de 50 mL. Para o pulso de N foi preparado 50 mL com 1,15 g/L de $(NH_4)_2SO_4$.

3.1.5. Técnicas analíticas

3.1.5.1. Determinação do crescimento celular

O crescimento celular foi acompanhado a partir do CDW de cada amostra. A massa de cada amostra foi quantificada a partir da pesagem do *pellet* liofilizado a -110 °C durante 48 h (ScanVac CoolSafe™, LaboGene).

3.1.5.2. Quantificação do carbono

Para a determinação da concentração da fonte de carbono (frutose) foi realizada por HPLC, como se encontra descrito na secção 2.1.4. Técnicas analíticas, Capítulo 2. A preparação dos padrões de frutose (Sigma) foi feita com uma concentração de 2,50 g/L, sucessivamente diluídas para uma concentração de 1,25 g/L, 0,63 g/L, 0,31 g/L e 0,16 g/L. Na preparação das amostras, o sobrenadante foi diluído (1:10) com ácido sulfúrico (H₂SO₄, 0,01 N) e filtradas, com filtros de 0,20 µm (Whatman).

3.1.5.3. Quantificação de N no sobrenadante, do conteúdo de polímero e P na biomassa

A determinação destes componentes seguiu o procedimento que se encontra descrito na secção 2.1.4. Técnicas analíticas, Capítulo 2.

3.1.5.4. Cálculo da Concentração da Biomassa Ativa (X_i)

Para determinação da concentração da biomassa ativa ao longo dos ensaios, foi utilizada a Equação 3.1 onde foram utilizados os dados obtidos, de CDW e de conteúdo de PHA.

$$X_i \text{ (g/L)} = \frac{\text{CDW (g/L)} \times \text{conteúdo de PHA (\%)}}{100} \quad \text{(Equação 3.1)}$$

3.2. Resultados e Discussão

3.2.1. Reator F

De forma a perceber melhor a possível relação entre a acumulação de grânulos de PHA e de polifosfato pela *C. necator*, foi testado um reator operado em *fed-batch*, o reator F. Este ensaio foi realizado sob condições favoráveis para crescimento celular e acumulação de polímero, nomeadamente aerobiose, com pO₂ elevado (superior a 30%) (Tavares *et al.*, 2004). A fonte de carbono utilizada foi a frutose (20,0 g/L), com meio de cultivo suplementado com nutrientes N e P, 85,4 mM e 50,0 mM, respetivamente. (Tabela 3.1). A escolha de frutose deveu-se ao facto de em testes realizados com essa fonte de carbono, terem sido obtidos rendimentos elevados de crescimento celular e produção de PHA (Khanna and Srivastava, 2005; Aramvash *et al.*, 2016). Pretendia-se, assim, atingir uma concentração celular maior, o que poderia facilitar o estudo da relação entre a acumulação de P e de polímero, que não tinha sido possível nos ensaios anteriores devido à reduzida concentração celular atingida.

O reator F esteve em funcionamento durante 80 horas. Foram dados 3 pulsos de carbono ao longo do ensaio (aos tempos de cultivo 0, 34 e 55 h), tendo o último pulso sido acompanhado

também por um pulso de N (Fig. 3.1.). Os pulsos foram dados com base na variação de pO_2 no reator e a variação da agitação ao longo do tempo (Fig. 3.1). Um aumento brusco de pO_2 acompanhado da redução da agitação, que eram indicativos de uma menor necessidade de oxigênio, por parte das células, indicava o fim do carbono no meio, ou outro nutriente.

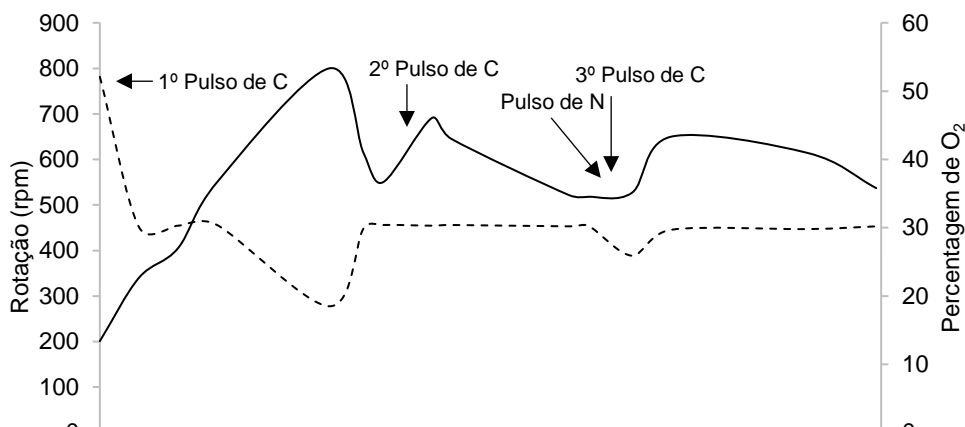


Figura 3.1: Variação da agitação (—) e do pO_2 no meio (- - -), ao longo da operação do reator F (o pO_2 foi controlado a 30% pela variação automática da agitação entre 200 e 1000 rpm).

A partir da análise da Fig. 3.2 e 3.3, verifica-se que a cultura não consumiu carbono nas 12 h iniciais do ensaio e consumiu apenas o polímero com que vinha do inóculo. Durante este período, o conteúdo da biomassa em PHA passou de 20,9% para 4,8%. O consumo de PHA deveu-se à adaptação da cultura ao meio e foi utilizado para crescimento celular, tendo o CDW atingido um valor de 2,0 g/L (a biomassa ativa aumentou de 0,2 para 1,9 g/L) (Fig. 3.4). Este crescimento celular foi acompanhado pelo consumo de 3,8 mM de N e uma redução do conteúdo de P nas células de 3,4 para 0,6%. Entre as 12-25 h o carbono foi todo consumido, assim como a maior parte do N, que foram utilizados para crescimento celular e acumulação de PHA. Houve um aumento de CDW para 5,5 g/L (a biomassa ativa a 5,1 g/L), que foi acompanhado de um aumento do conteúdo em polímero de 1,8%. No caso do conteúdo em P (%) na biomassa durante esse período, manteve-se praticamente inalterado (0,62-0,63%).

Antes do 2º pulso de carbono, entre o período das 25 e 34h, como não havia nutrientes suficientes disponíveis, a cultura utilizou PHA para o crescimento celular, cujo conteúdo na biomassa foi reduzido para apenas 0,6%. O aumento de CDW durante este período foi muito baixo, de 5,5 para 6,1 g/L. Contudo, ocorreu um aumento do conteúdo de P na biomassa, que pode ser devido às condições limitantes de carbono e de N no meio. Nesse momento as células encontravam-se em condições de stress severas e como o polifosfato é uma reserva de energia, que é produzida/utilizada em resposta às condições, que as células são submetidas. O aumento do conteúdo de P na biomassa, provavelmente foi uma resposta a essas condições. (Achbergerová *et al.*, 2011).

A limitação em nutrientes traduziu-se numa diminuição da agitação por volta das 25 h, seguida do aumento do pO_2 a partir das 30 h (Fig. 3.1). Esta variação da agitação do pO_2 foi, então, indicativa de que a cultura já não tinha substrato disponível, pelo que foi dado o 2º pulso de C (às 34 h) para estimular a acumulação de PHA. O conteúdo da biomassa em PHA aumentou de 0,6% para 4,9% nesse período de tempo (Fig. 3.3). De facto, devido à limitação em N durante este período, a biomassa provavelmente utilizou todo o carbono para a produção de PHA e não para o crescimento (a biomassa ativa variou ligeiramente de 6,1 para 6,4 g/L). Durante este período, o conteúdo em P na biomassa diminuiu, de 1,1 para 0,5%. Esta redução estará provavelmente associada à utilização de P, como fonte de energia para a acumulação de PHA. Tian *et al.*, (2005) reportaram que em condições em que a concentração de N era limitante, a cultura acumula grânulos “*dark-stained*” (visualizados por TEM), que Beeby *et al.*, (2011) comprovaram ser grânulos de polifosfato. No início os grânulos eram razoavelmente visíveis, mas ao longo do tempo iam diminuindo e os grânulos de PHB crescendo. Nos testes realizados no reator F, entre as 34 e as 50 h, apresentaram um comportamento semelhante (Fig. 3.3). Neste intervalo de tempo, devido à presença de carbono e à concentração de N ter sido limitante, a percentagem de polímero aumentou, diminuindo a percentagem de fósforo na biomassa (Fig. 3.3).

A agitação mantinha-se com tendência para baixar (Fig. 3.1), lentamente, o que sugeriu que a cultura, provavelmente, estaria a diminuir o seu metabolismo. Posto isto, foi dado um pulso de C e N às 55 h, com o objetivo de estimular a cultura a crescer e/ou acumular polímero (Fig. 3.1). Após a adição dos pulsos de N e C, a agitação aumentou, indicando a necessidade de oxigénio por parte das células, para o consumo dos nutrientes. Através da Fig. 3.3, observa-se que, entre as 55 e as 70 h, o conteúdo de P nas células aumentou de 0,6 para 1,0% e o polímero de 6,6, para 11,3%. O aumento de PHA nas células foi devido ao consumo de 0,7 M de C e 15,9 mM de N, que também, foram usados para o crescimento celular. Devido à adição do pulso de N no meio de cultivo, houve um crescimento maior durante esta fase, resultando numa variação do CDW de 6,8 para 8,8 g/L (a biomassa ativa aumentou de 6,4 para 7,8 g/L). Note-se ainda que, a partir das 55 h até ao fim do ensaio, o conteúdo de P aumentou de (0,6 para 1,2%), aparentemente acompanhando a acumulação de PHA.

Por volta das 70 h a agitação voltou a diminuir, essa diminuição estando relacionada com a diminuição da necessidade de oxigénio, para o consumo de nutrientes, já que estes se encontram próximos de concentrações limitantes. Durante esta fase final de operação, foram apenas consumidos 0,2 M de C e 2,4 mM de N.

O conteúdo de PHA na biomassa atingiu um valor máximo no final do teste de 15,5% e a CDW foi 9,6 g/L. A concentração final em PHA atingida no reator F foi 1,5 g/L de PHA, com uma concentração de biomassa ativa de 8,1 g/L. No entanto, estes valores foram baixos, em comparação a ensaios reportados na literatura com a *C. necator*. Nesses ensaios, obteve-se uma concentração de PHB entre 1,7 e 5,8 g/L e uma concentração de biomassa entre 3,5 e 11,0 g/L (Yousuf *et al.*, 2016). Contudo, estes ensaios foram realizados com concentrações iniciais de N e P diferentes (N: 20,4-30,3 mM e P: 5,7-20,4 mM) o que pode estar relacionado com estas

diferenças de rendimento. Normalmente, a *C. necator* apresenta rendimentos elevados, quando um dos nutrientes é utilizado em concentrações limitantes, no caso do P, inferior a 6 mM e N, inferior a 20 mM (Wang *et al.*, 2007; Khanna *et al.*, 2005).

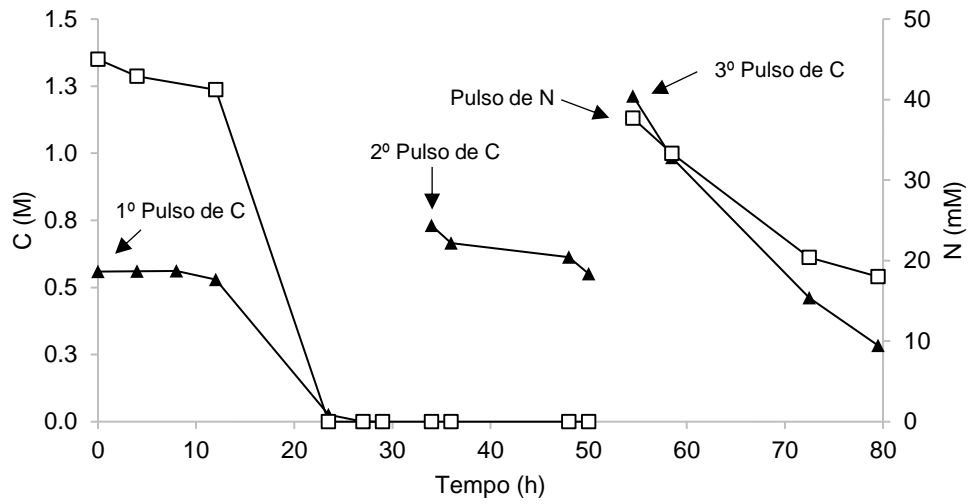


Figura 3.2: Variação da concentração de carbono (▲) e de N (□) ao longo da operação do reator F.

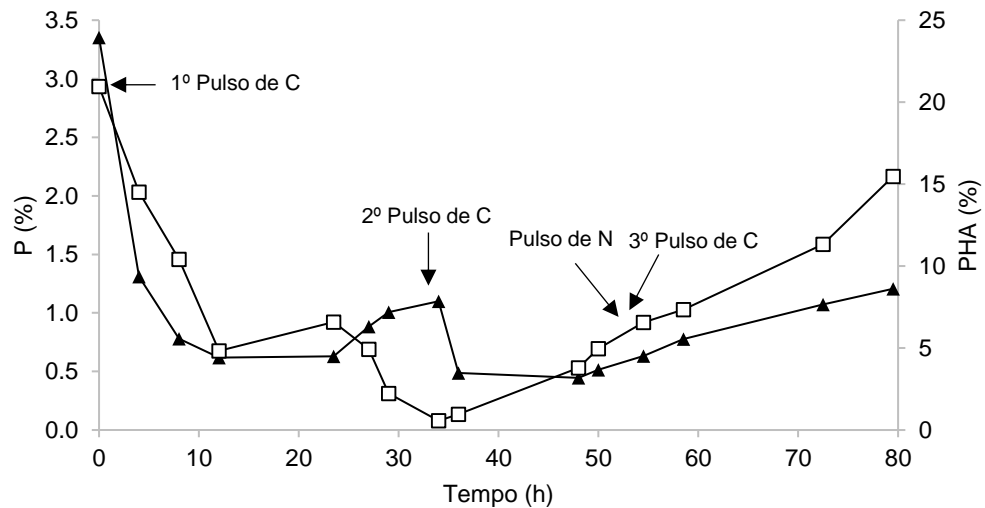


Figura 3.3: Variação do conteúdo de P (▲) e de PHA (□) na biomassa, ao longo da operação do reator F.

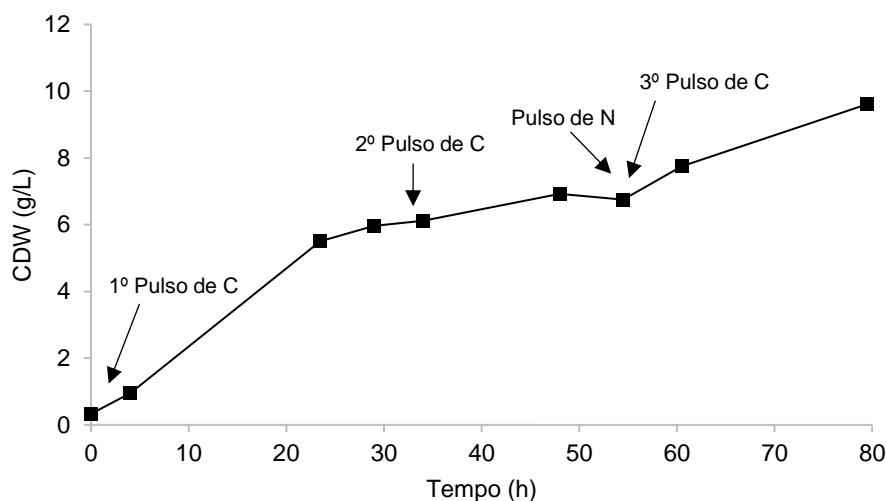


Figura 3.4: Variação da quantidade da concentração de biomassa (■) ao longo da operação do reator F.

Conclui-se com a realização do ensaio no reator F, existe uma eventual relação entre o conteúdo de P na biomassa e a acumulação/degradação de PHA, sendo essa influenciada pela disponibilidade de N no meio.

3.2.2. Reator G

Para compreender melhor se a concentração de fosfato teria impacto na cultura e na acumulação de grânulos de PHA e de polifosfato, foi operado o reator G em modo *fed-batch*. O reator G sofreu apenas algumas alterações em relação ao reator F. O meio de cultivo foi preparado com uma concentração limitante de P (1,01 mM) e foi usado $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, como suplemento de N, com uma concentração de 14,0 mM (Tabela 3.1). A utilização dessa concentração de P, tinha como objetivo inicial simular a concentração de P que normalmente se encontra em águas residuais municipais (entre 0,6 e 1,6 mM) (Tran *et al.*, 2015). Deste modo, pretendia-se observar o impacto que as concentrações limitantes de nutrientes teriam no conteúdo de P na biomassa e conseqüentemente no crescimento celular e na acumulação de PHA. O reator G esteve em funcionamento durante 90 horas. Ao longo do ensaio foram dados dois pulsos de carbono (0 e 20 h) e um pulso de N (58 h). Os pulsos foram dados com base na variação da agitação e do pO_2 (Fig. 3.5).

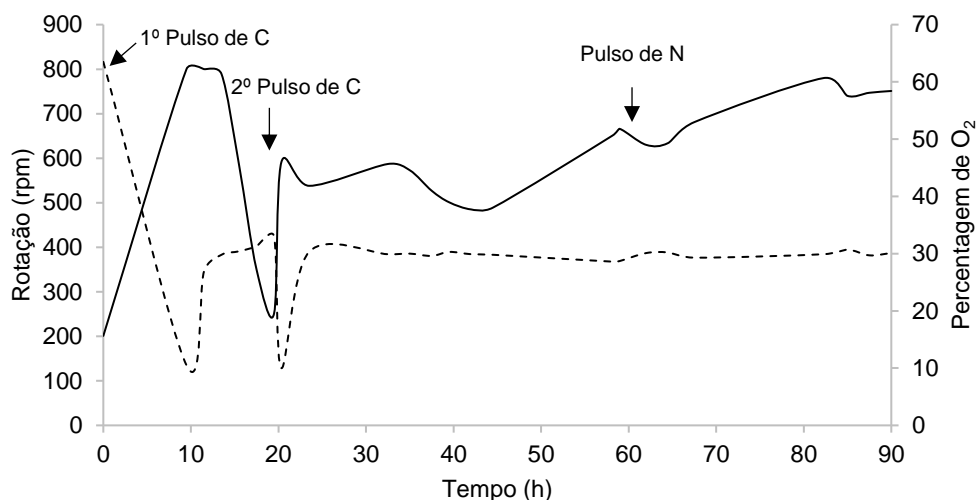


Figura 3.5: Variação da agitação (—) e do pO_2 no meio (- - -), ao longo da operação do reator G (o pO_2 foi controlado a 30% pela variação automática da agitação entre 200 e 1000 rpm).

Ao longo das 9,50 h iniciais do ensaio, a cultura consumiu 0,11 M de C (Fig. 3.6). Apresentou crescimento celular (Fig. 3.7), o CDW aumentou de 0,1 g/L para 1,7 g/L (a biomassa ativa variou de 0,09 para 1,59 g/L) e um aumento do conteúdo em polímero de 1,4% para 5,9% (Fig. 3.8). Contudo, durante este período a cultura consumiu uma quantidade insignificante de N (0,01 mM). Provavelmente, usou o P presente no meio e o que se encontrava acumulado na biomassa como fonte de energia, para a assimilação de carbono. Entre as 9,50 e as 20 h iniciais, antes do 2º pulso, o consumo de N continuou a ser reduzido (1,6 mM), consumindo apenas 0,17 M de C. Esse consumo foi utilizado para acumulação de polímero e crescimento celular. O conteúdo de polímero na biomassa aumentou durante esta fase para 38,8%. Apresentava uma concentração celular maior no final desta fase, CDW igual a 5,2 g/L (a biomassa ativa a 3,2 g/L). No entanto, entre o período 15,50-20 h ocorreu uma diminuição do conteúdo de polímero, de 41,8 para 38,8%. A concentração de N era 13,0 mM, o que provavelmente era limitante para o crescimento da *C. necator*. Apresentou um crescimento celular baixo, o CDW variou de 4,1 para 4,8 g/L (a biomassa ativa aumentou de 2,4 para 2,9 g/L), consumindo apenas 0,1 mM de C. Contudo, como a cultura apresentava uma quantidade razoável de polímero nesta fase, aparentemente optou por consumir o PHA que havia acumulado. As células usaram as reservas de carbono, como fonte de energia, continuando a consumir o carbono no meio, embora mais lentamente. Em relação ao conteúdo em P nas células, desde o início do ensaio mostrava tendência para diminuir, embora não diminuísse significativamente nessa fase. Provavelmente, está relacionado com facto de a cultura necessitar de energia para o consumo de PHA.

Entre a fase das 15,50 e as 20 h, a agitação diminuiu (de 585 para 251 rpm) e o pO_2 começou a aumentar acima do *setpoint*. A alteração destes parâmetros era indicativa que possivelmente um dos nutrientes se encontrava em condições limitantes, posto isto, foi dado o 2º pulso de carbono. Neste momento encontrava-se muito carbono no meio (1,3 mM) e a

concentração de N era limitante, 12,4 mM. Após a adição do pulso, o pO₂ desceu bruscamente, de 33 para 10% e como resposta a agitação subiu de 251 para 591 rpm, de foram a estabilizar no *setpoint* (30%).

Entre as 20 e as 58 h, a cultura apresentou um comportamento completamente diferente, em comparação à fase inicial do ensaio. Consumiu todo o N (8,7 mM) e 0,8 M de C, que foram usados essencialmente para crescimento celular. O CDW variou de 4,8 g/L para 13,2 g/L (a biomassa ativa aumentou de 2,9 para 4,4 g/L). Houve apenas um aumento do conteúdo em polímero nas células, entre as 20 e as 32,50 h, de 54,6% para 78,9%. No entanto, entre as 32,5 e as 58 h, o conteúdo em polímero demonstrou tendência para diminuir, diminuiu 12,0%. Além, do consumo de carbono ter sido usado para crescimento celular, também o polímero, foi usado para o mesmo fim, como referido anteriormente. Entre as 20 e as 58 h, a quantidade de P, mostrou apenas uma ligeira tendência para diminuir ao longo do tempo, oscilando entre 0,2% e 0,1%. No entanto, durante esta fase quando ocorreu consumo de PHA, o conteúdo de P na biomassa demonstrou o mesmo comportamento, que se tinha observado, entre as 15,5 e as 20h. Contudo o consumo de carbono não foi tão baixo nessa fase, não se refletindo numa subida de pO₂.

A agitação às 56 h mostrou tendência para diminuir e o pO₂ começou a aumentar (Fig. 3.5), indicativo de uma limitação de nutrientes. Foi dado um pulso de N (58 h), que nesse momento encontrava-se a uma concentração de 8,5 mM de N e 0,6 mM de C. No entanto, a cultura continuou a consumir polímero, reduziu o conteúdo de 62,0 para 60,7%, que se traduziu num aumento de pO₂ e conseqüentemente uma diminuição da agitação (Fig. 3.5). Até ao final do teste o consumo de C diminuiu, consumindo apenas 0,07 M. O consumo de N, também, foi baixo (diminui de 8,5 para 8,4 mM). No entanto, durante esse período a cultura voltou a acumular polímero, houve um aumento de 61,8% até 92,5% e obteve-se um CDW de 17,9 g/L no final do ensaio. Durante esta fase final de ensaio, a quantidade P na biomassa, mostrou uma ligeira tendência para estabilizar, variando entre 0,1 e 0,2%.

No início dos ensaios, os reatores F e G apresentam grande diferença no conteúdo de polímero. Observou-se que o reator F tinha 20,9% de conteúdo de polímero e o reator G tinha apenas 1,4%. Essa grande diferença deveu-se provavelmente à duração do período do inóculo do reator G, que ficou foi incubado durante um período de tempo mais longo (mais 2 h), do que o inóculo para o reator F. Devido a isso, provavelmente o polímero acumulado pelas células ao longo da inoculação foi consumido, antes de se inocular o reator G.

No final do ensaio do reator G, foi atingida uma concentração de PHA de 16,6 g/L, com uma concentração de biomassa ativa de 1,3 g/L. Em comparação ao reator F, com a diminuição da concentração de P e N no meio, o reator G obteve um maior conteúdo de polímero nas células (92,5%) e apenas 15,5% no reator F, que correspondeu apenas a 1,49 g/L de PHA. Segundo Shahid *et al.*, (2013), vários fatores podem influenciar a produção de PHA, como uma concentração em excesso de carbono e o stress causado pela limitação de N ou P. A limitação de nutrientes é normalmente usada para um maior rendimento de produção de polímero, por parte da *C. necator*. Normalmente, opta-se pela utilização de uma concentração de P inferior a 6 mM e N, por volta de 20 mM (Khanna *et al.*, 2005). Contudo, como a concentração de P era limitante no meio, não foi possível observar uma maior variação do conteúdo de P na biomassa ao longo do ensaio, embora

fosse possível observar uma maior variação na fase inicial. A realização deste ensaio não tornou possível observar a eventual relação metabólica ou fisiológica entre o conteúdo de P na biomassa e a acumulação/degradação de PHA, com ocorreu no ensaio no reator F.

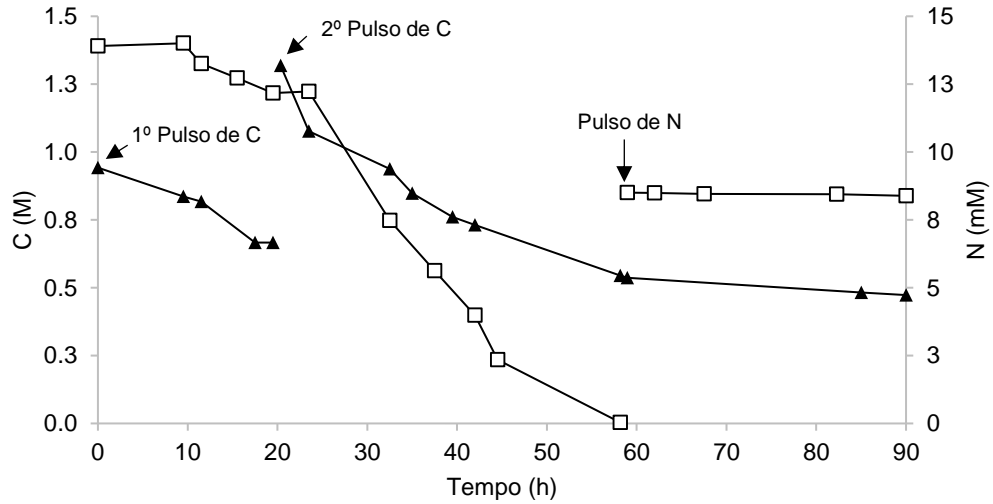


Figura 3.6: Variação da concentração de carbono (▲) e de N (□), ao longo da operação do reator G.

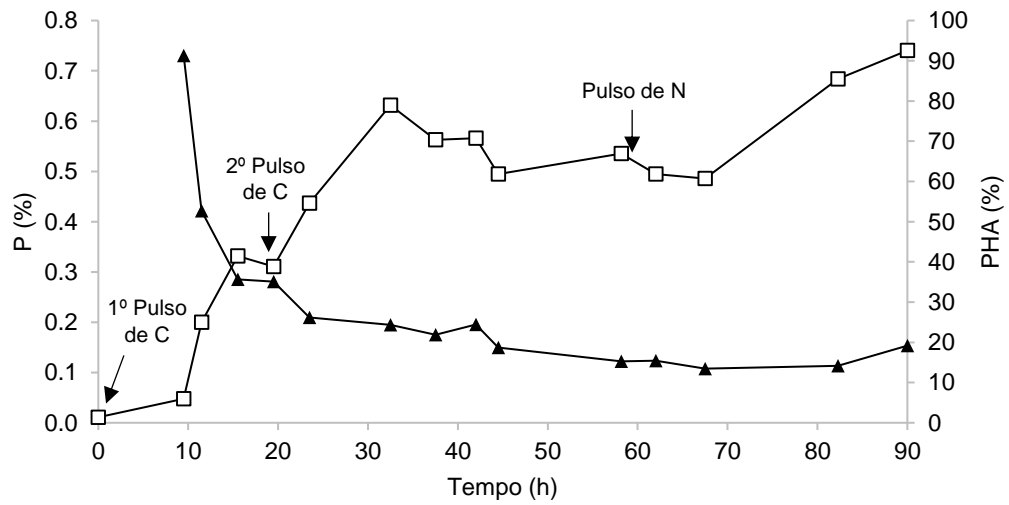


Figura 3.7: Variação do conteúdo de P (▲) e de PHA (□) na biomassa, ao longo da operação do reator G.

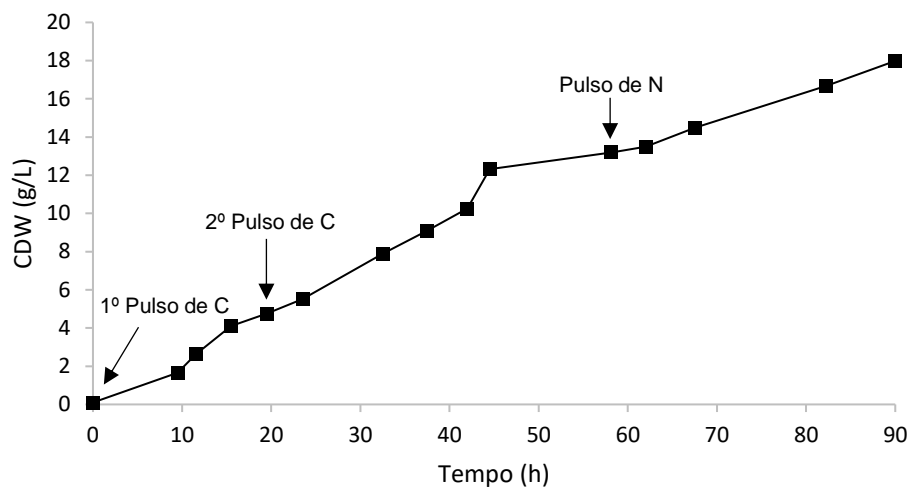


Figura 3.8: Variação da quantidade da concentração de biomassa (■) ao longo da operação do reator G.

3.3. Conclusões

A partir da realização dos ensaios em *fed-batch* (Reatores F e G) foi possível obter elevado crescimento celular (F: CDW = 9,6 g/L e G: CDW = 17,9 g/L) e boa acumulação de polímero na biomassa (F: 1,5 g/L e G: 16,6 g/L) em *aerobiose* (pO_2 estabelecido a 30%). No entanto, o reator G apresentou maior crescimento celular e acumulação de polímero, em relação ao reator F. Com a utilização do meio de cultivo com concentrações limitantes de N e P, foi notável o impacto que teve no desempenho da *C. necator*.

Os resultados obtidos ao longo do ensaio do reator F mostraram que provavelmente existe uma relação entre a acumulação de PHA e o conteúdo de P na biomassa, mas essa relação parece ser influenciada pela concentração de N. Assim, em condições em que havia disponibilidade em C e N, a cultura cresceu e acumulou PHA, tendo havido também um aumento do conteúdo de P na biomassa. Em condições de limitação em N, havendo C disponível, a cultura manteve a acumulação de PHA, mas houve uma tendência para a redução do conteúdo de P na biomassa. Em condições de limitação simultânea em N e C, a cultura consumiu o PHA enquanto o conteúdo de P na biomassa aumentou, algo ainda não reportado na literatura. Com este ensaio foi possível observar a provável relação entre a formação de grânulos de polímero e de grânulos de polifosfato, nas células de *C. necator*. Ambos funcionam com fonte de energia para as células. O que se pode concluir deste ensaio, a *C. necator* de alguma forma a nível fisiológico ou metabólico apresenta uma conexão/relação entre os grânulos de PHA e o conteúdo de P na biomassa, conforme a sua necessidade energética.

Em relação ao reator G, como o meio de cultivo tinha uma concentração limitante de P, não foi possível observar maior conteúdo de P na biomassa, como aconteceu no reator F. Embora fosse possível observar uma variação maior do conteúdo de P na biomassa na fase inicial, bastante semelhante entre os dois ensaios. Com a utilização de concentrações limitantes de N observou-se que, quando não se encontra carbono em excesso no meio, o consumo de C e N era baixo. Por outro lado, o carbono foi usado para a acumulação de polímero, como se encontra referido na literatura. A utilização de concentrações limitantes de P ou N, estimula o crescimento celular e também, o aumento do conteúdo de polímero na biomassa. Neste ensaio não foi possível observar a conexão provavelmente existente entre o conteúdo de P e a acumulação de PHA.

Em suma, tendo em conta os resultados obtidos foi possível observar que existe uma relação entre a acumulação de polímero e o conteúdo de P na biomassa e que estes se encontram relacionados com a limitação de N do meio. Contudo, não é possível determinar a existência de uma via metabólica alternativa ou de uma conexão fisiológica entre a acumulação de PHA e o conteúdo de P na biomassa. Em relação ao conteúdo de P na biomassa apresentado pela *C. necator* em condições de *aerobiose* não iria tornar o processo de remoção de P rentável, já que se observou valores de conteúdo de P na biomassa baixos.

Capítulo 4

4. Testes com outras estirpes produtoras de PHA

Além da *C. necator*, outras estirpes têm sido estudadas devido à sua capacidade de acumulação de polímero e às características do PHA que produzem. Dependendo do número de átomos de carbono dos monómeros do polímero, são distinguidos dois grupos principais, com diferentes propriedades materiais, os scl-PHAs e mcl-PHAs (Lu *et al.*, 2016). O grupo dos produtores de scl-PHA produzem cadeias de polímero, que consistem em monómero de 4-5 átomos de carbono. No caso das produtoras de mcl-PHA, o polímero obtido contém monómeros de 6-14 átomos de carbono (Mozejko *et al.*, 2015). Entre as diferentes produtoras de PHA, além da *C. necator* e da *P. putida*, não existem estudos relativamente à capacidade de acumulação de polifosfato dessas estirpes, nem a sua relação com a acumulação de polímero (Tobin *et al.*, 2007; Beeby *et al.*, 2012). Estes estudo pretendeu avaliar o conteúdo de P na biomassa em seis culturas previamente isoladas e conhecidas pelas sua capacidade de acumular PHA.

4.1. Materiais e Métodos

4.1.1. Ensaios em *Erlenmeyer*

4.1.1.1. Microrganismo: Preparação do pré-inóculo – Reativação da Cultura

A estirpes usadas nos ensaios do Capítulo 4 foram a *Cupriavidus necator* DSM 428, a *Pseudomonas putida* KT2440, a *Pseudomonas oleovorans* NRRL B-778, a *Pseudomonas chlororaphis* DSM-19603, a *Pseudomonas stutzeri* NRRL B-775 e a *Pseudomonas resinovorans* NRRL B-2649, que se encontram preservadas em *crio-vials* (-80 °C), com 20% (v/v) glicerol. As culturas foram reativadas a partir da inoculação de em placas de Chromagar (CHROMagar™), incubadas a 30 °C durante 48 h. Depois de obter colónias isoladas, uma colónia isolada foi inoculada em 20 mL de meio LB (Capítulo 1: Materiais e Métodos). O pré-inóculo foi incubado num agitador orbital a 200 rpm e 30°C, durante 24 h.

4.1.1.2. Preparação dos Ensaios em *Erlenmeyer*

Os 20 mL de pré-inóculo foram transferidos para 200 mL de meio E* constituído por: K₂HPO₄ (5,8 g/L), KH₂PO₄ (3,7 g/L) e (NH₄)₂HPO₄ (3,3 g/L). Encontra-se descrito na secção 2.1.2. Meio de cultivo (Capítulo 2), os restantes constituintes. Foram suplementados com diferentes fontes de carbono, para a *C. necator* usou-se frutose (20,0 g/L), para a *P. putida*, *P. chlororaphis* e *P. resinovorans* usou-se glicerol (40,0 g/L) e para a *P. oleovorans* e *P. stutzeri* usou-se glucose (20,0 g/L). Incubados num shaker a 200 rpm e 30°C, durante 72 h.

Foi realizada amostragem, para quantificação de CDW (*cell dry weight*), foi centrifugado 10 mL caldo de cada *Erlenmeyer*, o pellet foi liofilizado para determinação do CDW, quantificação de PHA e do conteúdo de P na biomassa.

4.1.2. Ensaios em *Fed-batch* (Reator H e I)

4.1.2.1. Microrganismo: Preparação do pré-inóculo – Reativação da Cultura

A estirpes usadas nos ensaios em *fed-batch* foram a *Pseudomonas putida* KT2440 e *Pseudomonas chlororaphis* DSM-19603. A preparação dos pré-inoculos foi feita como descrito anteriormente.

4.1.2.2. Operação dos reatores H e I

Os ensaios foram realizados de forma semelhante aos Reatores F e G, como se encontra descrito na seção 3.1.3. Operação do reator (Capítulo 3).

4.1.2.3. Preparação dos Pulso de C

Foram preparados 2 pulsos de carbono. O primeiro pulso de carbono fez a concentração inicial de 40,0 g/L de glicerol, em ambos os reatores. O 2º pulso foi preparado com uma concentração de 40,0 g/L de frutose, volume de 80 mL.

4.1.3. Técnicas analíticas

A determinação do crescimento celular nos ensaios em *Erlenmeyer* e dos ensaios em *fed-batch* (Reator H e I) realizada como encontra-se descrita na seção 3.1.5. Técnicas analíticas, Capítulo 3.

A quantificação do conteúdo P e de polímero e na biomassa, nos ensaios em *Erlenmeyer* e reator foi realizada como se encontra descrito na seção 2.1.4. Técnica analíticas, Capítulo 2.

A determinação da concentração de PHA e a sua composição foi determinada com se encontra descrito na seção 2.1.4. Técnica analíticas, Capítulo 2. Para as estirpes produtoras de mcl-PHA foram usados outros padrões.

4.2. Resultados e Discussão

4.2.1. Ensaios em *Erlenmeyer*

De forma, a compreender se era possível outras estirpes produtoras de PHA, apresentarem algum tipo de relação entre a acumulação de grânulos de polímero e de polifosfato, foram realizados ensaios em *Erlenmeyer*, durante 72 h, com 6 estirpes diferentes. Essas estirpes eram produtoras de scl-PHA, no caso da *C. necator* e *P. oleovorans* e de mcl-PHA, como a *P. putida*, *P. chloraraphis*, *P. resinovorans* e *P. stutzeri*. Foram testadas em meios de cultivo iguais, Meio E*, com concentrações de P e N de 85,4 mM e 50,0 mM, respectivamente. No entanto, a única diferença era a fonte de carbono, foram usadas como fonte de carbono frutose, glucose e glicerol. A utilização de diferentes fontes de carbono foi baseada em testes já realizados, em que essas estirpes apresentavam rendimento razoáveis, para esses específicos substratos de carbono (Kellerhals *et al.*, 1999; Lalucat *et al.*, 2006; Hilliou *et al.*, 2009). O meio de cultivo da *C. necator* foi suplementado com frutose. No caso da *P. oleovorans* e da *P. stutzeri* foram com glucose e as restantes estirpes com glicerol. (seção 4.1.1.2. Preparação dos Ensaios em *Erlenmeyer*). Os ensaios de *Erlenmeyer* foram realizados, também, com a intenção de escolher duas estirpes produtoras de PHA, além da *C. necator*, para serem testadas em reator operado em modo *fed-batch*. A escolha das estirpes foi baseada, essencialmente, a partir dos dados de CDW e de conteúdo de PHA obtidos no final dos ensaios (72 h) (Fig. 4.1 e 4.2). O ensaio com a *C. necator*, que foi usada nos estudos descritos nos capítulos anteriores, serviu como referência de comparação para o CDW e o conteúdo de P na biomassa.

A partir da Fig. 4.1, a estirpe produtora de scl-PHA que apresentou maior crescimento celular foi a *C. necator* (CDW = 6,9 g/L). A *P. oleovorans* obteve um crescimento celular baixo (CDW = 4,5 g/L), em relação à *C. necator*. No entanto, a *P. oleovorans* apresentou um conteúdo de P na biomassa (1,7%), superior ao da *C. necator* (0,7%). A partir da Fig. 4.2, a *C. necator* apresentou o maior conteúdo de polímero nas células (47,2%), em comparação à *P. oleovorans*, que obteve apenas 4,8%. Num estudo realizado com a *P. oleovorans*, com a mesma fonte de carbono e em condições semelhantes obtiveram 0,8 g/L de PHA e apresentou um crescimento celular de CDW igual 3,4 g/L. O polímero que obtiveram era constituído pelo monómero, 3HB (Hidroxibutirato) (Sun *et al.*, 2003). No ensaio em *Erlenmeyer* apenas se obteve 0,2 g/L de PHA, com uma composição monomérica semelhante ao teste referido anteriormente. Por outro lado, no ensaio em *Erlenmeyer* obteve-se maior concentração celular, embora não muito superior.

No caso das produtoras de mcl-PHA, a *P. putida* e a *P. chlororaphis* apresentaram uma composição monomérica semelhante, constituída por 3HB, 3HHx (Hidroxihexanoato), 3HO (Hidroxioctanoato), 3HD (Hidroxidecanoato), 3HDd (Hidroxidodecanoato) e 3HTd (Hidroxitetradecanoato). Enquanto a *P. resinovorans* e a *P. stutzeri* apresentaram uma composição monomérica constituída por: 3HB, 3HO, 3HD, 3HDd e 3HTd. As estirpes, que mostraram maior quantidade celular foram a *P. chlororaphis* (CDW = 8,8 g/L) e a *P. putida* (CDW = 8,9 g/L). A *P. resinovorans* e a *P. stutzeri* apenas atingiram um CDW final de 7,1 e 5,5 g/L, respetivamente (Fig. 4.1). Em relação ao conteúdo de polímero a biomassa, a partir da Fig. 4.2, a *P. stutzeri* foi a que apresentou maior acumulação de PHA (20,5%), seguida da *P. chlororaphis* (15,8%), *P. putida* (10,9%) e a *P. resinovorans* (2,4%).

Num ensaio reportado na literatura com a *P. putida*, em que a fonte de carbono era glucose, obtiveram maior, conteúdo de PHA (32,1%). No entanto, observaram crescimento celular muito baixo (CDW = 0,9 g/L), em relação ao ensaio realizado em *Erlenmeyer* (CDW = 8,9 g/L) (Davis *et al.*, 2013). Noutro estudo realizado com a *P. chlororaphis*, sob condições semelhantes, reportaram que no final do ensaio obtiveram 30,0 g/L de CDW, com 11,9% de conteúdo de PHA na biomassa (Muhre *et al.*, 2013). Comparando estes dados com os dados observados a partir do ensaio em *Erlenmeyer*, Muhre *et al.* (2013) reportaram maior crescimento celular embora o conteúdo de polímero seja ligeiramente mais baixo, em comparação ao obtido no ensaio em *Erlenmeyer* (15,8%), que foram realizados sob condições diferentes, não havendo controlo de pH e arejamento. No ensaio com a *P. stutzeri* observou-se maior concentração celular no final do ensaio (CDW = 5,5 g/L), em relação ao ensaio reportado por He *et al.* (1998), que observaram apenas 2,3 g/L de CDW, com a mesma fonte de carbono. Contudo, obtiveram maior conteúdo de PHA na biomassa (52%), enquanto no ensaio em *Erlenmeyer* se obteve 20,5% (He *et al.*, 1998). Lenz *et al.*, (1996) realizaram ensaios com a *P. resinovorans*, mas utilizaram como fonte de carbono VFAs. Obtiveram crescimento celular mais baixo (CDW = 1,3 g/L), em comparação aos ensaios em *Erlenmeyer* (CDW = 7,2 g/L). No entanto, em relação ao conteúdo de polímero na biomassa, obtiveram 14,6%, enquanto no ensaio em *Erlenmeyers* observou-se 2,4% de conteúdo de PHA na biomassa.

Em relação conteúdo de P na biomassa da *P. putida* e da *P. chlororaphis*, observou-se que era ligeiramente superior ao da *C. necator* (0,7%). No caso da *P. putida* obteve 0,8% de P na biomassa e a *P. chlororaphis*, 0,9%. A *P. stutzeri*, embora apresentasse o conteúdo de P na biomassa (1,8%) mais elevado, entre as produtoras de mcl-PHA, teve o CDW mais baixo. A *P. resinovorans* tinha 0,9% de conteúdo de P na biomassa, próximo aos valores registados pela *P. putida* e a *P. chlororaphis*. A Fig. 4.1 sugere que a *P. oleovorans* e a *P. stutzeri*, sob as condições utilizadas favoreceram para o aumento do conteúdo de P na biomassa e menos para a produção de novas células, em comparação às restantes estirpes estudadas. No entanto, outras condições podem alterar este metabolismo, pelo que se realizaram de seguida ensaios em reator em condições *fed-batch*.

A escolha das estirpes para este esse ensaio foi baseada, nos resultados de CDW, e no conteúdo de polímero na biomassa, no final do ensaio (72 h) A *P. chlororaphis* e a *P. putida* foram escolhidas para serem testadas em reator (*fed-batch*). A *P. chlororaphis* apresentou bom crescimento celular, conteúdo de P um pouco superior à *C. necator* e conteúdo de PHA razoável na biomassa. Em relação, à *P. putida* apresentou bom crescimento e o conteúdo de P era ligeiramente superior à *C. necator*. Para além disso, esta estirpe é muito estudada entre as produtoras de mcl-PHA e foi também, estudada devido à sua capacidade de acumulação de polifosfato. (Nikel *et al.*, 2013). No entanto, a estirpe *P. stutzeri*, embora apresentasse um CDW baixo seria interessante a estudar em mais pormenor no futuro par avaliar o seu comportamento em condições de *fed-batch*.

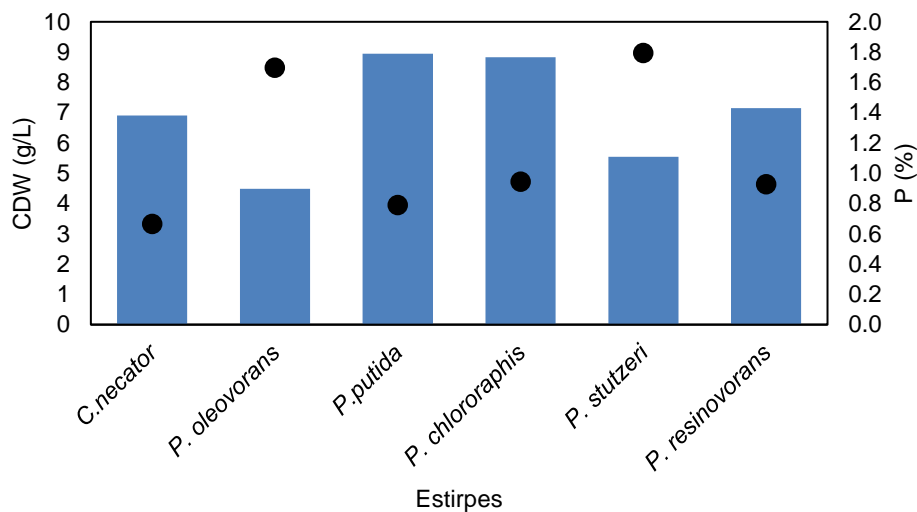


Figura 4.1: Conteúdo de P na biomassa (●) e CDW (■), no final do ensaio em Erlenmeyer (72 h).

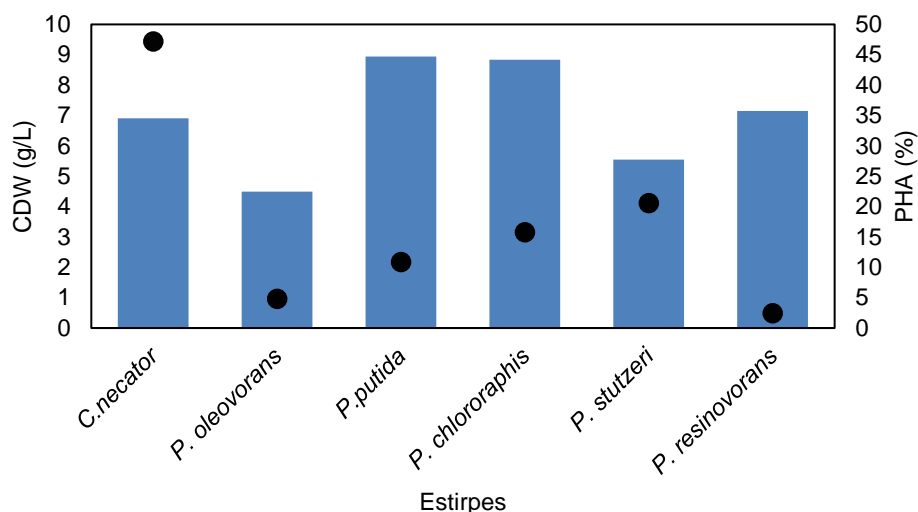


Figura 4.2: Conteúdo de polímero na biomassa (●) e CDW (■), no final do ensaio em Erlenmeyer (72 h).

4.2.2. *P. putida* – Reator H

A partir dos ensaios em *Erlenmeyer* foram selecionadas duas estirpes produtoras de mcl-PHA, a *P. putida* e a *P. chlororaphis*. De forma a perceber se poderia haver uma relação entre a formação de grânulos de polifosfato e de PHA por estas bactérias realizaram-se ensaios em *fed-batch*, os reatores H e I, respetivamente. Os reatores foram operados em condições semelhantes ao reator F, nomeadamente, aerobiose, com pO_2 elevado (30%) e meio de cultivo contendo N e P nas concentrações, 85,40 mM e 50,0 mM, respetivamente. No entanto, a fonte de carbono neste ensaio foi o glicerol (40,0 g/L). A utilização desta fonte de carbono, foi baseada em testes realizados com estas estirpes, em que se obteve rendimentos de crescimento celular e produção de polímero razoáveis (Kenny *et al.*, 2012; Muhr *et al.*, 2013).

O reator H, realizado com a bactéria *P. putida*, foi operado durante 51 horas. Ao longo do tempo de operação foram dados 2 pulsos de carbono (aos tempos de cultivo 0 e 25 h). O segundo pulso foi dado com base na variação do pO_2 e na variação da agitação ao longo do tempo. A observação de alterações nos parâmetros, nomeadamente, um aumento brusco de pO_2 acompanhado da redução da agitação, foi indicativa de uma menor necessidade de oxigénio por parte das células, como resultado de limitação da fonte de carbono no meio (Fig. 4.3)

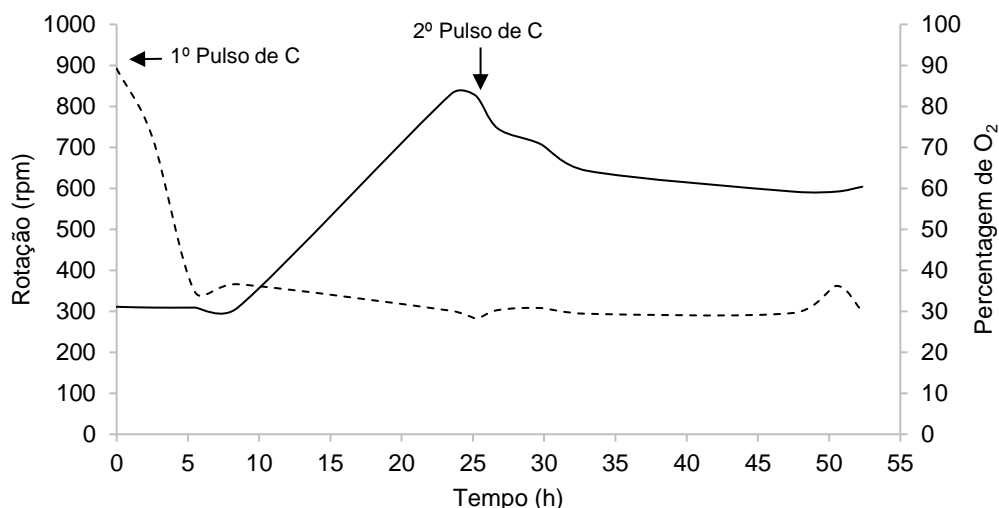


Figura 4.3: Variação da agitação (—) e do pO₂ no meio (- - -), ao longo da operação do reator H com a bactéria *P. putida* (o pO₂ foi controlado a 30% pela variação automática da agitação entre 200 e 1000 rpm).

A partir da análise da Fig. 4.4, verifica-se que entre o período das 0 às 27 h (antes do 2º pulso de C), o conteúdo de polímero na biomassa aumentou de 0,4 para 8,4%. Durante esta fase havia carbono e N no meio, não se encontravam em condições limitantes, o que permitiu à cultura usar os nutrientes do meio para crescimento celular, o CDW aumentou de 3,1 para 12,7 g/L (a biomassa ativa variou de 3,08 para 11,63 g/L) e acumulação de polímero. Em relação ao conteúdo de P na biomassa, na fase inicial entre as 0 e as 8,50 h, mostrou tendência para diminuir (de 2,2 para 1,9%). A cultura ao longo das 8,50 h, aproximadamente, estava em fase *lag*. não houve crescimento celular (Fig. 4.5), nem acumulação de PHA (Fig. 4.4). Entre as 8, 50 e as 27 h, o conteúdo de P continuou a diminuir, de 1,8 para 1,3%. Como referido anteriormente, a concentração de N não era limitante, provavelmente as células não tiveram necessidade de usar o conteúdo de P na biomassa, para assimilação do substrato e crescimento celular.

Momentos antes de se dar o 2º pulso de C, entre as 23,50 e as 27 h, ocorreu diminuição da agitação (de 831 para 746 rpm), de forma a estabilizar o pO₂, que se encontra superior a 30% (Fig. 4.3). A alteração destes parâmetros era indicativa que um dos nutrientes poderia se encontrar esgotado ou limitante, portando foi dado o 2º pulso às 27 h. Após o pulso ser dado entre as 27 e as 47,50 h, verificou-se um aumento significativo do conteúdo de polímero na biomassa (de 8,4 para 26,6%). Na literatura encontra-se referido, que o uso de um dos nutrientes N ou P em concentrações limitantes incentiva maior produção de PHA (Gumel *et al.*, 2016). O conteúdo de P na biomassa, após uma diminuição entre as 27 e as 29,75 h (de 1,3 para 0,9%), mostrou tendência para aumentar (de 0,9 para 2,3%). Como o polifosfato é uma reserva energética, que responde a estímulos do meio, como limitação de nutrientes, que causam stress na cultura (Nikel *et al.*, 2013). O aumento observado, provavelmente foi devido à necessidade energética ou de P por parte da *P. putida*, para assimilação do substrato e para a acumulação de polímero (Fig. 4.4). No final do ensaio (entre as 47,50 e as 51 h), ocorreu diminuição do conteúdo de polímero (de 26,6 para

20,9%), provavelmente como não se encontrava carbono no meio, a cultura optou por consumir PHA. Esse consumo de polímero foi usado para crescimento celular, acordante com o aumento do CDW (de 16,6 para 17,5 g/L). O aumento do conteúdo em P neste período (de 1,7 para 2,3%), poderá ter sido uma resposta à necessidade de energética para o consumo de PHA ou a necessidade de P numa via metabólica ou fisiológica alternativa (Achbergerová *et al.*, 2011).

No final do ensaio do reator H atingiu-se 3,7 g/L de PHA, com a seguinte constituição monomérica: 3HB, 3HHx, 3HO, 3HD, 3HDd e 3HTd e obteve-se 13,9 g/L de biomassa ativa. Comparando estes resultados ao ensaio realizado por Kenny *et al.*, (2012), sob condições semelhantes, reportaram uma concentração final de PHA igual a 6,2 g/L e 12,9 g/L de biomassa ativa. A concentração de biomassa obtida no final do ensaio do reator H foi bastante semelhante ao ensaio referido anteriormente. No entanto, no reator H obteve-se uma menor concentração de polímero. Em comparação ao ensaio realizado por Poblete-Castro *et al.*, (2014) com a *P. putida*, observaram uma concentração de PHA no final do ensaio de 1,5 g/L e 4,2 g/L de biomassa ativa. Esses valores são muito baixos, em relação ao ensaio do reator H, embora atingissem 34,5% de conteúdo de polímero na biomassa no final do ensaio, superior ao que se observou no reator H (20,9%) (Poblete-Castro *et al.*, 2014).

Em relação ao comportamento que o conteúdo de P na biomassa apresentou ao longo do ensaio foi semelhante ao reportado por Tobin *et al.*, (2007), para a estirpe *P. putida* CA-3. A partir do ensaio que realizaram, observaram também, que o aumento do conteúdo de P na biomassa ocorria quando o N se encontrava limitante no meio. Sugerindo, que a acumulação de P pode estar relacionada com vias metabólicas alternativas ou desconhecidas. Segundo Nikel *et al.*, (2013), o polifosfato pode estar envolvido em várias funções celulares, permitindo a *P. putida* suportar as condições adversas do meio, servindo como reservatório de energia.

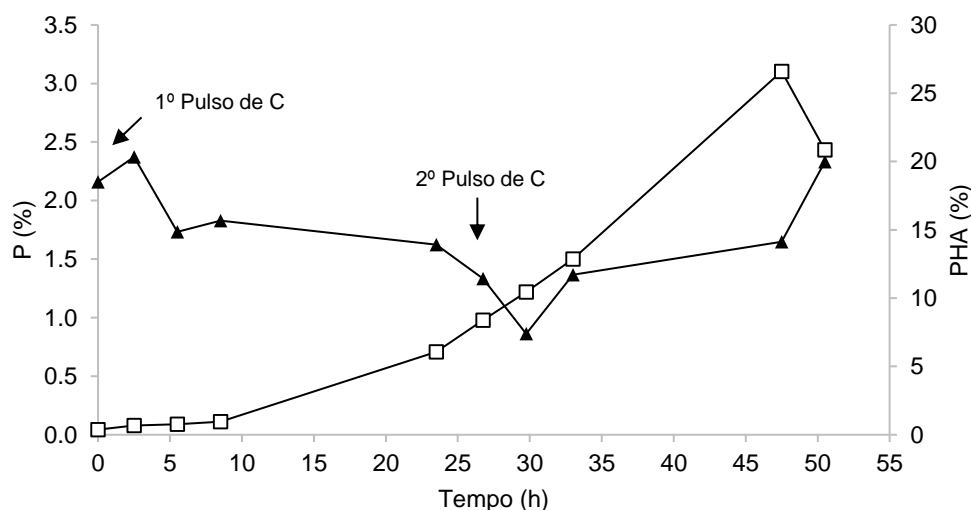


Figura 4.4: Variação do conteúdo de P (▲) e de PHA (□) na biomassa, ao longo da operação do reator H com a bactéria *P. putida*.

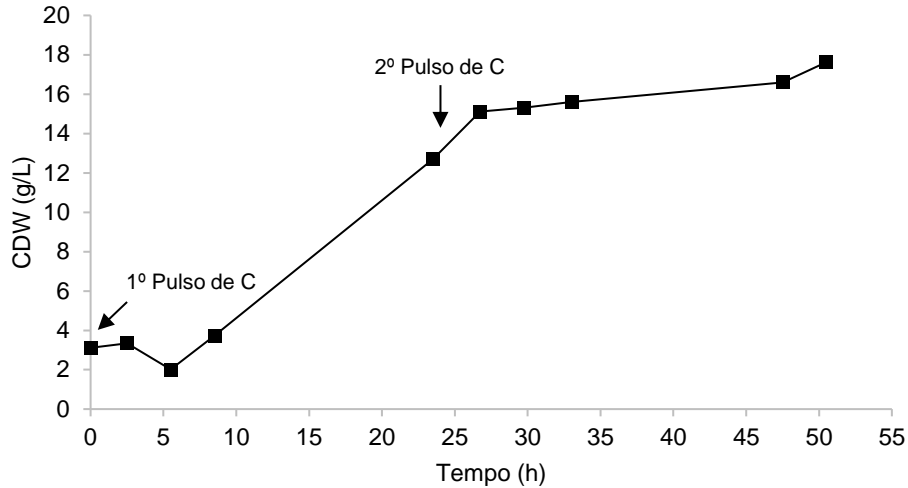


Figura 4.5: Variação da concentração de biomassa (■) ao longo da operação do reator H com a bactéria *P. putida*.

Conclui-se com a realização do ensaio no reator H, existe uma eventual relação entre o conteúdo de P na biomassa e a acumulação/degradação de PHA pela *P. putida*, sendo essa influenciada pela disponibilidade de N no meio, embora apresentasse um comportamento ligeiramente diferente à *C. necator* em condições de limitação de N no meio. A *P. putida* sob essas condições apresentou tendência par acumular PHA e aumentar o conteúdo de P na biomassa, no caso da *C. necator* observou-se uma diminuição do conteúdo de P na biomassa, acompanhado de uma acumulação de PHA.

4.2.3. *P. Chlororaphis* – Reator I

O reator I esteve em funcionamento durante 31 h. Ao longo do tempo de operação foram dados 2 pulsos de carbono (aos tempos de cultivo 0 e 22 h). Os pulsos foram dados com base na variação do pO₂ e na variação da agitação ao longo do tempo. Os pulsos foram dados com base na variação pO₂ no reator e a variação da agitação ao longo do tempo (Fig. 4.6). Quando ocorria alterações nos parâmetros era indicativo de uma menor necessidade de oxigênio, por parte das células, ou seja, não se encontrava carbono no meio, ou outro nutriente. Os dados deste ensaio foram fornecidos por Liane de Meneses (Tema da Tese: “*PHA extraction and functionalization using sub-supercritical fluids*”).

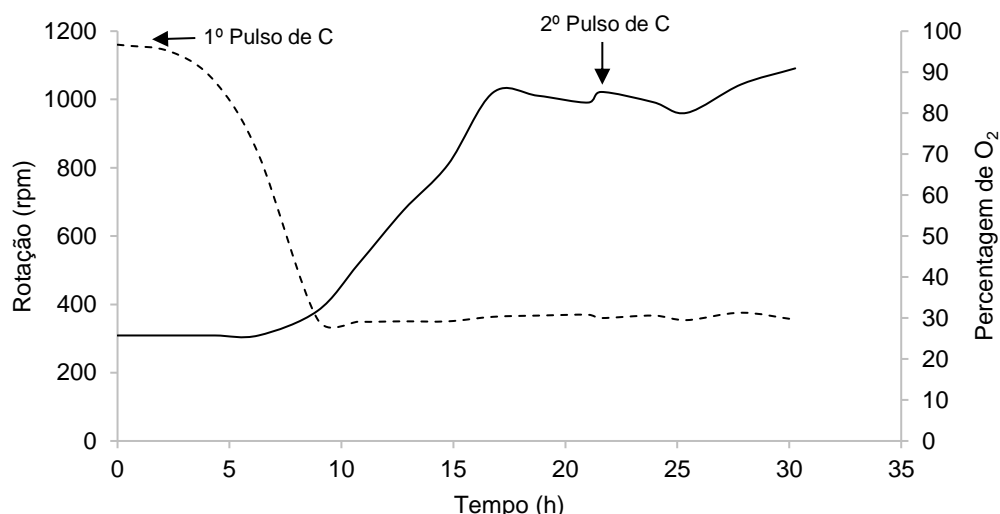


Figura 4.6: Variação da agitação (—) e do pO₂ no meio (- - -), ao longo da operação do reator I (o pO₂ foi controlado a 30% pela variação automática da agitação entre 200 e 1000 rpm) com a bactéria *P. chlororaphis*.

A partir da análise da Fig. 4.7, entre as 9 e as 17 h, ocorreu diminuição do conteúdo de polímero (de 6,7 para 2,7%) por parte da *P. chlororaphis*. Essa diminuição sugere que o polímero terá sido usado como fonte de energia para o crescimento celular, que às 17 h atingiu um CDW de 7,1 g/L (biomassa ativa iguala 6,9 g/L) (Fig. 4.8). No entanto, o conteúdo de P na biomassa, entre as 9 e as 13 h aumentou (de 0,9 para 1,2%), diminuindo depois entre as 13 e as 17 h (de 1,2 para 1,0%). Essa oscilação de valores ocorreu no momento, em que a concentração dos nutrientes disponíveis não era limitante. Provavelmente, a cultura optou por usar as reservas de carbono e o conteúdo de P na biomassa para crescimento celular.

Entre as 17 e as 22 h (antes do 2º pulso de carbono), observou-se aumento do conteúdo de PHA na biomassa (de 2,7 para 8,3%). Durante esta fase o crescimento celular foi mais lento (Fig. 4.8), o CDW aumentou de 7,1 para 8,9 g/L (a biomassa ativa aumentou de 6,9 para 8,2 g/L). O carbono consumido foi essencialmente usado para a acumulação de polímero pelas células. Durante esta fase, o conteúdo de P na biomassa não apresentou grandes alterações, oscilou entre 0,8 e 1,0%.

A agitação às 19 h mostrou tendência de diminuir e o pO₂ uma ligeira subida (Fig. 4.6). Com referido anteriormente, a alteração destes parâmetros era indicativa de uma limitação de nutrientes, posto isto foi dado o pulso de C às 22 h. Entre as 22 e as 24 h, a cultura continuou a acumular polímero (aumentou de 8,3 para 13,6%). O aumento do conteúdo de polímero na biomassa foi acompanhado do ligeiro aumento do conteúdo de P na biomassa de 1,0 para 1,2% (Fig. 4.8). No final das 24 h a cultura não apresentou crescimento celular, a concentração de biomassa ativa era semelhante à obtida às 22 h.

Entre as 24 e as 28 h, o conteúdo de PHA na biomassa diminuiu ligeiramente (de 13,6 para 12,6%), o mesmo aconteceu ao conteúdo de P na biomassa (diminuiu de 1,2 para 1,1%),

apresentaram um comportamento semelhante. Nesta fase, o consumo de polímero foi usado para crescimento celular, o CDW aumentou de 9,4 para 9,9 g/L (a biomassa ativa aumentou de 8,1 para 8,7 g/L).

Entre as 28 e as 31 h, observou-se aumento do conteúdo de polímero na biomassa (de 12,6 para 14,5%). No caso do conteúdo de P na biomassa aumentou ligeiramente (de 1,1 para 1,3%). A tendência do aumento do conteúdo de P na biomassa, que se observou após a adição do 2º pulso de carbono. Provavelmente, deveu-se à concentração de N ser limitante, como ocorreu nos ensaios com os reatores F e H. Em relação ao CDW, nessa fase observou-se um aumento insignificante de 9,9 para 10,3 g/L, o carbono consumido foi usado principalmente para a acumulação de PHA.

No final das 31 h obteve-se 1,5 g/L de PHA, com a seguinte constituição monomérica: 3HHx, 3HO, 3HD, 3HDd e 3HTd e obteve-se 8,8 g/L de biomassa ativa. Sun *et al.*, (2003) num ensaio sob condições semelhante, mas com uma fonte de carbono diferente (óleo de palma). Atingiram 1,4 g/L de PHA e uma concentração final de biomassa ativa de 3,3 g/L. Embora, a fonte de carbono seja diferente, em relação à quantidade de polímero foi semelhante em ambos os ensaios. No entanto no ensaio no reator I obteve maior concentração celular (Sun *et al.*, 2003). Noutro ensaio realizado com a *P. chlororaphis* DSM 50083, em condições semelhantes, Murh *et al.*, (2013), reportaram 3,57 g/L e 26,43 g/L de PHA e de biomassa ativa, respetivamente. A quantidade de PHA obtida no final do ensaio do reator é ligeiramente mais baixa, embora tendo conta a biomassa ativa, o ensaio do reator I obteve uma concentração celular muito menor (8,8 g/L).

No caso do conteúdo de P na biomassa variou entre 0,9 e 1,3%, mostrou tendência para aumentar ao longo do ensaio e um comportamento semelhante ao perfil de PHA. Ao longo do ensaio o conteúdo de P na biomassa aumenta ligeiramente, no momento em que a cultura consumiu PHA, na fase inicial. Ocorreu um aumento de conteúdo de P na biomassa após a adição do 2º pulso de carbono, nessa fase provavelmente a concentração de N era limitante. Como a cultura se encontrava submetida a condições de stress de disponibilidade de N, como resposta aumentou as suas reservas de energia, a partir da acumulação de polímero e de P (Achbergerová *et al.*, 2011). Em comparação aos ensaios realizados, com a *C. necator* e com a *P. putida*, em que se obteve 1,2% no reator F e 2,3% no reator H de conteúdo de P na biomassa no final de cada ensaio. O reator I obteve 1,3% de conteúdo de P na biomassa, que foi semelhante ao do reator F, mas muito mais baixo, em relação ao reator H.

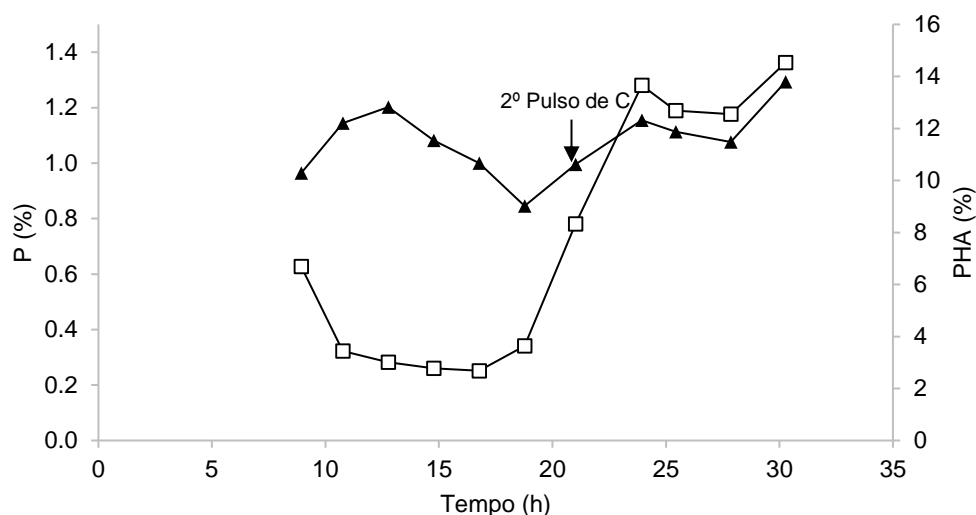


Figura 4.7: Variação da concentração de biomassa (■) ao longo da operação do reator I, com a bactéria *P. chlororaphis*.

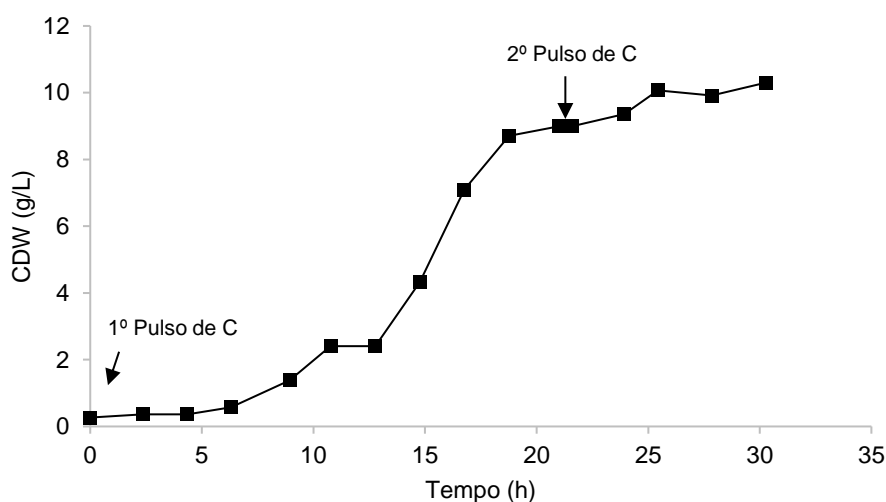


Figura 4.8: Variação do conteúdo de P (▲) e de PHA (□) na biomassa, ao longo da operação do reator I com a bactéria *P. chlororaphis*.

Conclui-se com a realização do ensaio no reator I, existe uma eventual relação entre o conteúdo de P na biomassa e a acumulação/degradação de PHA pela *P. chlororaphis*, sendo essa influenciada pela disponibilidade de N no meio. O comportamento observado ao longo do ensaio em relação à variação do conteúdo de P e do conteúdo de PHA foi semelhante ao da *P. putida*.

4.3. Conclusões

A partir da realização dos ensaios em *fed-batch*, com outras estirpes produtoras de PHA foi possível acompanhar o perfil do conteúdo de P na biomassa e do conteúdo de polímero ao longo do tempo. Com estes ensaios pretendia-se tentar perceber se estas diferentes culturas apresentavam o mesmo comportamento que a *C. necator* demonstrou no ensaio com o reator F, de modo a perceber se existe uma relação entre a acumulação de grânulos de PHA e de polifosfato.

No ensaio com a *P. putida* (Reator H), a partir dos resultados obtidos foi possível observar, que provavelmente existe uma relação entre a acumulação de polímero e o conteúdo de P na biomassa. Como o polifosfato pode estar envolvido em várias funções celulares, podendo estar relacionado com vias metabólicas alternativas ou inespecíficas. Na fase inicial do ensaio, quando se encontrava N e C no meio, houve diminuição do conteúdo de P na biomassa concordante com o crescimento da biomassa. Contudo, nos momentos finais, quando a concentração de N, provavelmente, era limitante, o conteúdo de P na biomassa aumentou. Em condições limitantes de N e havendo C disponível no meio, a cultura continuou a acumular PHA, o aumento do conteúdo de P na biomassa, como resposta às condições submetidas pelo meio de cultivo, aumentando assim as suas reservas de energia.

No caso do reator I operado com *P. chlororaphis*, a variação do conteúdo de P e de PHA na biomassa mostrou um comportamento semelhante ao reator H longo do ensaio. No entanto a variação do conteúdo de P não foi tão significativo como aconteceu com a *P. putida* (reator H). Provavelmente, a *P. chlororaphis* não é tão dependente das reservas de energia do polifosfato, embora no momento, em que se encontrava em condições limitantes de N, mostrou também tendência para aumentar o conteúdo de P na biomassa. Este ensaio demonstrou, também, que a acumulação de P ocorre como resposta às condições adversas, nomeadamente a limitação do nutriente N.

Em relação aos ensaios realizados com as diferentes estirpes, mostraram que provavelmente existe uma relação entre a acumulação de PHA e o conteúdo de P. No entanto, de alguma forma o aumento do conteúdo de P na biomassa está relacionado com a limitação de N. Como referido anteriormente, o polifosfato responde a estímulos, como condições adversas ou stress, causado pelo meio, servindo como reserva de energia. No entanto, a acumulação de P por parte das diferentes estirpes (*C. necator*, *P. putida* e *P. chlororaphis*) pode estar relacionado com vias metabólicas alternativas ou inespecíficas. A realização destes ensaios, comprova a existência de uma relação entre os grânulos de polímero e os grânulos de polifosfato, indicando a potencial existência de vias metabólicas ainda não descritas.

Capítulo 5

5. Testes com *Tetrasphaera*-PAOs com Diferentes Fontes de Carbono

A eutrofização é um problema alarmante, que tem afetado a qualidade da água potável e dos ecossistemas (descrito com maior detalhe no Capítulo 1). Entre os nutrientes presentes na água, o principal responsável, pela eutrofização é o fósforo (P). Ao longo dos últimos anos tem sido recorrente a utilização do sistema EBPR para a remoção de P de águas residuais. Este sistema consiste na utilização de lamas ativadas operadas de forma a promoverem o desenvolvimento de PAOs. Entre os organismos responsáveis pela remoção de fósforo, *Candidatus accumulibacter phosphatis*, são os mais caracterizados e estudados e estão presentes nas lamas de uma ETAR no intervalo de 4-22% (Oehmen, *et al.*, 2007). Existe outro grupo de microrganismos, as *Tetrasphaera*-PAOs, que devido à sua presença em elevado número em ETARs de Portugal e Dinamarca (cerca de 30%) e ao seu potencial para remover fósforo, podem contribuir significativamente no desempenho de EBPRs. As *Tetrasphaera*-PAOs utilizam fontes de carbono diferentes comparativamente às *Accumulibacter*, tendo preferência por consumir aminoácidos (Nielsen *et al.*, 2010; Nguyen *et al.*, 2011). Marques *et al.*, 2017, utilizando hidrolisado de caseína, como fonte de carbono, obteve uma cultura enriquecida por *Tetrasphaera* (Tet 1-266, 38,5%; Tet 2-892, < 1,0%; Tet 2-174, < 1,0%; Tet 3-654, 31,0%) com elevada capacidade de remoção de P. Apesar da presença de *Accumulibacter* na cultura, as *Tetrasphaera* foram as principais responsáveis pela remoção de P. Apesar da eficiência da cultura em remover os aminoácidos, não se conhecia a existência de preferência por determinados aminoácidos. Uma maior eficiência de P por C consumido poderá levar a otimização em sistemas EBPRs. Como objetivo neste capítulo, pretendia-se avaliar a preferência de uma cultura enriquecida com *Tetrasphaera*, por determinados aminoácidos, testando uma mistura de aminoácidos como fonte de carbono. Comparar a eficiência desta mistura na remoção de P e C com a fonte de C utilizada na operação em SBR, o hidrolisado de caseína. Como teste final foi avaliada a capacidade desta cultura de realizar remoção de fósforo utilizando águas residuais como fonte de carbono. Assim como, avaliar o impacto que esta cultura teria nos sistemas EBPR e na sua otimização.

5.1. Materiais e Métodos

5.1.1. Operação do reator J

O ensaio (Reator J) foi mantido com um volume de trabalho de 2 L de meio de cultivo, com ciclos de operação de 8 h, divididos em 4 h de anaerobiose, 1 h de sedimentação/decantação e 3h de aerobiose. O pH e a temperatura foram controlados a $7,0 \pm 0,1$ e a $20 \pm 0,1$ °C, respetivamente. O pH foi controlado pela adição automática da solução 0,1 M de HCl, quando o pH ultrapassava o *setpoint* (7,1). A temperatura foi controlada por um banho termostaticado. A agitação do reator foi definida a 300 rpm. Durante a fase anaeróbia, o reator era borbulhado com árgon (0,2 mL/min), para proporcionar as condições anaeróbias. Na fase anaeróbia, ocorria a alimentação em contínuo com Meio C (V = 400 mL), ao longo de 3 h. O Meio C era constituído por: NH₄Cl (0,37 g/L), MgSO₄.7H₂O (0,59 g/L), CaCl₂.2H₂O (0,28 g/L), ATU (0,73 mg/L), EDTA (19,8 mg/L) e 1,98 mL da solução de micronutrientes por 1L de Meio C (FeCl₃.6H₂O: 1,50 g/L; H₃BO₃: 0,15 g/L; CuSO₄.5H₂O: 0,03 g/L; KI: 0,18 g/L; MnCl₂.4H₂O: 0,12 g/L; Na₂MoO₄.2H₂O: 0,06 g/L; ZnSO₄.7H₂O: 0,12 g/L e CoCl₂.6H₂O: 0,15g/L). O Meio C era suplementado pelo reagente

hidrolisado de caseína, a fonte de carbono. Foi usada uma concentração de 0,4 g/L no Meio C até ao 31º dia de operação e a partir do dia 32º aumentou-se a concentração para 0,59 g/L.

Após as 4 h iniciais do ciclo, começava a fase sedimentação/decantação. Durante este período a agitação e o borbulhar encontravam-se parados. A cultura sedimentava ao longo de 45 min e a decantação ocorria nos 15 min finais da fase. Na fase aeróbia, o reator era arejado com ar (2 L/min), e na fase inicial o reator era alimentado com 600 mL de Meio P (1 min), constituído por: K_2HPO_4 (0,316 mg/L) e KH_2PO_4 (0,193 mg/L), com agitação de 300 rpm. Depois do 38º dia de operação do reator, o TRL fixou-se em 30 dias enquanto o TRH foi fixo durante a operação do SBR (16 h). Foram realizadas amostragens periódicas, para acompanhar o comportamento da cultura. Foram determinados os sólidos suspensos totais (TSS) e voláteis (VSS) por métodos *standard* (Marques *et al.*, 2017). As amostras eram centrifugadas, o sobrenadante era usado para quantificação de carbono através da determinação de carbono orgânico total (*total organic carbon*, TOC) e para determinação de P pelo método de análise de fluxo segmentado (Skalar 5100, Skalar Analytical, The Netherlands). Os *pellets* eram liofilizados e posteriormente hidrolisados para determinação do conteúdo de glicogénio por HPLC. A análise de FISH (*Fluorescence in situ hybridization*) foi realizada às amostradas fixas com paraformaldeído a 4% ou etanol, para avaliar a comunidade microbológica segundo a metodologia descrita em Amann *et al.*, (1995).

5.1.2. Ensaios em *Batch*

Foram realizados com o mesmo procedimento, 3 ensaios em *batch*, com duração de 8 h, divididos em 4 h de anaerobiose, 1 h de sedimentação/decantação e 3h de aerobiose. O pH e a temperatura foram controlados a $7,0 \pm 0,1$ e a $20 \pm 0,1$ °C, respetivamente. O pH foi controlado pela adição manual da solução 0,1 M de HCl, quando o pH ultrapassava 7,10 e a temperatura controlada por um banho termostaticado. A agitação o reator encontrava-se estabelecida a 300 rpm. O volume do vaso utilizado para estes ensaios foi de 500 mL volume de trabalho.

5.1.2.1. Meios de cultura dos Ensaios em *Batch*

A Solução M1 era constituída por: NH_4Cl (74,0 mg/L), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (98,0 mg/L), $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (55,0 mg/L), ATU (1,0 mg/L), EDTA (4,0 mg/L) e 0,40 mL da solução de micronutrientes por 1L de Solução M1.

A Solução M2 era constituída por: NH_4Cl (148,0 mg/L), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (238,0 mg/L), $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (110,0 mg/L), ATU (3,0 mg/L), EDTA (8,0 mg/L) e 0,79 mL da solução de micronutrientes por 1L de Solução M2.

5.1.2.2. Mix (22 aminoácidos)

No ensaio Mix (22 aminoácidos) foi preparada uma solução de meio de carbono, de modo a obter-se no reator 1,0 mM de carbono de cada aminoácido (arginina, ornitina, lisina, glutamina, citrulina, asparagina, alanina, treonina, glicina, valina, serina, prolina, isoleucina, leucina, metionina, histidina, fenilalanina, ácido glutâmico, ácido aspártico, cisteína, tirosina e triptofano).

5.1.2.3. Hidrolisado de caseína

No ensaio com hidrolisado de caseína, foi preparada uma solução de meio de carbono, de modo a obter-se no reator, uma concentração de 22,0 mM de carbono.

5.1.2.4. Águas residuais

No caso do ensaio com as águas residuais, estas foram recolhidas da ETAR de Setúbal à saída do decantador primário e acondicionadas a 4°C. Antes do início do teste a temperatura das águas residuais foi normalizada à temperatura ambiente.

Antes do final da fase aeróbia do reator J, era removido 400 mL de caldo. Deixava-se sedimentar, o sobrenadante era descartado e as lamas eram lavadas com a Solução M1, sendo este passo repetido duas vezes. Após as lavagens as lamas era resuspensas com 250 mL de Solução M2.

Antes do início da fase anaeróbia, o reator ($V = 500$ mL) era inoculado com os 250 mL das lamas resuspensas, com 150 mL de Meio P. Antes de se adicionar a solução da fonte de carbono (100 mL), o reator era borbulhado com argon, para proporcionar as condições anaeróbias.

Na fase de sedimentação/decantação foi repetido o processo de lavagem com a Solução M1, duas vezes e resuspensas com 250 mL de Solução M1.

Antes do início da fase aeróbia, o reator era inoculado com os 250 mL das lamas resuspensas, foi adicionado 100 mL de água desionizada (para substituir o volume da solução de carbono). Antes de se adicionar 150 mL de Meio P, o reator foi arejado com ar, de modo a proporcionar as condições aeróbias. No final dos ensaios, foi realizado o processo de lavagem com a solução M1 e as lamas foram adicionadas ao reator J.

Nos diferentes ensaios em *batch* foram realizadas amostragens frequentes para monitorização do desempenho da cultura às condições dos ensaios, seguido os mesmos métodos analíticos usados no reator J.

5.1.3. Técnicas analíticas

A determinação da concentração de P, de acetato e propionato no sobrenadante e de carbono foi realizada como encontra-se descrito na secção 2.1.4. Técnicas analíticas (Capítulo 2).

5.1.3.1. Determinação da concentração dos aminoácidos

A quantificação da concentração dos diferentes aminoácidos no ensaio em *batch* com Mix (22 aminoácidos) foi por HPLC, com detetor eletroquímico de ouro (DIONEX ICS3000, EUA), equipado com uma coluna Aminopac PA10 DIONEX 4x250 mm. O eluente foi NaOH/CH₃COONa consumiu um fluxo de 0,8 ml/min e 30°C e 20 µL de amostras injetadas.

5.1.3.2. Determinação da concentração de glicogénio na biomassa

A preparação dessas amostras consistiu na hidrólise de 2-4 mg de biomassa liofilizada com 2 mL de HCl (0,9 M) a 100 °C, durante 3,0 h. Após a hidrolise, 1,5 mL de amostra foi centrifugada a 12 000 rpm (VWR, MicroStar), durante 2 min e filtradas com filtros 0,20 µm

(Whatman). A análise de glicogénio era realizada a partir do HPLC, como encontra-se descrito na secção 2.1.4. Técnicas analíticas (Capítulo 2).

5.1.3.3. Microbiologia: FISH – Caracterização microbiológica

A análise da comunidade bacteriana foi realizada através de FISH (*fluorescence in situ hybridization*) como descrito por (Amann *et al.*, 1995). As amostras retiradas no final da fase anaeróbia foram fixadas com paraformaldeído a 4% ou etanol. As sondas de oligonucleótidos utilizadas foram o EUBmix marcado com iso-tiocianato de fluoresceína (FITC) (EUB338 (Amann *et al.*, 1990), EUB338II, EUB338III (Daims *et al.*, 1999)) para todas as bactérias, com as sondas marcadas com cianina 3 (Cy3) TET1-266, TET 2-174, TET 2-892 e TET 3-654 para *Tetrasphaera* Clades I, II e III, respetivamente (Nguyen *et al.*, 2011), PAOmix (PAO651, PAO462, PAO846 (Crocetti *et al.*, 2000)) para *Candidatus Accumulibacter phosphatis*, CPB_654 para *Candidatus Competibacter phosphatis* (McIlroy *et al.*, 2010), e Super DFmix (TFOmix (TFO_DF218, TFO_DF618), DFmix (DF988, DF1020) e DF198) para *Defluviococcus* Clades I, II e III (Wong *et al.*, 2004; Meyer *et al.*, 2006; Nittami *et al.*, 2009). As amostras de biomassa foram visualizadas utilizando um microscópio epifluorescente Zeiss Imager D2 (10x100).

5.2. Resultados e Discussão

5.2.1. Ensaio em SBR – *Tetrasphaera*-PAOs

O reator foi inoculado com uma cultura previamente enriquecida de *Tetrasphaera* conservada em glicerol. A fase inicial do ensaio em SBR (reator J) teve como objetivo reativar a cultura. O reator foi alimentado com hidrolisado de caseína (consiste numa mistura de aminoácidos e pequenos péptidos), com uma concentração de 0,40 g/L (no Meio C), até ao 31º dia de operação. O hidrolisado de caseína foi utilizado como única fonte de carbono durante a operação do reator. A utilização de hidrolisado de caseína para enriquecimento de uma cultura PAO em *Tetrasphaera* foi anteriormente demonstrado por Marques *et al.*, (2017). O reator J foi operado de forma semelhante ao descrito por Marques *et al.*, (2017), resultando numa cultura maioritariamente constituída por *Tetrasphaera* (aproximadamente 80% da fração total de biomassa), tendo sido detetado também *Accumulibacter* (aproximadamente 19% da fração total de biomassa). Detalhes da caracterização microbiana são apresentados no final desta secção.

A partir da Fig. 5.1, observou-se que no 3º dia de operação, a concentração de biomassa era ainda baixa (0,7 g TSS/L). Assim como, a capacidade de remoção de carbono durante a fase anaeróbia (65,3%), que se deveu à baixa concentração celular e ao tempo de inatividade das lamas que precedeu o inóculo. A libertação anaeróbia e remoção aeróbia de fósforo apresentaram valores de 0,37 e 0,52 mM, respetivamente. Com o decorrer dos dias de operação do SBR, verificou-se crescimento celular (31º dia: 1,8 g TSS/L) sendo o mesmo associado a um aumento de consumo de carbono durante a fase anaeróbia (31º dia: 91,9%) e de remoção de P. Em relação à acumulação de P, verificou-se um aumento (31º dia: 0,9 mM), embora entre o 17º e o 31º dia de operação tenha ocorrido uma ligeira diminuição de acumulação de P (de 1,5 para 0,9 mM) e de libertação de P (de 1,0 para 0,2 mM). Essas diminuições podem estar associadas ao

envelhecimento das lamas (nesta fase o TRL ainda não era controlado), tendo assim impacto na libertação/remoção de P.

No 32º dia de operação a concentração da fonte de carbono foi aumentada para 0,59 g/L (no Meio C). No entanto, observou-se uma diminuição ligeira da concentração de biomassa, entre o 31º e 38º dia de operação (de 1,8 para 1,6 g TSS/L). Contudo, a acumulação de P também aumentou ligeiramente (de 0,9 para 1,0 mM) e a libertação de P (de 0,2 para 0,9 mM). Ocorreu apenas remoção de 64,4% de carbono, durante a fase anaeróbia, baixou ligeiramente em relação aos outros dias de operação. Essa diminuição pôde estar associada a uma seleção de organismos com uma maior capacidade de remoção de P. Para evitar o envelhecimento excessivo das lamas, mas ainda assim permitir a seleção de organismos com capacidade de remoção de C e P, foi iniciada a purga ao dia 38º de operação do SBR. Como referido por Zuthi *et al.*, (2013), são necessários pelo menos 20 dias de TRL (tempo de retenção de lamas), para obter uma cultura estável para uma boa performance de remoção de P em sistemas EBPR. Em ETARs de remoção biológica de nutrientes normalmente opta-se por usar TRL entre 14-25 dias (Griffiths *et al.*, 2002). O reator foi mantido com estas condições até ao primeiro dia de teste *batch* (52º dia de operação) o que permitiu 14 dias de operação necessários para estabilidade do EBPR. Esta opção foi tomada com o intuito de promover a estabilidade do reator e da cultura antes do início dos testes em *batch*. O SBR foi mantido com um TRL estipulado de 30 dias até ao final do estudo.

Entre o dia 52º e o 74º dia de operação (Fig. 5.1), existiu um decrescimento de biomassa que está associado a uma remoção de grandes volumes (400 mL) de cada vez (para a realização dos ensaios em *batch*) resultando numa diminuição da concentração de biomassa gradual em cada ciclo, diminuiu de 1,5 para 1,0 g/L TSS. Em relação à acumulação de P encontrava-se estável, não se observou qualquer alteração, permaneceu a 0,63 mM, assim como a remoção de carbono na fase anaeróbia (diminuiu ligeiramente de 80,6 para 79,8%).

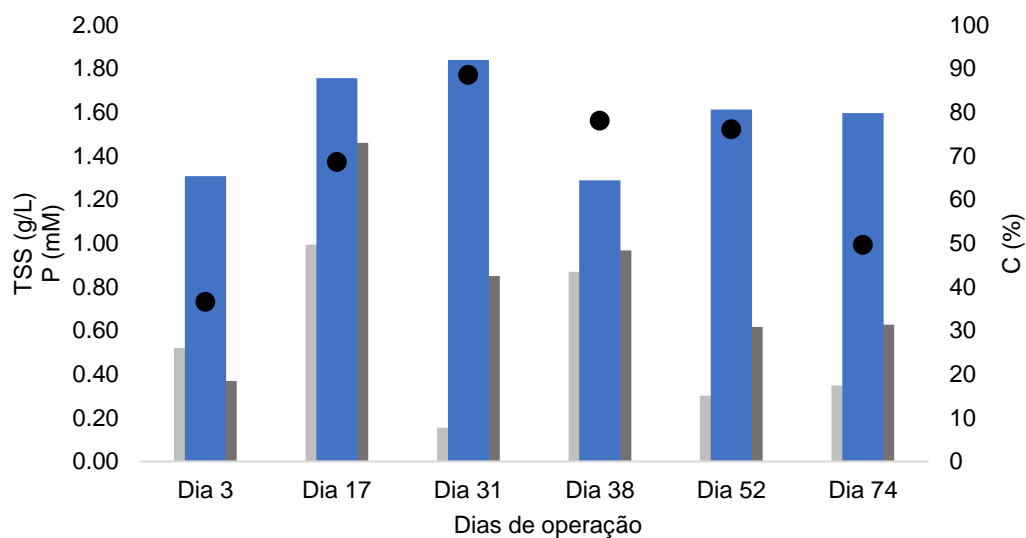


Figura 5.1: Variação de TSS (●), de carbono removido na fase anaeróbia (■), libertação de P, na fase anaeróbia (■) e acumulação de P na fase aeróbia (■), ao longo dos dias de operação do Reator J.

A partir da Fig. 5.2, observa-se o comportamento que a cultura apresentou ao longo do ciclo (52º dia de operação), que foi semelhante ao comportamento apresentado em outros ciclos de amostragem. A partir dos dados da Fig. 5.2, a concentração de carbono no meio, nas 3 h iniciais da fase anaeróbia aumentou (de 0,1 para 0,2 mM) e verificou-se uma ligeira diminuição na hora final (de 0,19 para 0,18 mM). Esta variação da concentração de carbono na fase anaeróbia deveu-se à alimentação ter sido realizada em contínuo. A utilização de alimentação semi-contínua visou simular as condições reais numa ETAR, em que as concentrações de substrato no reator (contínuo) são sempre baixas. Esta estratégia fez parte da abordagem desenvolvida por Marques *et al.*, (2017) para enriquecer *Tetrasphaera*. A cultura consumiu 7,3 mM de carbono, removendo 80,6% do carbono total alimentado. Em relação à libertação de P no meio, por parte da cultura, ocorreu libertação de 0,3 mM de P (aumentou de 1,7 para 2,0 mM), ao longo desta fase. Na fase anaeróbia, como foi reportado por Nguyen *et al.*, (2015) e Marques *et al.*, (2017) ocorreu consumo de glicogénio pela *Tetrasphaera* (Fig. 5.2). Entre as 0 e as 2 h, o glicogénio diminuiu de 0,2 para 0,0 C mM Embora o reator J estivesse enriquecido por *Tetrasphaera* (Fig. 4 e 5), havia a presença de *Accumulibacter* (Fig. 5.3). As *Accumulibacter* têm um comportamento semelhante às *Tetrasphaera*, na fase anaeróbia consomem o glicogénio armazenado (Fig.1.7, secção 1. Introdução). A variação do conteúdo de glicogénio na biomassa, ao longo do ciclo, pode estar associado às *Tetrasphaera* como às PAOs (Oehmen *et al.*, 2007).

Entre as 4 e as 5 h, ocorreu a sedimentação/decantação para não haver passagem de carbono para a fase aeróbia e conseqüentemente não promover o crescimento de organismos heterotróficos. Durante a fase aeróbia (entre as 5 e as 8 h), ocorreu diminuição da concentração de P (diminuiu de 2,0 para 1,4 mM), ou seja, ocorreu acumulação de 0,6 mM de P, por parte da cultura. Existiu um consumo de carbono insignificante, removeu 0,1 mM (0,6% do carbono total alimentado). O carbono consumido durante a fase anaeróbia provavelmente foi utilizado pela cultura na fase aeróbia para a regeneração de glicogénio, para além de crescimento celular. Marques *et al.*, (2017) realizaram ensaios em *batch* com diferentes fontes de carbono individualmente (aspartato, glucose e glutamato) onde observaram o oposto, ocorreu produção de glicogénio e acumulação de P_i na fase anaeróbia. Aerobicamente ocorreu libertação de P_i e a degradação do glicogénio armazenado. Segundo Marques *et al.*, (2017) esse comportamento observado, pode estar relacionada com o metabolismo das *Tetrasphaera*. Uma mistura de aminoácidos ou alguns aminoácidos requererem energia adicional para serem metabolizados, por isso ocorreu a degradação de glicogénio e a libertação de P_i (na fase aeróbia). Outra hipótese sugerida é a energia adicional gerada a partir da degradação do polifosfato e do glicogénio foi utilizada para a ativação/cominação de enzimas necessárias para o armazenamento intracelular dos aminoácidos. Os aminoácidos armazenados foram usados para a regeneração do glicogénio, na fase aeróbia. Como Nguyen *et al.*, (2011) e Kristiansen *et al.*, (2013) demonstraram as *Tetrasphaera* não tem capacidade de produção de PHA. Portanto, no ensaio em SBR (reator J) os aminoácidos foram parcialmente armazenados intracelularmente (fase anaeróbia). Posteriormente, na fase aeróbia, foram utilizados na regeneração do glicogénio. Por essa razão,

entre as 5 e as 6 h, aumentou o conteúdo de glicogénio (aumentou de 0,3 para 0,4 C mM). Contudo observou-se diminuição da concentração de glicogénio, entre as 6 e as 8 h (diminuiu de 0,4 para 0,2 C mM). Ao longo do ciclo, a cultura apresentou um comportamento semelhante, em relação à variação dos diferentes componentes (C, P e glicogénio), assim como reportado por Marques *et al.* (2017).

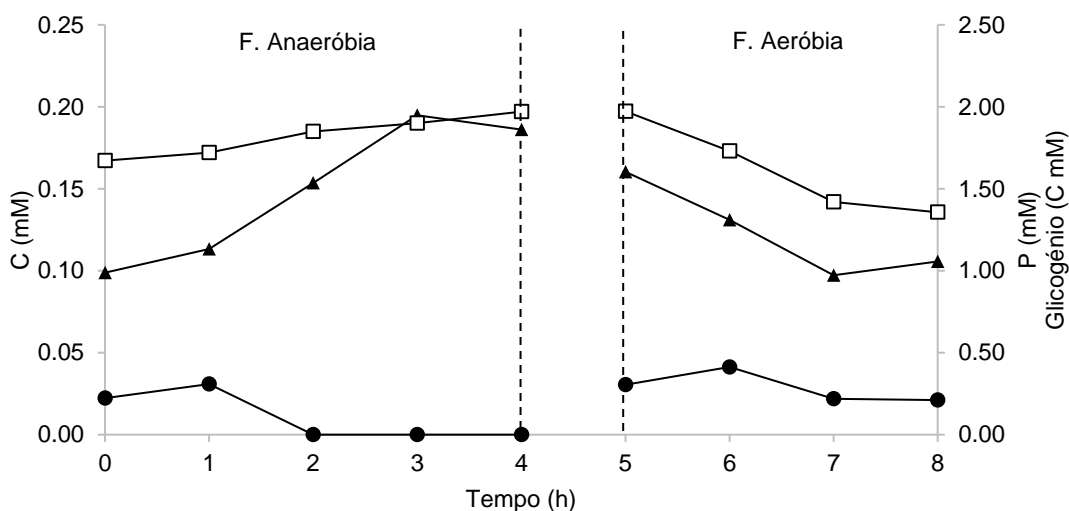


Figura 5.2: Variação de glicogénio (●), de carbono (▲), e de P no sobrenadante (□) ao longo do ciclo, no 52º dia de operação do Reator J.

5.2.2. FISH – Caracterização da comunidade microbiológica

Durante o período dos ensaios em *batch* (entre o 52º e o 80º dia de operação), realizou-se FISH, para caracterizar a comunidade microbiana e avaliar a estabilidade da cultura ao longo do período em que ocorreram. A partir de uma avaliação visual das culturas (fotografias típicas do observado são apresentadas nas Fig. 5.3 e Fig. 5.4) foi notável que a cultura não apresentava diferenças significativas da quantidade dos diferentes organismos, ao longo do tempo. O reator J encontrava-se enriquecido essencialmente por *Tetrasphaera* (aproximadamente 80% da fração total de biomassa). Enquanto, a quantidade de PAOs e GAOs foi aproximadamente 20% e < 1% da fração total de biomassa, respetivamente (Fig. 5.3). Com estes dados, os resultados dos ensaios em *batch* são válidos, já que a cultura do reator se encontrava enriquecida por *Tetrasphaera*.

Na Fig. 5.4 encontra-se representado o enriquecimento da cultura pelas diferentes estirpes das *Tetrasphaera*. O reator J era construído principalmente pela *clades* identificadas pelas sondas de FISH Tet 1-266, Tet 2-892 e Tet 3-654, não sendo notável uma diferença significativa entre os 3 grupos e em menor quantidade pela Tet 2-174. Marques *et. al* (2017), com a mesma fonte de carbono (hidrolisado de caseína) e sob condições de operação semelhantes, obtiveram uma cultura enriquecida principalmente por duas *clades* de *Tetrasphaera*. Essa comunidade microbiológica apresentava a seguinte composição: Tet 1-266, 38,5 ± 1,4; Tet 2-892, < 1,0%; Tet 2-174, < 1,0%; Tet 3-654, 31,0 ± 4,3%; PAOs, 21,7 ± 8,8% e GAOs < 1,0% da fração total de

biomassa. A quantidade de PAOs e GAOs reportada não apresenta grande diferença em comparação ao ensaio em SBR. Segundo Nguyen *et al.*, (2011), a razão para a qual a *clade* Tet 2-174 existe em menor quantidade em ensaios em que a fonte de carbono consiste numa mistura de aminoácidos, deve-se ao facto desta *clade* provavelmente consumir preferencialmente acetato. Sugerido por Marques *et al.*, (2017), o acetato é um componente originado a partir da fermentação dos aminoácidos pelas *Tetrasphaera* (Fig.1.7, secção 1. Introdução). Como as *Accumulibacter* consomem preferencialmente VFAs, provavelmente por essas razões no reator J encontrava-se aproximadamente 20% de PAOs da biomassa total. Por outro lado, não existe uma provável justificação para a diferença da quantidade de Tet 2-892 no reator J e no ensaio de Marques *et al.* (2017), já que foram realizados em condições semelhantes.

Segundo Nguyen *et al.*, (2011), as diferentes estirpes podem apresentar morfologias diferentes, entre as quais pequenos *coccus*, aglomerados de *coccus*, bastonetes ou filamentosas (Tabela 5.1). Contudo, a partir das imagens de FISH exemplificadas na Fig. 5.4, não foi possível distinguir com clareza as diferentes morfologias, pela forma de agregação compacta que as bactérias apresentavam. No entanto, não foram notáveis diferenças morfológicas entre as diferentes estirpes, essencialmente constituída por *coccus*, aglomerados de *coccus* e bastonetes, e não se observaram morfologias filamentosas como no ensaio reportado por Nguyen *et al.*, (2011).

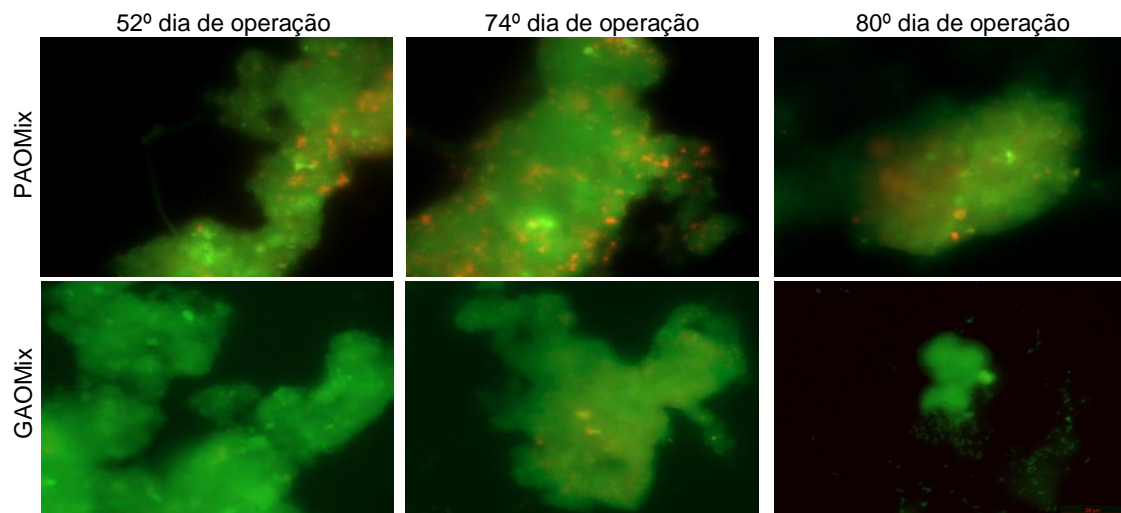


Figura 5.3: Imagens de FISH das lamas do SBR do reator J. As EUBMIX encontram-se a verde e PAOMix e GAOMix a laranja, nos diferentes dias de operação.

Tabela 5.1: Morfologia das diferentes estirpes de *Tetrasphaera* Adaptado de Ngunyen *et al.*, (2012)

Estirpes	Morfologia
Tet 1-266	Pequenos <i>coccus</i> , aglomerados de <i>tetracoccus</i> , pequenos bastonetes ramificas e hastes curtas
Tet 2-174	bastonetes ramificados, pequenos <i>coccus</i> e aglomerados de <i>tetracoccus</i> ramificadas
Tet 2-892	Pequenos bastonetes e filamentosas
Tet 3-654	Pequenos bastonetes, pequenos <i>coccus</i> , e filamentosas

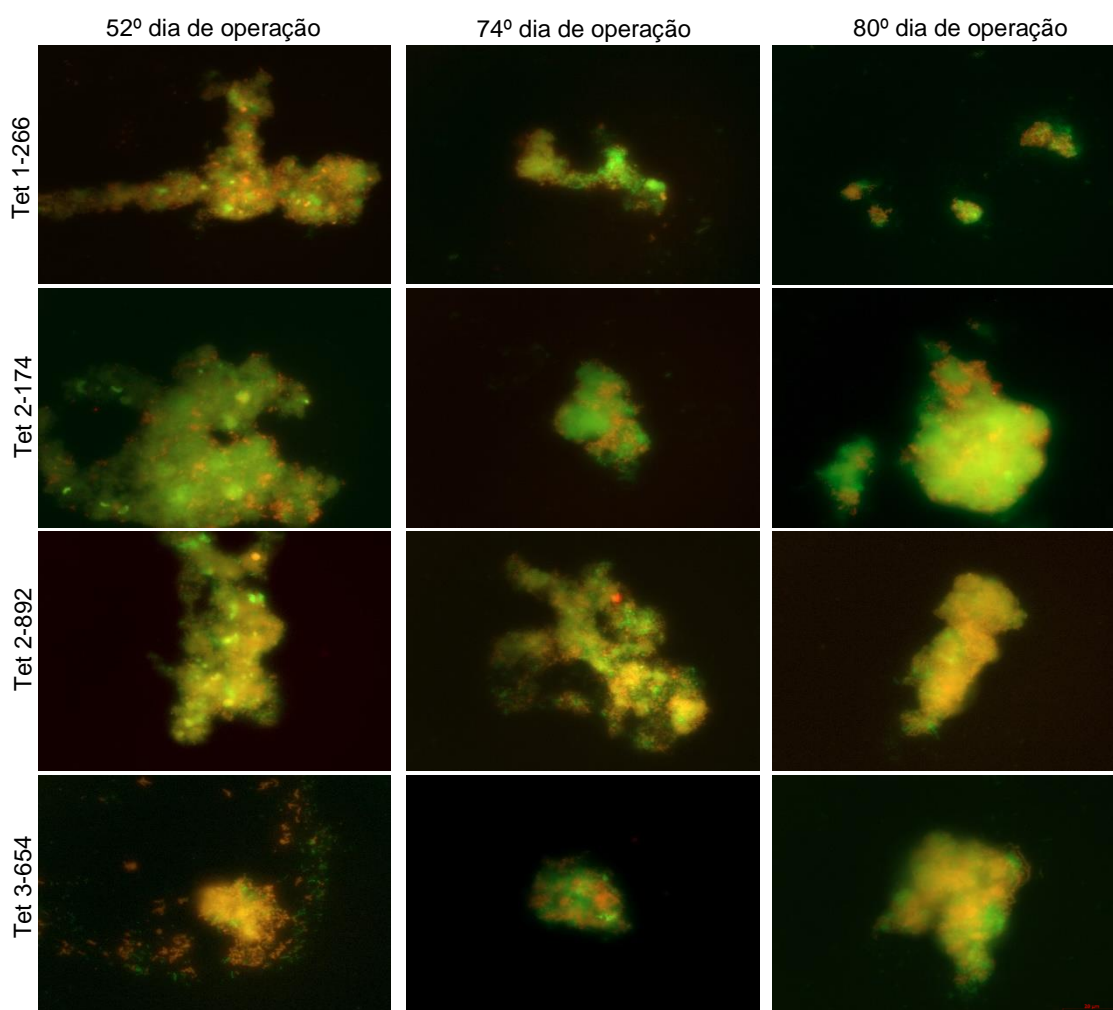


Figura 5.4: Imagens de FISH das lamas do SBR do reator J. As EUBMIX encontram-se a verde e as diferentes de Tet 1-266, Tet 2-174, Tet 2-892 e Tet 3-654 a laranja, nos diferentes dias de operação.

Na Tabela 5.2, encontra-se a comparação de dados obtidos no SBR (entre o 38º e 74º dia de operação) e os dados reportadas na literatura. Na fase anaeróbia, observou-se uma taxa de consumo de glicogénio e de libertação de P_i por consumo de substrato de $0,08 \pm 0,04$ C-mmol/C-mmol e $0,09 \pm 0,05$ P-mmol/C-mmol, respetivamente. No entanto, num ensaio realizado sob condições semelhantes, Marques *et al.*, (2017) observaram taxas superiores, semelhantes às reportadas com propionato e acetato, em ensaios numa cultura enriquecida por *Accumulibacter*. A

semelhança desses dados reportados, segundo Marques *et al.*, (2017), indica que as *Tetrasphaera* e as *Accumulibacter* possuem necessidade energética semelhantes para o consumo de substrato. Deste modo, no ensaio em SBR (reator J) as taxas observadas foram indicativas de uma menor necessidade energética para o consumo de substrato. Essa menor necessidade energética resultou numa menor quantidade de glicogénio degradado e de libertação de P_i . Outra hipótese por ter-se obtido esses dados, foi a composição da cultura. A cultura nos ensaios de Marques *et al.*, (2017) era constituída maioritariamente por organismos identificados pelas sondas FISH Tet 1-266 e Tet 3-654 e o reator J era constituído por Tet 1-266, Tet 2-892 e Tet 3-654. Desta forma, a cultura (reator J), provavelmente apresentava diferentes interações metabólicas e sinérgicas entre as diferentes *clades*.

No final da fase aeróbia (Tabela 5.2), observou-se no reator J, menor produção de glicogénio ($0,28 \pm 0,07$ C mM), enquanto que Marques *et al.*, (2017) observaram $1,38 \pm 0,70$ C mM para o seu enriquecimento *Tetrasphaera* e nos ensaios com as *Accumulibacter* foi reportado produção 3,62 C mM (acetato) e 3,78 C mM (propionato) Em ambos os ensaios, com as *Tetrasphaera*, observou-se produção de glicogénio, que está relacionada com o consumo de substrato na fase anaeróbia (Nguyen *et al.*, 2011). No reator J, a produção foi menor provavelmente devido à menor concentração celular. Por outro lado, a diferente composição microbiológica da cultura pode ter tido um efeito diferenciador. No caso das *Accumulibacter*, o carbono usado para a produção de glicogénio foi proveniente da degradação do PHA. Os diferentes rendimentos de produção de glicogénio estão relacionados, provavelmente com a concentração de celular nos diferentes ensaios. Como a cultura no reator J apresentava uma concentração celular baixa, ao longo da operação, observou-se acumulação de $0,74 \pm 0,16$ mM de P. No entanto, em relação à quantidade de P na biomassa (12,6-19,7% de P em TSS), encontrava-se dentro da gama de valores reportado nos diferentes ensaios, com *Tetrasphaera* e *Accumulibacter*.

Tabela 5.2: Comparação dos dados obtidos da operação do ciclo de SBR, com dados reportados em ensaios com *Tetrasphaera* e *Accumulibacter*.

Ensaio em SBR	<i>Tetrasphaera</i> + <i>Accumulibacter</i>		<i>Accumulibacter</i>	
	Hidrolisado de Caseína		Acetato	Propionato
	Reator J	Fase Anaeróbia		
Libertação de P/ subs. (P-mmol/C-mmol)	0,09 ± 0,05	0,35 ± 0,08 ^a	0,48 ^b	0,40 ^b
Glicogénio cons./ subs. (C-mmol/C-mmol)	0,08 ± 0,04	0,38 ± 0,12 ^a	0,50 ^b	0,33 ^b
pH Anaeróbico	6,80	6,70 ± 0,10 ^a	7 ^b	7 ^b
		Fase Aeróbia		
Acumulação de P (P mM)	0,74 ± 0,16	1,76 ± 0,25 ^a	2,50 ^d	2,20 ^d
P (%) em TSS	12,6-19,7	8-19 ^a	7-17 ^e	7-17 ^e
Produção de glicogénio (C mM)	0,28 ± 0,07	1,38 ± 0,70 ^a	3,62 ^f	3,78 ^g

^a(Marques *et al.*, 2017); ^b(Smolders *et al.*, 1993); ^c(Oehmen; Vives, *et al.*, 2005); ^d(Oehmen; Yuan, *et al.*, 2005); ^e(Oehmen *et al.*, 2007); ^f(Smolders *et al.*, 1993); ^g(Oehmen; J. Zeng, *et al.*, 2007)

5.2.3. Ensaio em *Batch* – *Tetrasphaera*-PAOs

Os ensaios em *batch* foram realizados de forma periódica ao longo do tempo, de forma a não afetar o desempenho de remoção de C e P das lamas do reator J e manter estável o TRL (30 dias). Realizou-se um ensaio em *batch*, em que a fonte de carbono era constituída por uma mistura de 22 aminoácidos (secção 5.1.2. Ensaio em *Batch*). O objetivo foi de identificar preferências de determinados aminoácidos relativamente a outros por parte das *Tetrasphaera*. Com base Fig. 5.5, entre os diferentes aminoácidos utilizados a cultura apresentou preferência por aminoácidos específicos, sendo notável a remoção de carbono na fase anaeróbia. Os aminoácidos que foram mais consumidos, foram: prolina (100%), lisina (97,8%), glicina (97,8%), tirosina (89,1%), arginina (81,3%) e cisteína (80,1%).

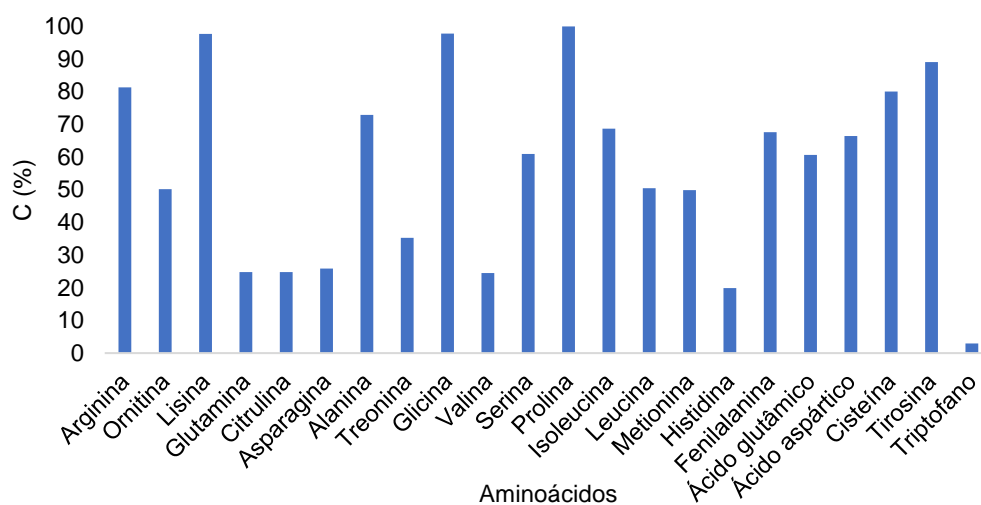


Figura 5.5: Variação do conteúdo de carbono removido entre os diferentes aminoácidos na fase anaeróbia, no ensaio em *batch* Mix (mistura 22 aminoácidos).

Nguyen *et al.*, (2015) realizaram um ensaio em *batch* em que a fonte de carbono era glicina, com lamas ativada provenientes de uma ETAR (Dinamarca). As lamas ativadas eram constituídas por *Tetrasphaera* e *Accumulibacter*, 27% e 4% da biomassa total, respetivamente. Durante a 1 h da fase anaeróbia, observaram o armazenamento total da glicina e libertação de P_i ao longo dessa fase. Aerobicamente ocorreu o consumo da glicina armazenada intracelular e a acumulação de P_i . A partir de MAR-FISH (Microautoradiography-FISH), observaram que o consumo de glicina ocorreu apenas por parte das *Tetrasphaera* e confirmaram que estas bactérias não produzem PHA. Marques *et al.*, (2017) reportam com a mesma fonte de carbono, um ensaio em *batch*, com uma cultura enriquecida por *Tetrasphaera*, como descrita na secção anterior. Observaram o mesmo reportados por Nguyen *et al.*, (2015) e visualizaram a degradação de glicogénio na fase anaeróbia e a sua regeneração na fase aeróbia. Estes resultados vão ao encontro dos resultados do ensaio com a mistura de aminoácidos, onde observou-se o consumo da maior parte da glicina (97,8%), na fase anaeróbia, e a preferência das *Tetrasphaera* por este substrato.

A eficiência da cultura para processar a mistura de aminoácidos foi comparada com um ensaio em *batch* realizado com hidrolisado de caseína com concentração de C semelhante e operado de forma similar. A comparação foi realizada através de taxas (Tabela 5.3) e perfis de variação dos diferentes componentes ao longo dos ensaios (Fig. 5.6 e 5.7). O consumo de carbono observado nos dois ensaios foi similar, 11,9 mM (54,5% do carbono total removido) e 10,5 mM (55,1% do carbono total removido), para a mistura de aminoácidos e hidrolisado de caseína, respetivamente. No entanto, observou-se ligeira diferença da quantidade de carbono consumido, maior no caso do hidrolisado de caseína, provavelmente devido ao facto da cultura se encontrar habituada a usar esta fonte de carbono. Em relação à libertação de P entre o ensaio com Mix (22

aminoácidos) e com hidrolisado de caseína, não demonstraram grande diferença, 2,1 e 2,2 mM, respectivamente. Na fase anaeróbia, em ambos ocorreu consumo de glicogénio, no caso do ensaio com o Mix (diminuiu de 0,59 C mM, de 1,41 para 0,82 C mM) e com hidrolisado de caseína (diminuiu 0,80 C mM, de 1,87 para 1,07 C mM). No ensaio com hidrolisado de caseína observou-se maior consumo de glicogénio (0,87 C mM), enquanto no ensaio com o Mix ocorreu consumo de 0,59 C mM. Como o hidrolisado de caseína é constituído por aminoácidos e por pequenos péptidos, provavelmente requer uma maior quantidade de energia adicional para o armazenamento destes substratos. Outra explicação, poderá ter sido os produtos de fermentação (VFAs) da *Tetrasphaera* a partir do hidrolisado de caseína, terem sido utilizados pelas *Accumulibacter*. Enquanto a mistura de aminoácidos pode ter levado à acumulação intracelular direta de aminoácidos para armazenar na fase aeróbia sob a forma de glicogénio. Por essas razões, provavelmente ocorreu maior degradação de glicogénio no ensaio com o hidrolisado de caseína, no entanto, a diferença de consumo de glicogénio foi ligeira.

Na Tabela 5.3, encontram-se as taxas de libertação de P e de glicogénio por substrato consumido. Nos dois ensaios observaram-se valores próximos. Como referido no parágrafo anterior, a necessidade energética para o armazenamento de substrato foi apenas ligeiramente diferente nos dois ensaios. No ensaio em *batch* com Mix a taxa de libertação de P por consumo de substrato foi 0,18 P-mmol/C-mmol e a taxa de consumo de glicogénio por consumo de substrato foi 0,07 C-mmol/ C-mmol. No ensaio com hidrolisado de caseína obteve-se 0,20 P-mmol/C-mmol e 0,06 C-mmol/ C-mmol. Em comparação aos dados na Tabela 1, a taxa de libertação de P por consumo de substrato do ensaio em SBR ($0,09 \pm 0,05$ P-mmol/C-mmol) foi inferior ao obtido nos ensaios em *batch*. Por outro lado, a taxa de consumo de glicogénio por consumo de substrato do ensaio em SBR ($0,08 \pm 0,04$ C-mmol/ C-mmol) foi semelhante. A energia necessária para o transporte da fonte de carbono pode provir do polifosfato ou do glicogénio. Como a libertação de P é proveniente da degradação de polifosfato, isto significa que quanto maior for a quantidade de P libertada maior capacidade energética para a o armazenamento do substrato. No caso dos ensaios em *batch* provavelmente a energia adicional para a acumulação/consumo de substrato foi essencialmente a partir da degradação de polifosfato, sendo essa a razão pela qual se obtiveram maior taxas de libertação de P por consumo de substrato. Contudo, como foi utilizado uma maior concentração de carbono nos ensaios em *batch*, ou seja, existia mais carbono que elas consomem preferencialmente disponível, o que pode também ter contribuído para uma maior libertação de P para armazenar C.

Nos ensaios reportados com as diferentes culturas na Tabela 5.2, foram observadas diferentes taxas em relação aos ensaios em *batch*, na fase anaeróbia (Tabela 5.3). Kristiansen *et al.*, (2013) observaram que o metabolismo de polifosfato das *Tetrasphaera* apresenta semelhanças ao das *Accumulibacter*. Por outro lado, o ensaio em SBR (Reator J) e os ensaios em *batch* não demonstraram taxas semelhantes às observadas com *Accumulibacter* (Tabela 5.2). Ou seja, as *Tetrasphaera* não apresentam uma necessidade de energia adicional semelhante à das *Accumulibacter* para o consumo de substrato na fase anaeróbia.

Em relação à fase aeróbia nos dois ensaios, a variação do consumo de carbono foi insignificante. A concentração de glicogénio ao longo desta fase aumentou em ambos os ensaios, embora ocorresse maior aumento no ensaio em *batch* com o Mix. No ensaio com o Mix aumentou 1,05 C mM (Fig. 5.6), enquanto no ensaio com hidrolisado de caseína aumentou 0,85 C mM (Fig. 5.7). Esta diferença pode estar relacionada com a concentração de carbono consumido na fase anaeróbia. No ensaio com a mistura de aminoácidos observou-se consumo de 11,9 mM e no ensaio com o hidrolisado de caseína observou-se consumo de 10,5 mM. Por outro lado, a produção de glicogénio (Tabela 5.3), nos dois casos foi semelhante, ensaio com o Mix (2,0 C mM) e ensaio com o hidrolisado de caseína (2,11 C mM). Assim como a acumulação de P foi similar no ensaio com a mistura de aminoácidos e com hidrolisado de caseína, 0,9 e 0,87 mM, respetivamente. Os valores observados de acumulação de P nos ensaios em *batch* foram inferiores aos ensaios reportados com *Accumulibacter* (acetato: 2,50 mM e propionato: 2,20 mM) (Tabela 5.2). Embora, ligeiramente superior ao observado no ensaio em SBR ($0,74 \pm 0,16$ mM). Em relação ao conteúdo de P na biomassa, os valores obtidos nos ensaios em *batch* foram idênticos observou-se e 10,9% de P em TSS no ensaio com a mistura de aminoácidos e 10,2% de P em TSS, no ensaio com hidrolisado de caseína. Estes valores de conteúdo de P na biomassa encontram-se entre a os valores reportados para as *Tetrasphaera* (8-19% de em TSS) e para as *Accumulibacter* (7-17% de em TSS).

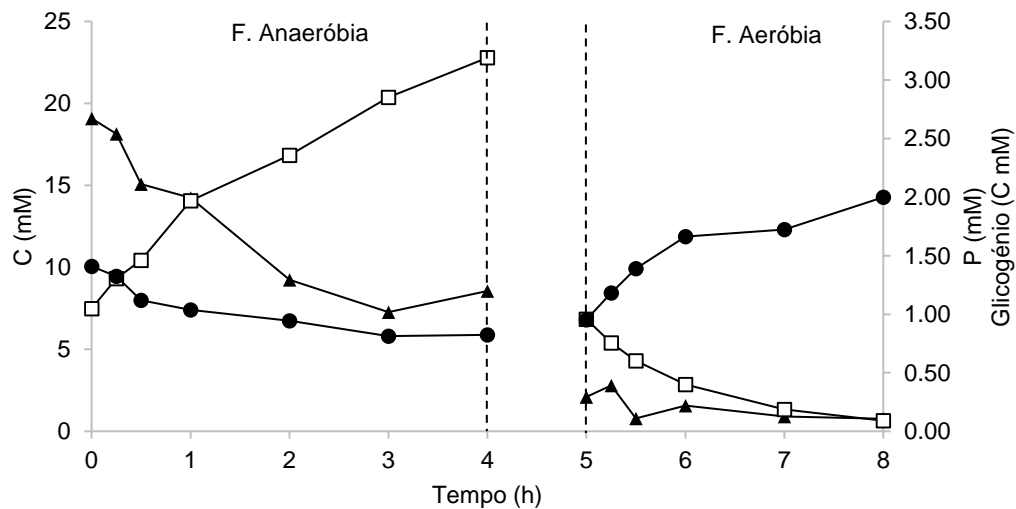


Figura 5.6: Variação de glicogénio (●), de carbono (▲), e de P no sobrenadante (□) ao longo do ciclo, no ensaio em *batch* Mix (mistura 22 aminoácidos).

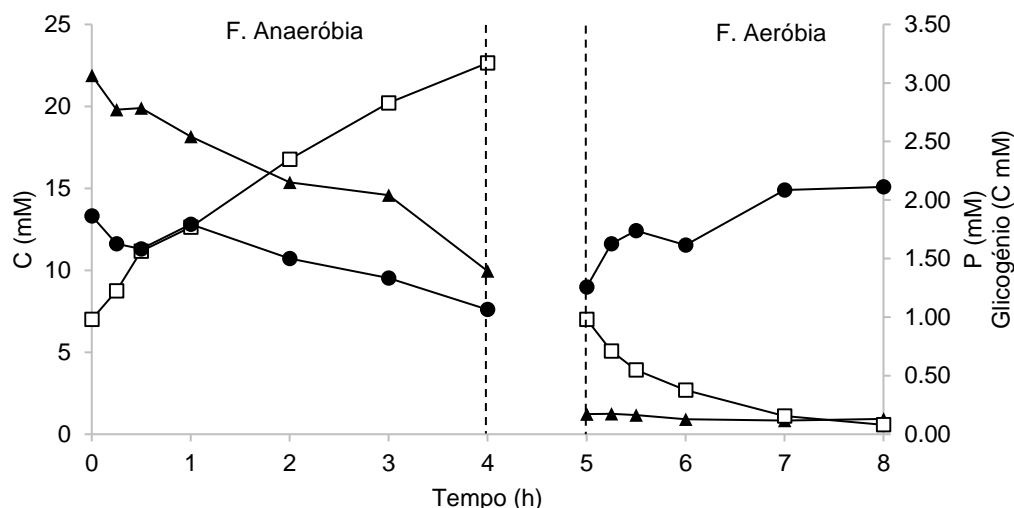


Figura 5.7: Variação de glicogênio (●), de carbono (▲), e de P no sobrenadante (□) ao longo do ciclo, no ensaio em *batch* com hidrolisado de caseína.

Tabela 5.3: Comparação dos dados obtidos nos ensaios em *batch* (*Tetrasphaera* + *Accumulibacter*), com diferentes fontes de carbono testadas.

Ensaio em <i>batch</i>	<i>Tetrasphaera</i> + <i>Accumulibacter</i>		
	Mix (22 aminoácidos)	Hidrolisado de Caseína	Águas residuais
Fase Anaeróbia			
Libertação de P/ subs. (P-mmol/C-mmol)	0,18	0,20	0,34
Glicogênio/ subs. (C-mmol/C-mmol)	0,07	0,06	0,04
Fase Aeróbia			
Acumulação de P (P mM)	0,90	0,87	1,54
P (%) em TSS	10,9	10,2	16,1
Produção de glicogênio (C mM)	2,11	2,0	1,45

De estudos anteriores, a fonte de carbono diferencialmente assimilada pelas *Tetrasphaera*-PAOs e não pela *Accumulibacter*, para crescimento celular é uma mistura de aminoácidos (hidrolisado de caseína). No entanto, em ensaios reportados por Kristiansen *et al.*, (2013) e por Ngunyen *et al.*, (2012), as diferentes *clades* têm capacidade de consumir outros substratos, na fase anaeróbia, como glucose, acetato ou propionato, acumulando P_i na fase aeróbia. Deste modo, realizou-se um ensaio em *batch* em que a fonte de carbono foi águas residuais retiradas no final do decantador primário (recolhidas da ETAR de Setúbal), pretendia-se observar a capacidade de remoção de carbono e P.

Durante a fase anaeróbia (Fig. 5.8), ocorreu consumo de 12,19 mM de carbono (50,6% de carbono removido). Entre o carbono consumido, observou-se consumo de acetato (1,1 mM; 53,2% removido) e de propionato (0,3 mM; 100% removido). Segundo Ngunyen *et al.*, (2015), as águas residuais maioritariamente são constituídas por proteínas (entre 25-35% da matéria orgânica) e aminoácidos, que podem ser usados como substratos para o crescimento celular pelas *Tetrasphaera*. Provavelmente, o acetato e propionato foram consumidos pelas *Accumulibacter*, já que estas bactérias consomem preferencialmente VFAs. (Nguyen *et al.*, 2015; Marques *et al.*, 2017). A quantidade de P libertada (2,64 mM) foi ligeiramente superior em comparação aos ensaios em *batch*, com o Mix (2,14 mM de P) e com o hidrolisado de caseína (2,19 mM de P). Ocorreu diminuição da concentração de glicogénio, na fase anaeróbia (diminuiu 0,33 C mM), o mesmo aconteceu nos ensaios em *batch* referidos anteriormente. No entanto, a partir da Tabela 5.3, a taxa de libertação de P por consumo de substrato foi 0,34 P-mmol/C-mmol superior aos outros ensaios em *batch*, em relação à taxa de consumo de glicogénio por consumo de substrato foi 0,04 C-mmol/C-mmol, ligeiramente inferior, não sendo muito diferentes dos ensaios em *batch* realizados. Comparando as taxas observadas, com as reportadas (Tabela 5.2), a taxa de libertação de P por consumo de substrato é semelhante aos ensaios com *Accumulibacter* (acetato: 0,48 P-mmol/C-mmol e propionato: 0,40 P-mmol/C-mmol) e *Tetrasphaera* (0,35 ± 0,08 P-mmol/C-mmol). Como as águas residuais são constituídas por diversas fontes de carbono, ente as quais proteínas, VFAs e aminoácidos (Nielsen *et al.*, 2010; Nguyen *et al.*, 2015). A cultura apresentou uma maior necessidade energética adicional para a assimilação dos diferentes substratos. A taxa de libertação de P por consumo de substrato foi resultada do consumo de substratos pelas *Tetrasphaera* e pelas *Accumulibacter*. Como havia também mais carbono para as *Accumulibacter* (acetato e propionato), puderam-no ter obtido de forma direta e não da fermentação das *Tetrasphaera*. No entanto, a taxa de consumo de glicogénio por consumo de substrato foi inferior aos ensaios referidos anteriormente, embora semelhante ao ensaio realizado em SBR (0,08 ± 0,04 C-mmol/C-mmol) e aos ensaios realizados em *batch*.

Na fase aeróbia, a concentração de carbono permaneceu constante, não existindo consumo ao longo desta fase. Ocorreu aumento do conteúdo de glicogénio (aumentou 0,84 C mM), semelhante aos outros ensaios em *batch*. No entanto, em comparação ao outros ensaios (Tabela 5.3), observou-se menor produção de glicogénio (1,45 C mM). Em relação à acumulação de P (1,54 mM) foi superior aos ensaios em *batch* com o Mix (0,90 mM) e com o hidrolisado de caseína (0,87 mM), observou-se um conteúdo de P na biomassa (16,1% de P em TSS) superior aos ensaios em *batch* realizados anteriormente (Mix: 10,9% de P em TSS e hidrolisado de caseína: 10,2% de P em TSS). O valor observado encontra-se dentro da gama de valores reportados na literatura (Tabela 5.2). Observou-se maior acumulação de P no ensaio em *batch* com as águas residuais, provavelmente devido às *Tetrasphaera* e às *Accumulibacter*. Como durante a fase anaeróbia ocorreu consumo de acetato e propionato por parte das *Accumulibacter*, na fase aeróbia, provavelmente houve acumulação de P por parte destas células.

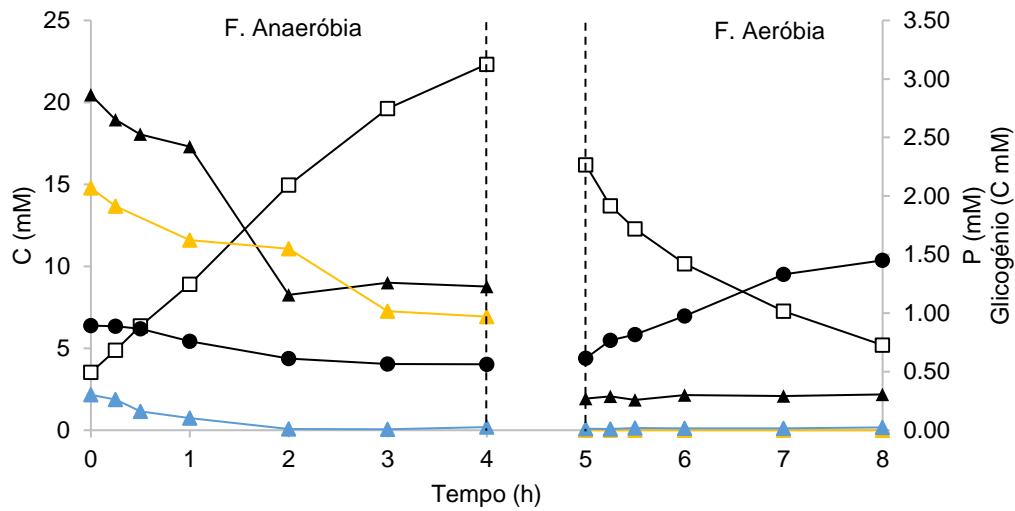


Figura 5.8: Variação de glicogênio (●), de carbono (▲), de acetato (▲), de propionato (▲) e de P no sobrenadante (□) ao longo do ciclo, no ensaio em *batch* com águas residuais.

5.3. Conclusões

O reator J encontrava-se enriquecido por *Tetrasphaera*-PAOs, a partir da utilização do hidrolisado de caseína como fonte de carbono. A comunidade microbiológica era constituída por aproximadamente 80% de *Tetrasphaera* e 20% e < 1% de PAOs e GAOs, respetivamente. Entre as diferentes *clades* de *Tetrasphaera*, o SBR era constituído maioritariamente por Tet 1-266, Tet 2-892 e Tet 3-654, não sendo notável uma diferença significativa entre elas. Em relação à remoção de C, durante a fase anaeróbia, no 74º dia de operação removia aproximadamente 80% do carbono alimentado. Enquanto operado aerobicamente, apresentou uma remoção de P de $0,74 \pm 0,16$ mM, ligeiramente inferior ao reportado em outros ensaios com um enriquecimento distinto de *Tetrasphaera* e *Accumulibacter*.

A realização de ensaios em *batch*, a partir da utilização das lamas do SBR (Reator J), permitiu avaliar o comportamento da cultura submetida a diferentes fontes de carbono e deste modo comparar os perfis dos diferentes componentes ao longo dos ensaios. No ensaio realizado com uma mistura de 22 aminoácidos observou-se que as *Tetrasphaera* têm preferência por determinados aminoácidos entre os quais: prolina (100%), lisina (97,8%), glicina (97,8%), tirosina (89,1%), arginina (81,3%) e cisteína (80,1%). No geral, a cultura apresentou um comportamento semelhante ao ensaio realizado com hidrolisado de caseína, como fonte de carbono. Posto isto, a realização de ensaios em *batch*, utilizando como fonte de carbono os aminoácidos individualmente, permitiria avaliar com maior pormenor o impacto que cada aminoácido teria na remoção de carbono e fósforo. A utilização dos aminoácidos que as *Tetrasphaera* apresentaram maior preferência, individualmente, provavelmente poderia levar à um melhor desempenho de remoção de P.

A partir da análise dos dados obtidos nos ensaios em *batch* com a mistura de 22 aminoácidos e com o hidrolisado de caseína não se observou grande diferença entre os ensaios realizados. No entanto, em comparação aos ensaios reportados com *Accumulibacter* e outro enriquecimento de *Tetrasphaera*, tenha sido notável uma maior diferença nas taxas de consumo de glicogénio e libertação de P por consumo de substrato, na fase anaeróbia. Provavelmente a cultura requeria menor energia para o consumo de substrato e deste modo observou-se taxas baixas. Por outro lado, na fase aeróbia os valores de conteúdo de P na biomassa (Mix: 10,9% de P em TSS e hidrolisado de caseína: 10,2% de P em TSS), encontravam-se entre a gama de valores reportados (Tabela 5.2).

O ensaio em *batch* utilizando águas residuais como fonte de carbono, serviu para avaliar a capacidade remoção de carbono e fósforo por parte desta cultura. O conteúdo de carbono removido foi semelhante aos ensaios referidos anteriormente, no entanto havia acetato e propionato que foram provavelmente consumidos pelas *Accumulibacter*. A taxa de libertação de P por consumo de substrato foi semelhante ao ensaio reportado com as *Accumulibacter*. Provavelmente, como as águas residuais são constituídas por diversas fontes de carbono, entre as quais proteínas, VFAs e aminoácidos (Nielsen *et al.*, 2010; Nguyen *et al.*, 2015). A cultura apresentou uma maior necessidade energética adicional para a assimilação dos diferentes substratos por parte das *Tetrasphaera* e das *Accumulibacter*. Desta forma, essa necessidade

energética resultou numa maior degradação de polifosfato e numa maior quantidade de P_i libertado para o meio.

Na fase aeróbia, provavelmente houve acumulação de P por parte destas células e por parte das *Tetrasphaera*, provavelmente por essa razão observou-se maior conteúdo de P na biomassa (16,1% de P em TSS). Segundo Marques *et al.*, (2017) a utilização de tanques anaeróbios para fermentar as águas residuais, que maioritariamente são constituídas por proteínas (entre 25-35% da matéria orgânica), para obtenção de aminoácidos e glucose, poderia ser uma estratégia económica/sustentável para suplementar ETARs com baixas concentrações de VFAs (Nielsen *et al.*, 2010). Com a realização destes ensaios foi possível observar que a utilização das *Tetrasphaera* demonstrou uma boa performance na remoção de carbono e fósforo, apoiando assim o sugerido anteriormente.

De modo, a clarificar as vias metabólicas existentes nas *Tetrasphaera* seria interessante testar como fonte de carbono os aminoácidos individualmente. Estes dados permitiram avaliar a performance de remoção de C e P. Assim como, a possível relação sinérgica entre as diferentes *clades* de *Tetrasphaera*.

Capítulo 6

6. Conclusões e Perspectivas Futuras

Em suma, a avaliação da relação fisiológica que possa existir entre os grânulos de PHA e de polifosfato na *C. necator* em modo de operação SBR (com ciclos de anaerobiose/microaerofilia e aerobiose) não foi viável. A utilização deste modo de operação com esta cultura condicionou o crescimento celular, assim como a acumulação de PHA. Deste modo, foi difícil a avaliação da acumulação de P, a partir da análise dos dados de P presente no sobrenadante nos diferentes ensaios embora a utilização de microaerofilia possibilitasse uma ligeira melhoria de crescimento celular.

Por outro lado, a utilização do modo *fed-batch* em aerobiose (pO_2 superior a 30%) proporcionou as condições ideais para acompanhar a variação do conteúdo de PHA e P na biomassa. Os resultados obtidos com imposição de pulsos de fonte de C e N no reator, sugeriu que a *C. necator* apresenta uma relação fisiológica ou metabólica entre C e P. A presença/ausência de N no meio tem influência na variação do conteúdo de P na biomassa, podendo estar envolvida nessa relação.

Em relação aos ensaios realizados com as diferentes estirpes, mostraram que provavelmente existe uma relação entre a acumulação de PHA e o conteúdo de P nas diferentes bactérias produtoras de PHA. No entanto, de alguma forma o aumento do conteúdo de P na biomassa está relacionado com a limitação de N. Nos diferentes ensaios, as diferentes culturas apresentaram um comportamento semelhante quando se encontravam em limitação de N no meio de cultivo, observou-se uma tendência de aumento de conteúdo de P na biomassa. No entanto, a *P. putida* (variação entre 0,9 e 2,3% de conteúdo de P na biomassa) e a *C. necator* (variação entre 0,5 e 3,4% de conteúdo de P na biomassa) apresentaram um maior conteúdo de P na biomassa em relação à *P. chlororaphis* (variação entre 0,8 e 1,3% de conteúdo de P na biomassa).

Deste modo, com base neste estudo podem-se propor novos ensaios para proporcionar uma melhor compreensão dessa relação fisiológica/metabólica entre C e P, envolvendo a limitação de N. A realização de ensaios futuros que envolvesse essa limitação de N com diferentes meios de cultivo, poderia condicionar o aumento/diminuição do conteúdo de P na biomassa. Assim como, seria interessante a confirmação do comportamento das diferentes culturas a partir de TEM permitindo assim observar os grânulos de PHA e de polifosfato.

No caso das *Tetrasphaera*-PAOs, foi utilizada uma cultura enriquecida por estes organismos em SBR à escala laboratorial, a partir da utilização de hidrolisado de caseína como fonte de carbono. A realização de ensaios em *batch*, a partir da utilização das lamas do SBR, permitiu avaliar o comportamento da cultura submetida a diferentes fontes de carbono e deste modo comparar os perfis dos diferentes componentes ao longo dos ensaios. No geral, a cultura apresentou um comportamento semelhante entre os ensaios realizados com hidrolisado de caseína, com a mistura de 22 aminoácidos e com as águas residuais, como fonte de carbono. No ensaio realizado com uma mistura de 22 aminoácidos observou-se que as *Tetrasphaera* têm preferência pelos seguintes aminoácidos: prolina, lisina, glicina, tirosina, arginina e cisteína. O ensaio com as águas residuais permitiu observar que a utilização das *Tetrasphaera* nos sistemas

de EBPR seria vantajoso para o processo, já que mostrou grande capacidade de remoção de C e P. De modo, a clarificar o metabolismo desta cultura, a realização de ensaios futuros com cada um dos diferentes aminoácidos individualmente permitiria avaliar a sua capacidade de remoção de C e P, assim, como ajudar na otimização do processo de EBPR. A utilização dos aminoácidos que as *Tetrasphaera* apresentaram maior preferência, individualmente, provavelmente poderia levar a um melhor desempenho de remoção de P.

Bibliografia

Acevedo, B., Oehmen, A., Carvalho, G., Seco, A., Borrás, L. e Barat, R. 'Metabolic Shift of Polyphosphate-Accumulating Organisms with Different Levels of Polyphosphate Storage', *Water Research*, 46 (2012), 1889–1900. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.01.003>

Achbergerová, L. e Nahálka, J. 'Polyphosphate - an Ancient Energy Source and Active Metabolic Regulator', *Microbial Cell Factories*, 10 (2011), 63. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-63>.

Albertsen, M., Hansen, L., Saunders, A., Nielsen, P., e Nielsen, K. 'A Metagenome of a Full-Scale Microbial Community Carrying out Enhanced Biological Phosphorus Removal', *The ISME Journal*, 6 (2012), 1094–1106. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.176>.

Amann, R. *In Situ* Identification of Micro-Organisms by Whole Cell Hybridization with rRNA-Targeted Nucleic Acid Probes, *Molecular Microbial Ecology Manual*, 1995. https://doi.org/10.1007/978-94-011-0351-0_23.

Amann, R., Olson, R. e Chisholm, S. 'Oligonucleotide Probes with Flow Cytometry for Analyzing Mixed Microbial Populations. Combination of 16S rRNA-Targeted Oligonucleotide Probes with Flow Cytometry for Analyzing Mixed Microbial Populations', *Applied and Environmental Microbiology*, 56 (1990), 1919–25

Aramvash, A., Akbari Shahabi, Z., Aghjeh, S., e Ghafari, M. 'Statistical Physical and Nutrient Optimization of Bioplastic Polyhydroxybutyrate Production by *Cupriavidus necator*', *International Journal of Environmental Science and Technology*, 12 (2015), 2307–16. <https://doi.org/10.1007/s13762-015-0768-3>.

Aramvash, A., Hajizadeh-Turchi, S., Moazzeni-zavareh, F., Gholami-Banadkuki, N., Malek-sabet, N., e Akbari-Shahabi, Z. 'Effective Enhancement of Hydroxyvalerate Content of PHBV in *Cupriavidus necator* and Its Characterization', *International Journal of Biological Macromolecules*, 87 (2016), 397–404. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.03.002>.

Beeby, M., Cho, M., Stubbe, J., e Jensen, G. 'Growth and Localization of Polyhydroxybutyrate Granules in *Ralstonia eutropha*', *Journal of Bacteriology*, 194 (2012), 1092–99. <https://doi.org/10.1128/JB.06125-11>.

Burow, L., Mabbett, A., McEwan, Bond, P. e Blackall, L. 'Bioenergetic Models for Acetate and Phosphate Transport in Bacteria Important in Enhanced Biological Phosphorus Removal', *Environmental Microbiology*, 10 (2008), 87–98. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01432.x>.

Cavalheiro, M., da Fonseca, M. e de Carvalho, C. 'Adaptation of *Cupriavidus necator* to Conditions Favoring Polyhydroxyalkanoate Production', *Journal of Biotechnology*, 164 (2012), 309–17. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.01.009>.

Casellas, M., Dagot, C. e Baudu, M. 'Set up and Assessment of a Control Strategy in a SBR in Order to Enhance Nitrogen and Phosphorus Removal', *Process Biochemistry*, 41 (2006), 1994–2001. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.04.012>.

- Chakraborty, P., Muthukumarappan, K. e Gibbons, W. 'PHA Productivity and Yield of *Ralstonia eutropha* When Intermittently or Continuously Fed a Mixture of Short Chain Fatty Acids', *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012 (2012). <https://doi.org/10.1155/2012/506153>.
- Chen, S., Colón, B., Dusel, B., Ziesack, M., C. Way, J. e P. Torella, J. 'Production of Fatty Acids in *Ralstonia eutropha* H16 by Engineering β -Oxidation and Carbon Storage', *PeerJ*, 3 (2015), e1468. <https://doi.org/10.7717/peerj.1468>.
- Choi, J., Shin, H. e Lee Y. 'Modulation of 3-Hydroxyvalerate Molar Fraction in poly(3-Hydroxybutyrate-3-Hydroxyvalerate) Using *Ralstonia eutropha* Transformant Co-Amplifying *phbC* and NADPH Generation-Related *Zwf* Genes', *Enzyme and Microbial Technology*, 32 (2003), 178–85. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(02\)00274-0](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00274-0).
- Ciesielski, S., Mozejko, J. e Pisutpaisal, N. 'Plant Oils as Promising Substrates for Polyhydroxyalkanoates Production', *Journal of Cleaner Production*, 106 (2015), 408–21. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2014.09.040>.
- Crocetti, G., Hugenholtz, P., Bond, P., Schuler, A., Keller, J. e Jenkins, D. 'Identification of Polyphosphate-Accumulating Organisms and Design of 16SrRNA-Directed Probes for Their Detection and Quantitation', *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (2000), 1175–82. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.3.1175-1182.2000>.
- Dai, Y., Lambert, L., Yuan, Z. e Keller, J. 'Microstructure of Copolymers of Polyhydroxyalkanoates Produced by Glycogen Accumulating Organisms with Acetate as the Sole Carbon Source', *Process Biochemistry*, 43 (2008), 968–77. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.04.023>.
- Daims, H., Brühl, A., Amann, R., Schleifer, K. e Wagner, M. 'The Domain-Specific Probe EUB338 Is Insufficient for the Detection of All Bacteria: Development and Evaluation of a More Comprehensive Probe Set', *Systematic and Applied Microbiology*, 22 (1999), 434–44. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(99\)80053-8](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(99)80053-8).
- Davis, R., Kataria, R., Cerrone, F., Woods, T., Kenny, S. e O'Donovan A. 'Conversion of Grass Biomass into Fermentable Sugars and Its Utilization for Medium Chain Length Polyhydroxyalkanoate (Mcl-PHA) Production by *Pseudomonas* Strains', *Bioresource Technology*, 150 (2013), 202–9. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.10.001>.
- Eschenhagen, M., Schuppler, M. e Röske, I. 'Molecular Characterization of the Microbial Community Structure in Two Activated Sludge Systems for the Advanced Treatment of Domestic Effluents', *Water Research*, 37 (2003), 3224–32. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(03\)00136-2](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(03)00136-2).
- Fukui, T., Chou, K., Harada, K., Orita, I., Nakayama, Y. e Bamba, T. 'Metabolite Profiles of Polyhydroxyalkanoate-Producing *Ralstonia eutropha* H16', *Metabolomics*, 10 (2014), 190–202. <https://doi.org/10.1007/s11306-013-0567-0>.

Glibert, P., 'Eutrophication, Harmful Algae and Biodiversity - Challenging Paradigms in a World of Complex Nutrient Changes', *Marine Pollution Bulletin*, 2016, 0–1. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.04.027>.

Griffiths, P., Stratton, H. e Seviour, R. 'Environmental Factors Contributing to the "G Bacteria" Population in Full-Scale EBPR Plants.', *Water Science and Technology*, 46 (2002)

Grousseau, E., Blanchet, E., Albuquerque, M., Paul, E. e Uribelarrea, J. 'Impact of Sustaining a Controlled Residual Growth on Polyhydroxybutyrate Yield and Production Kinetics in *Cupriavidus necator*', *Bioresource Technology*, 148 (2013), 30–38. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.08.120>.

Gumel e Mohammed, A. 'Growth Kinetics, Effect of Carbon Substrate in Biosynthesis of Mcl-PHA by *Pseudomonas putida*, 438 (2016), 427–38. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822014000200009>.

He, S. e McMahon, K. 'Minireview Microbiology of "*Candidatus Accumulibacter*" in Activated Sludge', 4 (2011), 603–19. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2011.00248>.

He, W., Tian, W., Zhang, G. e Chen, G. 'Production of Novel Polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas stutzeri* 1317 from Glucose and Soybean Oil', 169 (1998), 45–49

Hilliou, L., Freitas, F., Oliveira, R., Reis, M., Lespineux, D. e Grandfils, C. 'Solution Properties of an Exopolysaccharide from a *Pseudomonas* Strain Obtained Using Glycerol as Sole Carbon Source', *Carbohydrate Polymers*, 78 (2009), 526–32. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.05.011>.

Hui, Y., Seak, A., Chua, M. e Fukushima, T. 'ScienceDirect High-Temperature EBPR Process : The Performance , Analysis of PAOs and GAOs and the Fine-Scale Population Study of *Candidatus "Accumulibacter phosphatis "*', *Water Research*, 64 (2014), 102–12. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.06.038>.

Islam, S., Wever, H. e Volcke, E. 'A Robust Fed-Batch Feeding Strategy Independent of the Carbon Source for Optimal Polyhydroxybutyrate Production', *Process Biochemistry*, 49 (2014), 365–73. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.12.004>.

Jiang, X., Sun, Z., Ramsay, J. e Ramsay, B. 'Fed-Batch Production of MCL-PHA with Elevated 3-Hydroxynonanoate Content.', *AMB Express*, 3 (2013), 50. <https://doi.org/10.1186/2191-0855-3-50>.

Kargi, F., Uygur, A. e Başkaya, H. 'Phosphate Uptake and Release Rates with Different Carbon Sources in Biological Nutrient Removal Using a SBR', *Journal of Environmental Management*, 76 (2005), 71–75. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2005.01.010>.

Karunanithi, R., Szogi, A., Bolan, N., Naidu, R., Loganathan, P. e Hunt, P. Phosphorus Recovery and Reuse from Waste Streams, *Advances in Agronomy* (Elsevier Ltd, 2015). <https://doi.org/10.1016/bs.agron.2014.12.005>.

- Kellerhals, Michele., Hazenberg, W. e Witholt, B. 'High Cell Density Fermentations of *Pseudomonas oleovorans* for the Production of Mcl-PHAs in Two-Liquid Phase Media', 229 (1999), 111–16
- Kenny, S., Runic, J., Kaminsky, W., Woods, T., Babu, R. e O'Connor, K. 'Development of a Bioprocess to Convert PET Derived Terephthalic Acid and Biodiesel Derived Glycerol to Medium Chain Length Polyhydroxyalkanoate', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 95 (2012), 623–33. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4058-4>.
- Khalil, A., Eljamal, O., Amen, T., Sugihara, Y. e Matsunaga, N. 'Optimized Nano-Scale Zero-Valent Iron Supported on Treated Activated Carbon for Enhanced Nitrate and Phosphate Removal from Water', *Chemical Engineering Journal*, 309 (2017), 349–65. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.10.080>.
- Khanna, S. e Srivastava, A. 'Statistical Media Optimization Studies for Growth and PHB Production by *Ralstonia eutropha*', *Process Biochemistry*, 40 (2005), 2173–82. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.08.011>.
- Kong, Y., Nielsen, J. e Nielsen, P. 'Identity and Ecophysiology of Uncultured Actinobacterial Polyphosphate-Accumulating Organisms in Full-Scale Enhanced Biological Phosphorus Removal Plants', *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (2005), 4076–85. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.7.4076-4085.2005>.
- Kristiansen, R., Nguyen, H., Saunders, A., Nielsen, J., Wimmer, R. e Le, V. 'A Metabolic Model for Members of the Genus *Tetrasphaera* Involved in Enhanced Biological Phosphorus Removal', *The ISME Journal*, 7 (2013), 543–54. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.136>.
- Lalucat, J., Bennasar, A., Bosch, R. e Garci, E. 'Biology of *Pseudomonas stutzeri*', 70 (2006), 510–47. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00047-05>.
- Lanham, A., Oehmen, A., Saunders, A., Carvalho, G. e Reis, M. 'Metabolic Modelling of Full-Scale Enhanced Biological Phosphorus Removal Sludge', *Water Research*, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.08.036>.
- Lenz, Cromwick T. 'The Microbial Production of Poly (Hydroxyalkanoates) from Tallow', *Appl Microbiol Biotechnol* (1996), 46 (1996), 464–69. <https://doi.org/10.1007/s002530050845>.
- Lim, H. e Shin, H. 'Introduction to Fed-Batch Cultures'. http://assets.cambridge.org/97805215/13364/frontmatter/9780521513364_frontmatter.pdf.
- Lu, J., Brigham, C., Li, S. e Sinskey, A. 'Ralstonia Eutropha H16 as a Platform for the Production of Biofuels, Biodegradable Plastics, and Fine Chemicals from Diverse Carbon Resources', *Biotechnology for Biofuel Production and Optimization*, 2016, 325–51. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63475-7.00012-1>.

Marques, R., Santos, J., Nguyen, H., Carvalho, G., Noronha, J. e Nielsen, P. 'Metabolism and Ecological Niche of *Tetrasphaera* and *Ca. Accumulibacter* in Enhanced Biological Phosphorus Removal', *Water Research*, 122 (2017), 159–71. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.04.072>.

Martín, H., Ivanova, N., Kunin, V., Warnecke, F., Barry, K. e McHardy, A. 'Metagenomic Analysis of Two Enhanced Biological Phosphorus Removal (EBPR) Sludge Communities', *Nature Biotechnology*, 24 (2006), 1263–69. <https://doi.org/10.1038/nbt1247>.

McIlroy, S., Nittami, T., Seviour, E. e Seviour, R. 'Filamentous Members of Cluster III *Defluviicoccus* Have the *in Situ* Phenotype Expected of a Glycogen-Accumulating Organism in Activated Sludge', *FEMS Microbiology Ecology*, 74 (2010), 248–56. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00934>.

Meyer, R., Saunders, A. e Blackall, L. 'Putative Glycogen-Accumulating Organisms Belonging to the Alphaproteobacteria Identified through rRNA-Based Stable Isotope Probing', *Microbiology*, 152 (2006), 419–29. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28445-0>.

Mozumder, M., Garcia-Gonzalez, L., De Wever, H. e Volcke, E. 'Model-Based Process Analysis of Heterotrophic-Autotrophic poly(3-Hydroxybutyrate) (PHB) Production', *Biochemical Engineering Journal*, 114 (2016), 202–8. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.07.007>.

Muhr, A., Rechberger, E., Salerno, A., Reiterer, A., Malli, K. e Strohmeier, K. 'Novel Description of Mcl-PHA Biosynthesis by *Pseudomonas chlororaphis* from Animal-Derived Waste', *Journal of Biotechnology*, 165 (2013), 45–5. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.02.003>.

Muszyński, A., e Miłobędzka, A. 'The Effects of Carbon/phosphorus Ratio on Polyphosphate- and Glycogen-Accumulating Organisms in Aerobic Granular Sludge', *International Journal of Environmental Science and Technology*, 12 (2015), 3053–60. <https://doi.org/10.1007/s13762-015-0828-8>.

Nguyen, H., Kristiansen, R., Vestergaard, M. Wimmer, R. e Nielsen, P. 'Intracellular Accumulation of Glycine in Polyphosphate-Accumulating Organisms in Activated Sludge, a Novel Storage Mechanism under Dynamic Anaerobic-Aerobic Conditions', *Applied and Environmental Microbiology*, 81 (2015), 4809–18. <https://doi.org/10.1128/AEM.01012-15>.

Nguyen, H., Le, V., Hansen, A., Nielsen, J. e Nielsen, P. 'High Diversity and Abundance of Putative Polyphosphate-Accumulating *Tetrasphaera*-Related Bacteria in Activated Sludge Systems', *FEMS Microbiology Ecology*, 76 (2011), 256–67. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01049.x>.

Nielsen, P., Mielczarek, A., Kragelund, C., Nielsen, J., Saunders, A. e Kong, Y. 'A Conceptual Ecosystem Model of Microbial Communities in Enhanced Biological Phosphorus Removal Plants', *Water Research*, 44 (2010), 5070–88. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.07.036>.

Nikel, P., Chavarría, M., Martínez-García, E., Taylor, A. e Lorenzo, V. 'Accumulation of Inorganic Polyphosphate Enables Stress Endurance and Catalytic Vigour in *Pseudomonas putida* KT2440', *Microbial Cell Factories*, 12 (2013), 50. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-50>.

- Nittami, T., McIlroy, S., Seviour, E., Schroeder, S. e Seviour, R. 'Candidatus Monilibacter Spp., Common Bulking Filaments in Activated Sludge, Are Members of Cluster III *Defluviicoccus*', *Systematic and Applied Microbiology*, 32 (2009), 480–89. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2009.07.003>.
- Obruca, S., Petrik, S. e Benesova, 'Utilization of oil extracted from spent coffee grounds for sustainable production of polyhydroxyalkanoates', *Appl Microbiol Biotechnol* (2014) 98: 5883. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5653-3>.
- Oehmen, A., Zeng, R., Keller, J. e Yuan, Z. 'Modeling the Aerobic Metabolism of Polyphosphate-Accumulating Organisms Enriched with Propionate as a Carbon Source', *Water Environment Research*, 80 (2007), 267–75. <https://doi.org/10.2175/106143007X184717>.
- Oehmen, A., Lemos, P., Carvalho, G., Yuan, Z., Keller, J. e Blackall, L. 'Advances in Enhanced Biological Phosphorus Removal: From Micro to Macro Scale', *Water Research*, 41 (2007), 2271–2300. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.02.030>.
- Oehmen, A., Vives, M., Lu, H., Yuan, Z. e Keller, J. 'The Effect of pH on the Competition between Polyphosphate-Accumulating Organisms and Glycogen-Accumulating Organisms', *Water Research*, 39 (2005), 3727–37. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.06.031>.
- Oehmen, A., Yuan, Z., Blackall, L. e Keller, J. 'Comparison of Acetate and Propionate Uptake by Polyphosphate Accumulating Organisms and Glycogen Accumulating Organisms', *Biotechnology and Bioengineering*, 91 (2005), 162–68. <https://doi.org/10.1002/bit.20500>.
- Ostle, A. 'Fluorescent Stain for Poly-3- Hydroxybutyrate', *Notes*, 44 (1982), 238–41
- Poblete-Castro, I., Binger, D., Oehlert, R. e Rohde, M. 'Comparison of Mcl-Poly(3-Hydroxyalkanoates) Synthesis by Different *Pseudomonas putida* Strains from Crude Glycerol: Citrate Accumulates at High Titer under PHA-Producing Conditions', *BMC Biotechnology*, 14 (2014), 962. <https://doi.org/10.1186/s12896-014-0110-z>.
- Rao, L. e Kornberg A. 1998. Inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*: the phosphate regulon and the stringent response. *J Bacteriol* 180:2186 –2193.
- Ryu, H., Hahn, S., Chang, Y. e Chang, H. 'Production of poly(3-Hydroxybutyrate) by High Cell Density Fed-Batch Culture of *Alcaligenes eutrophus* with Phosphate Limitation.', *Biotechnology and Bioengineering*, 55 (1997), 28–32. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19970705\)55:1<28](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19970705)55:1<28).
- Shahid, S., Mosrati, R., Ledauphin, J., Amiel, C., Fontaine, P. e Gaillard, J. 'Impact of Carbon Source and Variable Nitrogen Conditions on Bacterial Biosynthesis of Polyhydroxyalkanoates: Evidence of an Atypical Metabolism in *Bacillus megaterium* DSM 509', *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 116 (2013), 302–8. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.02.017>.

Shang, L., Fan, D., Kim, M., Choi, J. e Chang, H. 'Modeling of poly(3-Hydroxybutyrate) Production by High Cell Density Fed-Batch Culture of *Ralstonia eutropha*', *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 12 (2007), 417–23. <https://doi.org/10.1007/BF02931065>.

Sharfstein, S. e Keasling, J. 'Polyphosphate Metabolism in *Escherichia coli*', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 745 (1994), 77–91. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7832534.

Smith, V. 'Eutrophication of Freshwater and Coastal Marine Ecosystems a Global Problem', *Environmental Science and Pollution Research*, 10 (2003), 126–39. <https://doi.org/10.1065/espr2002.12.142>.

Smolders, G., Meij, J., Van Loosdrech, M. e Heijnen, J. 'Model of the Anaerobic Metabolism of the Biological Phosphorus Removal Process: Stoichiometry and pH Influence', 43 (1993), 461–70

Steinbüchel, A. 'Production of Rubber-like Polymers by Microorganisms', *Current Opinion in Microbiology*, 6 (2003), 261–70. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(03\)00061-4](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(03)00061-4).

Stokholm-bjerregaard, M., Mcilroy, S., Nierychlo, M., Karst, S. e Smith, C. 'A Critical Assessment of the Microorganisms Proposed to Be Important to Enhanced Biological Phosphorus Removal in Full-Scale Wastewater Treatment Systems', 8 (2017), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00718>.

Sun, Y., Young, K., Sun, H., Young D., Chung, C. e Kim, H. 'Characterization of a Tacky Poly (3-Hydroxyalkanoate) Produced by *Pseudomonas chlororaphis* HS21 from Palm Kernel Oil', *Journal of Microbiology* (2003), 64–69.

Tavares, P., Zanetti, L., Silva, E. e Pradella, J. 'Production of poly(3-Hydroxybutyrate) in an Airlift Bioreactor by *Ralstonia eutropha*', *Biochemical Engineering Journal*, 18 (2004), 21–31. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(03\)00117-7](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(03)00117-7).

Tian, J., Sinskey, A. e Stubbe, J. 'Kinetic Studies of Polyhydroxybutyrate Granule Formation in *Wautersia eutropha* H16 by Transmission Electron Microscopy', 187 (2005), 3814–24. <https://doi.org/10.1128/JB.187.11.3814>.

Tobin, K., McGrath, J., Mullan, A., Quinn, J. e O'Connor, K. 'Polyphosphate Accumulation by *Pseudomonas putida* CA-3 and Other Medium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoate-Accumulating Bacteria under Aerobic Growth Conditions', *Applied and Environmental Microbiology*, 73 (2007), 1383–87. <https://doi.org/10.1128/AEM.02007-06>.

Tran, A., Zhang, Y., Lin, J., Mondal, P., Ye, W. e Meesschaert, B. 'Phosphate Pre-Concentration from Municipal Wastewater by Selectrodialysis: Effect of Competing Components', *Separation and Purification Technology*, 141 (2015), 38–47. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2014.11.017>.

- Tumlirsch, T., Sznajder, A. e Jendrossek, D. 'Formation of Polyphosphate by Polyphosphate Kinases and Its Relationship to PHB Accumulation in *Ralstonia eutropha* H16', *Applied and Environmental Microbiology*, 81 (2015), AEM.02279-15. <https://doi.org/10.1128/AEM.02279-15>.
- Wang, J., Fang, F. e Yu, H. 'Substrate Consumption and Biomass Growth of *Ralstonia eutropha* at Various S₀/X₀ Levels in Batch Cultures', *Bioresource Technology*, 98 (2007), 2599–2604. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.09.005>.
- Wang, J., Yue, Z., Sheng, G. e Yu, H. 'Kinetic Analysis on the Production of Polyhydroxyalkanoates from Volatile Fatty Acids by *Cupriavidus necator* with a Consideration of Substrate Inhibition, Cell Growth, Maintenance, and Product Formation', *Biochemical Engineering Journal*, 49 (2010), 422–28. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2010.02.005>.
- Wang, X., Song, T. e Yu, X. 'The Biomass Fraction of Phosphate-Accumulating Organisms Grown in Anoxic Environment in an Enhanced Biological Phosphorus Removal (EBPR) System', *Desalination and Water Treatment*, (2014), 1–11. <https://doi.org/10.1080/19443994.2014.961557>.
- Wilmes, P., Andersson, A., Lefsrud, M., Wexler, M., Shah, M., e Zhang, B. 'Community Proteogenomics Highlights Microbial Strain-Variant Protein Expression within Activated Sludge Performing Enhanced Biological Phosphorus Removal', *The ISME Journal*, 2 (2008), 853–64. <https://doi.org/10.1038/ismej.2008.38>.
- Wong, M., Tan, F., Ng, e Liu, W. 'Identification and Occurrence of Tetrad-Forming *Alphaproteobacteria* in Anaerobic-Aerobic Activated Sludge Processes', *Microbiology*, 150 (2004), 3741–48. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27291-0>.
- Wu, H., Sheu, D. e Lee, C. 'Rapid Differentiation between Short-Chain-Length and Medium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoate-Accumulating Bacteria with Spectrofluorometry', *Journal of Microbiological Methods*, 53 (2003), 131–35. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(02\)00232-4](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(02)00232-4).
- Ya-nan, L., Gang, X. e Shui-li, Y. 'Comparing Results of Cultured and Uncultured Biological Methods Used in Biological Phosphorus Removal', 19 (2007), 1373–79
- Ye, Y., Ngo, H., Guo, W., Liu, Y., Li, J. e Liu, Y. 'Insight into Chemical Phosphate Recovery from Municipal Wastewater', *Science of the Total Environment*, 576 (2017), 159–71. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.10.078>.
- Yousuf, R., e Winterburn, J., 'Date Seed Characterisation, Substrate Extraction and Process Modelling for the Production of Polyhydroxybutyrate by *Cupriavidus necator*', *Bioresource Technology*, 222 (2016), 242–51. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.09.107>.
- Zhang, Y., Liu, G., Weng, W., Ding, J. e Liu, S. 'Engineering of *Ralstonia eutropha* for the Production of poly(3-Hydroxybutyrate-Co-3-Hydroxyvalerate) from Glucose', *Journal of Biotechnology*, 195 (2015), 82–88. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.12.014>.

Zuthi, M., Guo, W., Ngo, H., Nghiem, L. e Hai, F. (2013). Enhanced biological phosphorus removal and its modeling for the activated sludge and membrane bioreactor processes. *Bioresource Technology*, 139 363-374.

