



**Joana Caldeira
Botelho**

**Análise de culturas mistas produtoras de PHAs
por microscopia**



Universidade de Aveiro Departamento de Ambiente e Ordenamento
Ano 2012

**JOANA CALDEIRA
BOTELHO**

**Análise de culturas mistas produtoras de PHAs por
microscopia**

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

O júri

Presidente

Prof. Doutor Luís Manuel Guerreiro Alves Arroja
Professor Associado do Departamento de Ambiente e Ordenamento da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Luísa Alexandra Seuanes Serafim Leal
Professora Auxiliar Convidada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Maria Isabel Capela Aparício Fernandes Capela
Professora Associada do Departamento de Ambiente e Ordenamento da Universidade de Aveiro
(Orientadora)

Agradecimentos

Desejo expressar o meu sincero agradecimento a todos os que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização desta tese de mestrado, ajudando-me a finalizar uma das etapas mais importantes do meu percurso académico.

Gostaria, assim, de agradecer:

Primeiramente, à professora Isabel Capela, orientadora desta dissertação, pelo apoio, disponibilidade e simpatia demonstrados ao longo da concretização deste trabalho.

Ao João, por todo o tempo despendido no laboratório a ensinar-me as bases de microscopia e por todas as ideias concedidas.

Ao Flávio e à Fátima, pela ajuda e apoio prestados na parte laboratorial, assim como pelos conhecimentos e ideias transmitidas.

À Tânia, pela ajuda e apoio preciosos prestados durante a elaboração desta tese.

Ao Pompílio, por toda a ajuda no laboratório e pela boa disposição e disponibilidade constantes.

Aos meus amigos e amigas, pelo apoio, presença e partilha dos bons e maus momentos, dentro e fora do laboratório.

Aos meus pais, irmãos e ao Rui, por estarem sempre presentes e me apoiarem incondicionalmente em todas as fases do meu percurso académico.

Palavras-chave

Polihidroxicanoatos (PHA); Biopolímero; Culturas mistas; Acumulação; Parâmetros morfológicos; Parâmetros físico-químicos; Microfauna; Alimentação Dinâmica Aeróbia (ADF); Acidificação; Análise de imagem

Resumo

Hoje em dia há uma necessidade crescente de encontrar uma solução viável, econômica e sustentável para a substituição dos plásticos convencionais, que utilizam recursos não renováveis como matéria-prima para a sua produção. Além disso, quando depositados no ambiente tornam-se resíduos devido à sua alta resistência à biodegradação.

O presente trabalho teve como objetivo principal o controle biológico, através de análise microscópica, de doze reatores, sendo nove anaeróbios para acidificação, um MBBR e oito reatores descontínuos; sendo os restantes três reatores aeróbios, SBR. Efetuou-se a monitorização das variações morfológicas dentro dos reatores e correlacionaram-se com os parâmetros físico-químicos. A produção de AOVs nos reatores de acidificação para utilização como substrato dos microrganismos acumuladores de PHAs e a seleção de uma população dos microrganismos com elevada capacidade de acumulação desses polímeros nos reatores aeróbios foram também controladas através de análises microbiológicas.

Ao longo do procedimento experimental dos reatores foram recolhidas amostras de lamas para a avaliação microbiológica qualitativa das mesmas ao microscópio e foram também determinados parâmetros físico-químicos e de operação dos reatores, assim como parâmetros biológicos.

Os resultados obtidos permitem concluir que não é possível estabelecer correlações gerais entre parâmetros físico-químicos e biológicos, mas é possível estabelecê-las para casos de operação específicos, tal como a relação positiva entre a quantidade de flocos de pequenas dimensões e a intensidade de fluorescência emitida pelos grânulos de PHA nos reatores SBR1 e SBR2.

Foi também possível obter um perfil de intensidades de fluorescência através da análise e tratamento de imagem em ImageJ. No entanto, não foi possível correlacionar o método de quantificação da fluorescência emitida pelos flocos corados com Azul do Nilo com as concentrações reais, pois não foi possível analisar quantitativamente o polímero acumulado no interior das células.

Keywords

Polyhydroxyalkanoates (PHA); Biopolymer; Mixed cultures; Storage; Morphological parameters; Physicochemical parameters; Microfauna; Aerobic Dynamic Feeding (ADF); Acidification; Image analysis

Abstract

Nowadays there is a growing need to find a viable, economic and sustainable solution for the replacement of conventional plastics, which use non-renewable resources as a raw material for their production. Additionally, when improperly disposed in the environment, they are considered waste because of their high resistance to biodegradation. Furthermore, when thrown away, they become waste because of their highly resistance to biodegradation.

The present study was aimed to biologically control, through microscopic analysis, twelve reactors, nine of them being anaerobic acidification reactors, one MBBR and eight batch reactors, and the remainders were aerobic reactors, SBRs. Monitoring was carried out for the morphological variations within the reactors and they were correlated with the physicochemical parameters. The VFA production in the acidification reactors to use as substrate for PHA accumulating microorganisms and the selection of a high PHA accumulating microorganism population in the aerobic reactors were also monitored through microscopic analysis.

Throughout the experimental procedure, sludge samples were taken for qualitative microbiologic evaluation under the microscope and physicochemical, operating and biological parameters were also determined

The results indicate that it is not possible to establish a general correlation between physicochemical and biological parameters, but correlation can be found for specific reactor conditions, such as the one found for SBR1 and SBR2, where the quantity of small aggregates appeared to have a positive correlation with the fluorescence intensity emitted by the PHA granules.

It was also possible to obtain a fluorescence intensity profile by image analysis and processing in ImageJ. However, it was not possible to correlate the method of emitted fluorescence intensity by the Nile Blue stained flocs with real concentration values, since it was not possible to determine the quantity of stored polymer inside the cells.

Índice

Índice de Tabelas	iv
Índice de Figuras.....	v
Lista de abreviaturas	ix
1 Introdução.....	1
1.1 Introdução Geral.....	1
1.2 Objetivos	3
2 Revisão da Literatura	5
2.1 Processos de tratamento de águas residuais	5
2.1.1 Processos aeróbios	7
2.1.2 Processos anaeróbios	15
2.2 Polímeros.....	20
2.2.1 Características e tipos de polímeros.....	20
2.2.2 Polihidroxialcanoatos (PHA).....	25
2.2.3 Substâncias poliméricas extracelulares (EPS)	28
2.3 Microscopia.....	30
2.4 Análise e processamento de imagem.....	32
3 Metodologia	37
3.1 Condições de operação dos reatores anaeróbios	37
3.1.1 Reator MBBR	37
3.1.2 Reatores Descontínuos.....	38

3.2	Condições de operação dos reatores aeróbios	39
3.2.1	Reatores SBR.....	39
3.3	Análises físico-químicas	41
3.4	Métodos clássicos de microscopia para a observação e identificação de microrganismos.....	43
3.4.1	Observação microscópica	43
3.4.2	Amostragem e observação direta da amostra.....	43
3.4.3	Observação de fluorescência metanogénica	45
3.4.4	Contagem e classificação da microfauna	45
3.4.5	Índice biótico de lamas (Sludge Biotic Index - SBI)	46
3.4.6	Coloração negativa para a determinação de EPS.....	48
3.4.7	Coloração para a visualização de PHA.....	50
3.5	Análise e processamento de imagem.....	52
3.5.1	Desenvolvimento de <i>macros</i> para a análise de agregados microbianos.....	53
3.5.2	Intensidade de fluorescência	55
3.6	Análise de correlação	58
3.6.1	Coefficiente de correlação linear de Pearson	58
4	Resultados e Discussão	61
4.1	Resultados dos reatores anaeróbios.....	61
4.1.1	MBBR.....	61
4.1.2	Reatores Descontínuos.....	70
4.2	Resultados dos reatores aeróbios.....	82
4.2.1	SBR1	82

4.2.2	SBR2.....	96
4.2.3	SBR3.....	108
5	Considerações gerais dos resultados obtidos.....	121
6	Conclusões e trabalho futuro.....	125
7	Referências bibliográficas.....	127

Índice de Tabelas

Tabela 1: Causas e efeitos dos problemas de separação de lamas ativadas.	8
Tabela 2: Situações particulares de estações de tratamento de águas residuais por lamas ativadas. Segundo Madoni (1994 ^b).	14
Tabela 3: Exemplos de tipos de polímeros naturais e sintéticos de acordo com a sua natureza.....	22
Tabela 4: Micronutrientes dentro do reator (mg/L)	39
Tabela 5: Meio mineral dentro do reator (mg/L)	40
Tabela 6: Tabela de duas entradas para o cálculo do SBI (S - nº de espécies de microfauna excetuando os pequenos flagelados; F - nº de pequenos flagelados contados na câmara de Fuchs-Rosenthal. Adaptado de Madoni (1996).	47
Tabela 7: Conversão do valor do SBI em classes indicadoras da capacidade depuradora das lamas. Adpatado de Madoni (2006).	48
Tabela 8: Atribuição de valores pixel às gamas de diâmetros dos flocos.	54
Tabela 9: Condições de operação dos reatores e respectivas percentagens de remoção de CQO.	72
Tabela 10: Número de indivíduos para cada grupo de microfauna ao longo do tempo.	90
Tabela 11: Tabela de resultados do SBI.....	91
Tabela 12: Quantificação do número de protozoários no reator ao longo do tempo	102
Tabela 13: Classificação das lamas no reator.	103
Tabela 14: Quantificação dos protozoários presentes no reator por grupos, nos diferentes dias de amostragem.....	116
Tabela 15: Determinação do SBI e classificação das lamas no reator.	117

Índice de Figuras

Figura 1: Processos biológicos de tratamento de águas residuais.....	6
Figura 2: Esquema do processo de lamas ativadas. Adaptado de Jenkins <i>et al.</i> (1993).	7
Figura 3: Principais fases do ciclo de operação de um SBR. Adaptado de Florida (2000).	11
Figura 4: Ciliados: a) sésseis; b) flagelados; c) nadadores; e d) móveis de fundo.....	13
Figura 5: Esquema dos processos de degradação anaeróbia efectuados por microrganismos. Adaptado de Bema <i>et al.</i> (2007).	16
Figura 6: Representação esquemática de tipos de estruturas ou formas de cadeias poliméricas.....	21
Figura 7: Esquema de opções de gestão de resíduos poliméricos. Adaptado de Gerald (2000).....	24
Figura 8: Imagem binarizada e isenta de ruído de fundo de um plano	34
Figura 9: Características de flocos em contraste de fase: a) compacto (100x), b) difuso (100x), c) firme (1000x), d) fraco (1000x). Adaptado de Jenkins <i>et al.</i> (1993).....	44
Figura 10: Método de contagem dos microrganismos presentes na amostra.	45
Figura 11: Determinação de EPS ao microscópio. Amostra do dia 16.....	49
Figura 12: Método de aquisição de imagens em cada lâmina.....	52
Figura 13: Imagens adquiridas da amostra do dia de operação 21 do reator SBR3. a) Microflocos; b) Mesofloco; c) Macrofloco.....	54
Figura 14: Processo de tratamento de imagem utilizado neste estudo.....	55
Figura 15: Imagem observada da fluorescência emitida por flocos corados com Azul de Nilo	56
Figura 16: Evolução da concentração e remoção de CQO ao longo do tempo.....	62
Figura 17: Variação da carga orgânica ao longo do tempo.....	62

Figura 18: Concentração total de AOVs e evolução do pH no reator ao longo do tempo. ...	63
Figura 19: Número de flocos por classe ao longo do estudo.	64
Figura 20: Percentagem de área dos flocos.....	65
Figura 21: Diferenças entre a morfologia dos flocos: a) no dia 10 de operação;.....	66
Figura 22: Solidez dos flocos.....	67
Figura 23: Circularidade dos flocos.....	67
Figura 24: pH e concentração de AOV ao longo do tempo.	70
Figura 25: pH e concentração de AOV ao longo do tempo.	71
Figura 26: pH e concentração de AOV ao longo do tempo.	71
Figura 27: pH e concentração de AOV ao longo do tempo.	71
Figura 28: Imagem adquirida de protozoários em movimento	72
Figura 29: Evolução do número de microflocos nos diferentes reatores ao longo do tempo de ensaio.	73
Figura 30: Evolução do número de mesoflocos nos diferentes reatores ao longo do tempo de ensaio.	74
Figura 31: Percentagem de área ocupada pelos microflocos em função da razão F/M.	75
Figura 32: Percentagem de área ocupada pelos mesoflocos em função da razão F/M.	75
Figura 33: Área média dos microflocos nos reatores.....	77
Figura 34: Área média dos mesoflocos nos reatores.....	77
Figura 35: Solidez e Circularidade dos microflocos.....	78
Figura 36: Solidez e Circularidade dos mesoflocos.....	78
Figura 37: Sólidos suspensos totais e sólidos suspensos voláteis ao longo do tempo no reator SBR 1.....	83
Figura 38: Variação da carga orgânica ao longo do tempo.....	84

Figura 39: Evolução temporal da concentração de CQO solúvel à entrada (sCQO in) e à saída (sCQO out) do reator.	84
Figura 40: Número de microflocos, mesoflocos e macroflocos por litro	85
Figura 41: Percentagem de área ocupada pelos diferentes tipos de flocos.	86
Figura 42: Diferença entre a morfologia dos flocos: a) no dia 10 de operação;	87
Figura 43: Solidez dos flocos.....	87
Figura 44: Circularidade dos flocos.....	88
Figura 46: Percentagem dos indivíduos das diferentes espécies observadas no reator ao longo do tempo.	89
Figura 45: Número total da microfauna contabilizada ao longo do tempo de operação do reator SBR 1.....	89
Figura 48: Diferença entre as fluorescências emitidas pelos flocos corados a Azul de Nilo:	92
Figura 47: Variação da intensidade de fluorescência emitida pelos grânulos de PHA corados com Azul de Nilo ao longo do tempo.....	92
Figura 49: Evolução da concentração de Sólidos Suspensos Totais e Voláteis durante o tempo de operação do reator.	96
Figura 50: Evolução da concentração da carga orgânica ao longo do tempo.	97
Figura 51: Concentração e percentagem de remoção de CQO ao longo do tempo.	97
Figura 52: Evolução da quantidade de flocos ao longo do estudo.....	98
Figura 53: Percentagem de área ocupada pelos flocos.....	99
Figura 54: Solidez dos flocos.....	100
Figura 55: Circularidade dos focos.	100
Figura 56: Evolução da microfauna total em indivíduos por litro ao longo do tempo.	101
Figura 57: Percentagem de indivíduos por espécie de protozoário no reator.	102

Figura 58: Intensidade de fluorescência emitida por flocos corados com Azul de Nilo ao longo do tempo.	104
Figura 59: Diferença entre a intensidade de fluorescência emitida pelos flocos:	104
Figura 60: Sólidos suspensos totais e sólidos suspensos voláteis ao longo do estudo.....	108
Figura 61: Variação da carga orgânica ao longo do tempo.....	109
Figura 62: Concentração de entrada e saída de CQO e percentagem	110
Figura 63: Número de flocos ao longo do estudo.	111
Figura 64: Percentagem de área ocupada pelos flocos.....	112
Figura 65: Flocos encontrados na amostra do dia 14 de	113
Figura 66: Solidez dos flocos.....	113
Figura 67: Circularidade dos flocos.....	114
Figura 68: Evolução da microfauna total em indivíduos por litro ao longo do tempo.	115
Figura 69: Percentagens de indivíduos por grupo de protozoários ao longo do tempo.	115
Figura 70: Protozoários no dia 24 de operação do reator SBR3. Ampliação a 100x-	116
Figura 71: Intensidade de fluorescência ao longo do tempo.....	118

Lista de abreviaturas

ADF – Alimentação Aeróbica Dinâmica

Alc – Alcalinidade

AOV – Ácidos Orgânicos Voláteis

BAF – Filtros Biológicos Ativos

BMP – *Windows Bitmap*

CBO – Carência Bioquímica de Oxigênio

CCD – *Charge-Coupled Device*

CID – *Charge-Injection Device*

CMD – *Charge Modulated Device*

CMOS – *Complementary Metal Oxide Silicon*

CQO – Carência Química de Oxigênio

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EPS – Substância Polimérica Extracelular

ETAR – Estação de Tratamento de Águas Residuais

F/M – razão *Food to Microorganisms*

FID – *Flame Ionization Detector*

GIF – *Graphics Interchange Format*

HB – Hidroxibutirato

JPEG – *Joint Photographers Expert Group*

LB-EPS – *Loosely Bound EPS*

MBBR – *Moving Bed Biofilm Reactor*

MBR – *Membrane Bio-Reactors*

MLE – *Modified Ludzack Ettinger Nutrient Removal Process*

N – Azoto

P – Fósforo

PHA – Polihidroxialcanoato

PHA_{SCL} – *Short-chain-length PHA*

PHA_{MCL} – *Medium-chain-length PHA*

PHB – Polioxibutirato

P(3HB-co-3HV) – Poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato)

PVC – Policloreto de vinil

RAS – Lamas de retorno

RNA – Ácido ribonucleico

RBC – *Rotating Biological Contractors*

ROI – *Região de interesse*

SBI – Índice Biótico de Lamas

SBR – *Sequencing Batch Reactor*

sCQO in – Concentração de CQO de entrada

sCQO out – Concentração de CQO de saída

SS – Sólidos Suspensos

SST – Sólidos Suspensos Totais

SSV – Sólidos Suspensos Voláteis

SVI – Índice de Volume de Lamas

TIFF – *Tagged Image File*

TRH – Tempo de Retenção Hidráulico

TRS – Tempo de Retenção de Sólidos

WAS – Lamas em excesso

1 Introdução

1.1 Introdução Geral

Ao longo dos anos, têm vindo a ser desenvolvidos estudos com o objetivo de implementar processos mais eficientes e ambientalmente sustentáveis para a síntese de novos produtos. Estes estudos atendem a preservar e utilizar racionalmente os escassos recursos não renováveis existentes, atendendo, desta forma, ao grande consumo energético exigido pela sempre crescente população.

Com o início da industrialização no século XVIII e o aumento da melhoria da qualidade de vida da população, surgiram novas necessidades a nível mundial. Uma delas relacionava-se com a distribuição de bens perecíveis sem que estes se deteriorassem. Dessa necessidade surgiu a produção dos plásticos: polímeros sintéticos biologicamente inertes e de propriedades mecânicas variáveis que passaram a ser usados como matéria-prima em diversos setores, como a indústria automóvel, o setor doméstico, o setor eletrónico, entre outros.

Contudo, precisamente devido às propriedades que se provavam ser úteis para determinados fins, estes polímeros começaram a tornar-se resíduos no seu fim de vida, quando largados no meio ambiente, já que são altamente resistentes à biodegradação. No entanto, é impossível, nos dias que correm, e com o aumento exponencial da população, que a sociedade deixe de utilizar os plásticos como principal componente na produção de inúmeros produtos nos diversos setores, pelo que a acumulação de polímeros sintéticos no ambiente é de facto um problema mundial.

Assim, na tentativa de solucionar este problema e substituir os plásticos convencionais, têm vindo a ser desenvolvidos diferentes tipos de plásticos biodegradáveis, quer por síntese química de polímeros, quer por alteração polimérica dos plásticos convencionais, ou por extração dos mesmos a partir de microrganismos. Os polihidroxialcanoatos (PHAs) possuem propriedades semelhantes ao polipropileno com três características únicas: capacidade de processamento termoplástico, 100% resistentes a água, e 100% biodegradáveis (Hrabak 1992).

Os PHAs são uma família de poliésteres ou copoliésteres sintetizados e acumulados por diversos microrganismos e podem ser produzidos por culturas mistas ou por culturas puras. Estes biopolímeros são acumulados como uma reserva de energia quando as células se encontram em

condições de crescimento desequilibrado na presença excessiva de carbono e da limitação por um nutriente, como azoto (N) ou fósforo (P).

A produção industrial de polímeros biodegradáveis a partir de culturas puras já é uma realidade, mas o seu custo elevado relativamente aos plásticos convencionais tornam a sua completa substituição improvável do ponto de vista comercial. Uma forma de reduzir o custo de produção traduz-se no aumento da eficácia de extração dos polímeros das células e na utilização de substrato mais barato. Também é possível recorrer ao uso de culturas mistas de forma a reduzir os custos de produção, já que se eliminam totalmente os custos de esterilização e os substratos são de custo reduzido ou nulo. A produção de PHA por este método envolve, geralmente, entre duas a três etapas: a fermentação da fonte de carbono em reatores acidogénicos para a produção de ácidos orgânicos voláteis (AOVs); a seleção de culturas com elevada capacidade de acumulação de PHAs; e a otimização da produção de PHAs com as culturas anteriores alimentadas com os AOVs produzidos.

Este estudo assenta no controlo biológico através de análise microscópica de cinco ensaios diferentes, sendo dois de acidificação e os restantes aeróbios, de forma a monitorizar as variações morfológicas dentro dos reatores, a produção de AOVs para utilização como substrato por parte dos microrganismos acumuladores de PHAs e a selecionar uma população dos microrganismos com elevada capacidade de acumulação desses polímeros.

1.2 Objetivos

Na elaboração deste estudo foram desenvolvidos e aplicados métodos de microscopia e de análise e processamento de imagem de modo a averiguar quais os procedimentos que levam a uma melhor compreensão e análise das culturas mistas como produtoras de polihidroxialcanoatos. Foram analisadas condições de operação diversas em reatores SBR, assim como estudada a produção de AOVs em reatores acidogénicos anaeróbios, nomeadamente MBBR e reatores descontínuos. Os AOVs produzidos foram utilizados como substrato para as culturas mistas nos reatores SBR.

O presente trabalho pretende assim abordar os seguintes pontos:

- Desenvolvimento e aplicação de métodos rotineiros, rápidos e baratos de análise e monitorização microscópica da biomassa em reatores aeróbios (SBRs) e em reatores acidogénicos anaeróbios (MBBR e reatores descontínuos);
- Registrar e estabelecer correlações entre a comunidade microbiana e os parâmetros físico-químicos de operação dos reatores biológicos, nomeadamente sólidos suspensos totais (SST), e voláteis (SSV), percentagem de remoção de CQO, carga orgânica e produção de AOVs;
- Relacionar características da comunidade microbiológica com a formação de AOVs em reatores acidogénicos (MBBR e reatores descontínuos);
- Relacionar a presença de bactérias metanogénicas com a variação da alcalinidade e da razão F/M e com a variação na produção de AOVs nos reatores descontínuos;
- Relacionar a presença de bactérias metanogénicas com a variação da alcalinidade e consequentemente com a produção de AOVs num reator MBBR;
- Relacionar características da comunidade microbiana com a capacidade de acumulação de PHA em determinadas condições de operação dos reatores SBR;
- Relacionar a quantidade de polímero produzido com o tipo de comunidade microbiana e condições de operação dos SBR.

2 Revisão da Literatura

2.1 Processos de tratamento de águas residuais

Os objetivos gerais do tratamento de águas residuais domésticas são: oxidar constituintes biodegradáveis dissolvidos ou particulados em produtos finais aceitáveis; capturar e incorporar sólidos coloidais suspensos ou não sedimentáveis num floco biológico ou biofilme; transformar ou remover nutrientes, tais como azoto e fósforo; e nalguns casos, remover constituintes ou componentes orgânicos específicos (Metcalf *et al.* 2002).

A remoção de CBO e a estabilização da matéria orgânica encontrada nas águas residuais é conseguida biologicamente usando uma variedade de microrganismos, sobretudo bactérias. Os microrganismos são usados para oxidar (i.e., converter) a matéria orgânica carbonácea particulada e dissolvida em produtos finais simples e em biomassa adicional. Os microrganismos também são usados para remover azoto e fósforo em processos de tratamento de águas residuais. Bactérias específicas são capazes de oxidar amónia (nitrificação) a nitrito e nitrato, enquanto outras bactérias conseguem reduzir o azoto oxidado em azoto gasoso.

Para a remoção de fósforo, os processos biológicos são configurados de forma a encorajar o crescimento de bactérias com a capacidade de acumular e armazenar grandes quantidades de fósforo inorgânico. Como a gravidade específica da biomassa é ligeiramente superior à da água, a biomassa pode ser separada do líquido tratado através de sedimentação gravítica. É de notar que, a não ser que a biomassa produzida a partir da matéria orgânica seja removida periodicamente, o tratamento completo não é alcançado, pois a biomassa, que é orgânica, será medida como CBO no efluente tratado. Sem a remoção da biomassa do líquido tratado, o único tratamento verificado é o associado à oxidação da porção da matéria orgânica originalmente presente (Metcalf *et al.* 2002).

Os principais processos biológicos de tratamento de águas residuais podem ser divididos em duas categorias gerais: processos de crescimento suspenso ou de crescimento fixo (Metcalf *et al.* 2002). A Figura 1 apresenta alguns desses processos.

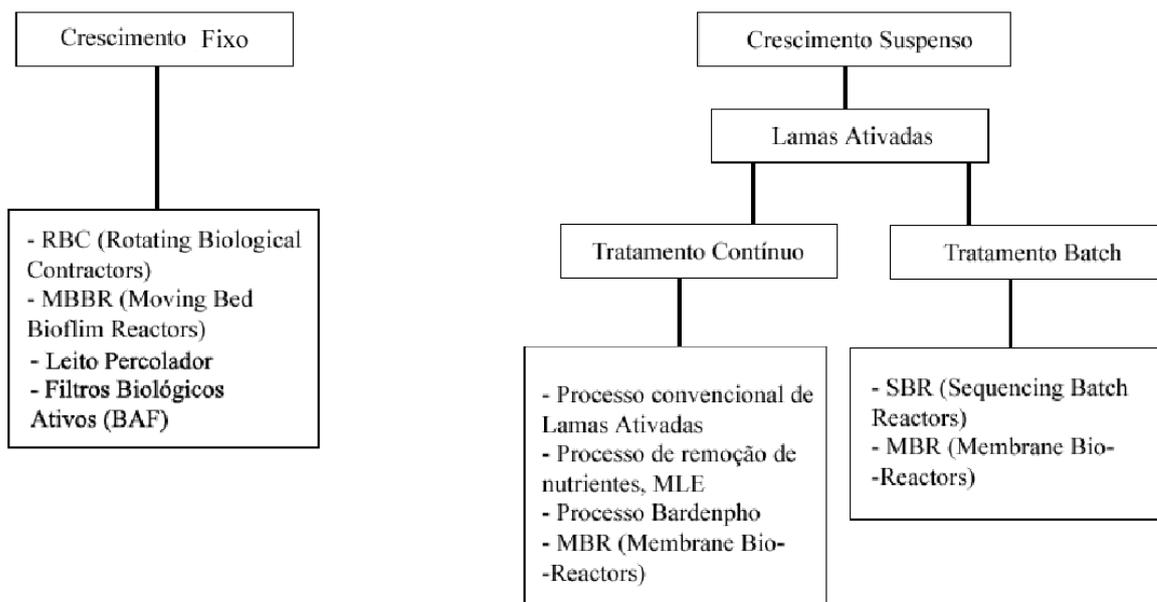


Figura 1: Processos biológicos de tratamento de águas residuais.

Nos processos de crescimento suspenso, os microrganismos responsáveis pelo tratamento são mantidos em suspensão através de métodos de mistura apropriados. Muitos desses processos são operados com uma concentração positiva de oxigénio dissolvido (condições aeróbias), havendo, no entanto, aplicações deste processo em reatores anaeróbios, como por exemplo, para o tratamento de efluentes com elevada carga orgânica. O processo de crescimento suspenso mais comum no tratamento de águas residuais municipais é o processo de lamas ativadas (Metcalf *et al.* 2002), que será discutido com mais detalhe no ponto 2.1.1.1.

Nos processos de crescimento fixo ou de biofilme, os microrganismos responsáveis pela conversão da matéria orgânica ou nutrientes estão agregados a um material de enchimento inerte. A matéria orgânica e os nutrientes são removidos do efluente que passa pelo biofilme. Os materiais de enchimento usados nestes processos incluem pedras, cascalho, escória, areia e uma grande variedade de plásticos e outros materiais sintéticos. Os processos de crescimento fixo também podem ser operados como processos aeróbios ou anaeróbios. O material de enchimento pode estar ou não totalmente submerso, com ar ou gás acima da camada líquida do biofilme. O processo aeróbico mais comum deste tipo é o leito percolador no qual o efluente é distribuído sobre a superfície transversal de um reservatório contendo material de enchimento não submerso (Metcalf *et al.* 2002).

2.1.1 Processos aeróbios

2.1.1.1 Lamas ativadas

O processo de lamas ativadas é um processo de crescimento suspenso que foi desenvolvido em 1914 na Inglaterra e foi adotado mundialmente como um processo de tratamento secundário de águas residuais domésticas. É considerado o processo biológico de tratamento secundário mais versátil em tratamento de águas residuais e consiste essencialmente num tratamento aeróbio que oxida matéria orgânica em CO_2 e H_2O , NH_4 e biomassa (Bitton 2005).

O processo aeróbio consiste na inoculação com uma concentração elevada de microrganismos, que incluem bactérias formadoras de flocos, fungos e organismos filamentosos para acelerar a decomposição da matéria orgânica num tanque de arejamento, onde é injetado ar de forma a ser obtida uma mistura homogénea entre o influente e as lamas ativadas, assim como fornecer o oxigénio essencial para a degradação microbológica da matéria orgânica. A mistura de influente e lamas ativadas é denominado licor misto. Subsequentemente, a biomassa floculada é separada por sedimentação do líquido tratado num clarificador secundário, ou tanque de sedimentação. Parte da biomassa sedimentada é reintroduzida no tanque de arejamento de forma a manter uma concentração de biomassa constante (Amaral 2003). O excesso de lamas produzidas durante o processo é descartado. Estas lamas podem ser posteriormente tratadas antes da sua deposição final. O efluente clarificado é lançado diretamente para o solo ou para um corpo de água corrente. O sistema de lamas ativadas é sumarizado, de acordo com Jenkins *et al.* (1993), na Figura 2.

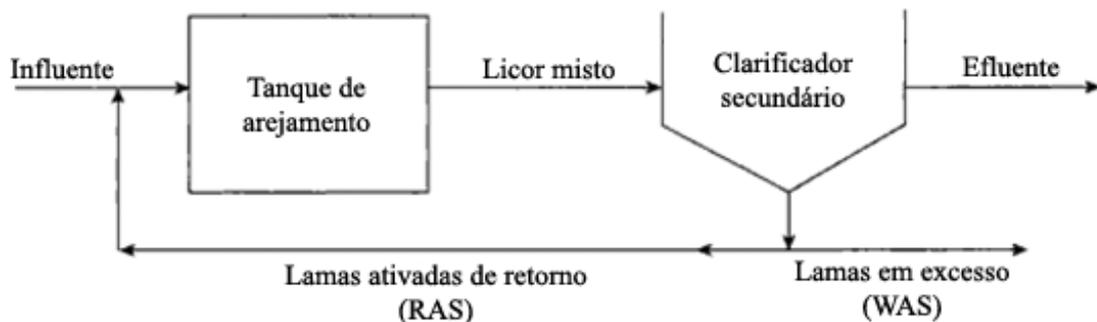


Figura 2: Esquema do processo de lamas ativadas. Adaptado de Jenkins *et al.* (1993).

Os principais problemas encontrados no funcionamento de sistemas de lamas ativadas estão indicados na Tabela 1.

Tabela 1: Causas e efeitos dos problemas de separação de lamas ativadas.
Adaptado de Jenkins *et al.* (1993).

<i>Nome do problema</i>	<i>Causa do problema</i>	<i>Efeito do problema</i>
Crescimento disperso	Microrganismos não formam flocos mas estão dispersos, formando apenas pequenos agregados ou células simples	Efluente turvo. Não há sedimentação das lamas.
Bulking viscoso	Microrganismos estão presentes com grandes quantidades de EPS. Em casos graves, o EPS confere uma consistência gelatinosa às lamas ativadas.	Diminuição da sedimentação e da taxa de compactação. Em casos graves, não há virtualmente nenhuma separação de sólidos, resultando no overflow do sludge blanket do clarificador secundário. Às vezes apresenta-se uma espuma viscosa.
Pin floc ou Pin-point floc	Flocos esféricos, compactos, fracos, dos quais os maiores sedimentam depressa. Os mais pequenos sedimentam devagar.	Elevado Índice de volume de lamas (SVI) e um efluente turvo e enevoado.
Ascensão das lamas	Desnitrificação no clarificador secundário liberta N ₂ (pouco solúvel) que se agrega aos flocos das lamas ativadas e os faz flutuar à superfície do clarificador secundário.	É formada uma camada de espuma de lamas ativadas na superfície do clarificador secundário.
Formação de espuma (Foaming)	Causada por tensioativos não biodegradáveis e pela presença de <i>Nocardia spp.</i> , <i>Microthrix parvicella</i> ou tipo 1863	A espuma faz flutuar grandes quantidades de sólidos de lamas ativadas à superfície dos sistemas de tratamento. As espumas de <i>Nocardia spp.</i> e <i>M. parvicella</i> são persistentes e de difícil remoção mecânica.

Embora o fenómeno de biofloculação seja complexo e os fatores que o afetam não sejam bem compreendidos, suspeita-se que resulte da formação de pontes entre substâncias extracelulares microbianas que funcionam como polieletrólitos. Estas substâncias extracelulares formam uma

camada à volta de células individuais ou conjuntos de células, e podendo ser vários tipos de fibras polissacarídeas e glicoproteínas. (Jenkins *et al.* 1993)

Os problemas referidos na Tabela 1 e outros podem ser interpretados em termos de falhas na micro ou macroestrutura dos flocos do processo de lamas ativadas.

- **Crescimento disperso** – em sistemas de lamas ativadas em boas condições de operação, as bactérias dispersas são consumidas por protozoários. No entanto, em sistemas com elevado CBO, em limitação de oxigénio ou na presença de metais tóxicos, as bactérias formadoras de flocos não conseguem flocular e consequentemente o número de bactérias suspensas aumenta rapidamente. Em última instância, este problema conduz a um efluente turvo e não sedimentável (Amaral 2003).
- **Bulking viscoso ou bulking zoogleal** – Este problema é normalmente associado a problemas de espuma (*Foaming*) (Novak *et al.* 1994) e efluentes altamente biodegradáveis com baixos teores de oxigénio e concentrações de nutrientes no tanque de arejamento (Al-Yousfi *et al.* 2000). *Bulking* zoogleal conduz a um efluente altamente viscoso devido à sobreprodução de EPS. Como resultado disso, os flocos terão uma fraca capacidade de sedimentação e compactação, levando a um efluente final viscoso e de alto teor orgânico (Amaral 2003). Esta condição pode ser observada com o auxílio de um microscópio através do método de coloração negativa com tinta da Índia (Jenkins *et al.* 1993), semelhante, na sua constituição, à tinta-da-China.
- **Bulking filamentoso** – Este problema acontece normalmente em condições de escassez de nutrientes específicos, como azoto ou fósforo, na presença de substâncias tóxicas ou sob a limitação de oxigénio. O *bulking* filamentoso conduz à formação de flocos de dimensões excessivas e a flocos ligados entre si devido ao desenvolvimento excessivo de bactérias filamentosas hidrofóbicas, que se estendem para além dos limites dos flocos, excedendo 10000 mm/mg de sólidos suspensos (Sezgin 1982). Este problema causa uma má compactação dos sólidos no clarificador (elevados valores de SVI), assim como reduzem significativamente as velocidades de sedimentação. Este é o problema mais comum em processos de lamas ativadas (Amaral 2003).

- ***Pin floc ou Pinpoint floc*** – Este problema conduz à destruição dos flocos grandes e à formação de flocos pequenos, compactos, e relativamente esféricos, mas estruturalmente fracos, devido à baixa concentração de bactérias filamentosas em cargas orgânicas elevadas. Embora os flocos de maior dimensão sedimentem facilmente, os de menor dimensão praticamente não sedimentam no clarificador, conduzindo a um efluente fino com um SVI baixo (abaixo de 70 mg/L) mas com elevada turbidez e teor em matéria orgânica (Gerardi e Horsfall 1990).
- **Ascensão de lamas** – A ascensão de lamas é o resultado da ocorrência de desnitrificação em excesso, resultado de condições anóxicas no tanque de sedimentação, devido a um excesso do tempo de retenção hidráulica nesse tanque. Os flocos agregam-se às bolhas de azoto produzidas durante a desnitrificação, o que as faz subir até à superfície do clarificador formando um “manto de lamas”. Como resultado disso, o efluente final será turvo e terá elevados valores de CBO (Amaral 2003).
- ***Foaming*** – Este problema conduz à formação de uma camada de espuma devido ao crescimento excessivo de bactérias filamentosas hidrofóbicas (Duchêne e Cotteux 1998) como a *Nocardia* sp., e por vezes a *Microthrix parvicella*, ou devido à presença de tensoativos não degradáveis. Estas bactérias retêm pequenas bolhas de ar, diminuindo a densidade dos flocos e fazendo com que flutuem, o que consequentemente leva à perda de biomassa devido ao fenómeno de transbordo (Amaral 2003).

2.1.1.1.1 Reatores SBR

Recentemente, os reatores SBR (Sequencing Batch Reactors) têm sido empregues como uma tecnologia eficiente para o tratamento de águas residuais, especificamente para águas residuais domésticas, devido à sua configuração simples (todos os processos necessários são efetuados num único tanque. SBRs são também capazes de remover nutrientes alternando o funcionamento entre períodos anóxicos e aeróbios (Rim *et al.* 1997).

O SBR é um sistema *fill-and-draw* do sistema de lamas ativadas para o tratamento de águas residuais. Neste sistema, as águas residuais são adicionadas a um reator batch, tratadas para

remover componentes não desejáveis, e depois descarregadas. Equalização, arejamento e clarificação podem ser alcançados usando um único reator *batch*. Sistemas de SBR têm sido bem-sucedidos no tratamento quer de águas residuais domésticas quer de industriais. São muito adequados para aplicações de tratamento de águas residuais em condições de baixo caudal ou funcionamento intermitente (USEPA 1999).

Os processos unitários do SBR e dos sistemas convencionais de lamas ativadas são os mesmos. Um relatório da USEPA de 1983 sumariza que “o SBR não é mais que um sistema de lamas ativadas que opera em tempo em vez de espaço”. A diferença entre as duas tecnologias é o facto de o SBR realizar equalização, tratamento biológico, e clarificação secundária num único tanque usando uma sequência cronometrada. Este tipo de reator é também capaz, em alguns casos, de realizar uma clarificação primária. Num sistema de lamas ativadas convencional, estes processos unitários seriam alcançados usando diversos tanques (USEPA 1999).

Um ciclo de tratamento dum SBR consiste numa sequência temporizada que inclui, tipicamente, os seguintes passos: Enchimento, Reação, Sedimentação, Decantação, e Repouso. Quando também se pretende a remoção biológica de nutrientes, os passos no ciclo são ajustados de forma a proporcionar períodos anóxicos ou anaeróbios dentro dos ciclos normais (USEPA 1992). Uma representação do ciclo apresenta-se na Figura 3.

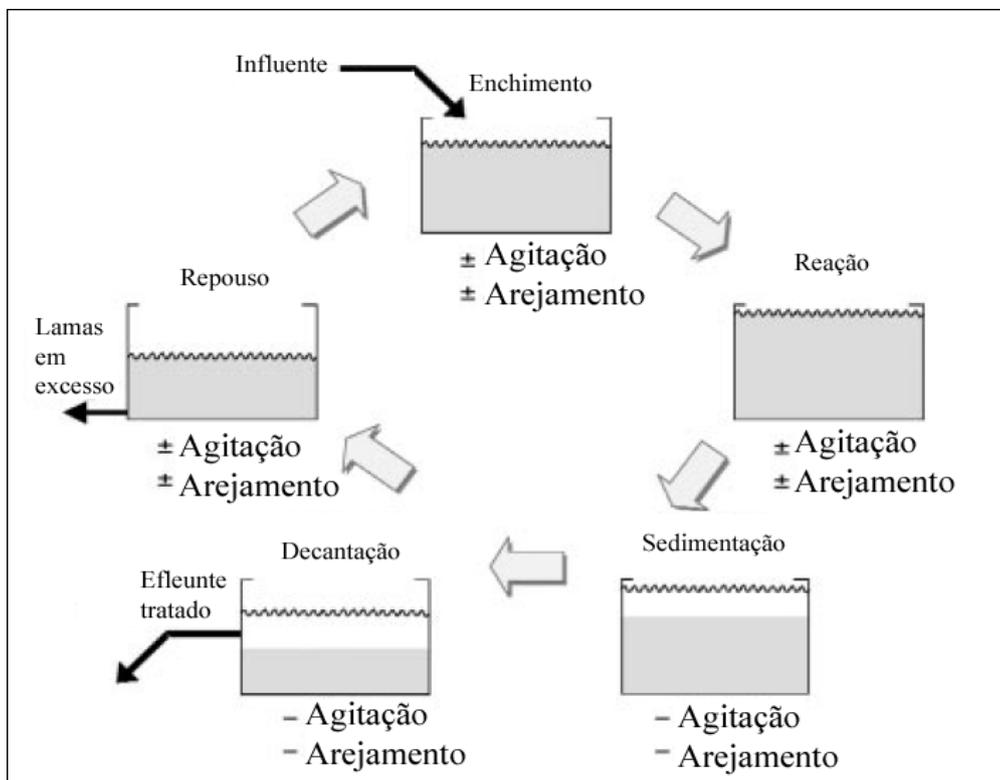


Figura 3: Principais fases do ciclo de operação de um SBR. Adaptado de Florida (2000).

O arejamento num SBR pode ser proporcionado por difusores de bolhas finas ou grosseiras, arejadores/agitadores flutuantes ou dispositivos de arejamento por jato. Como o processo do SBR opera numa série de passos temporizados, a reação e a sedimentação podem ocorrer no mesmo tanque, eliminando a necessidade de um clarificador final (USEPA 1992).

2.1.1.1.2 Microfauna

A microfauna das lamas ativadas não se cinge às bactérias. Na verdade, a comunidade microbiana é de extrema importância nos processos de tratamento de águas, e a sua estrutura permite diagnosticar e avaliar o desempenho do sistema de lamas ativadas. Existem os chamados decompositores (bactérias e fungos) e os seus consumidores, que predam as bactérias dispersas e outros microrganismos. Neste grupo inserem-se os protozoários (Nicolau *et al.* 2002).

A presença de bactérias e outras formas microbianas também é observável em sistemas de operação anaeróbios, porém os protozoários são menos comuns neste tipo de sistemas.

Os protozoários são seres unicelulares complexos que podem adotar diversas formas, e podem ser usados para monitorizar a operação de processos de tratamento de águas residuais (Colin e Curds 1992). As suas principais espécies de protozoários, de acordo com Madoni (1994^a), incluem: os flagelados; os ciliados nadadores, que circulam livremente no meio líquido permanecendo em suspensão; móveis de fundo, que habitam a superfície dos flocos; os sésseis, que estão fixos por um pedúnculo aos flocos e sedimentam com estes; e as amibas com teca.

Os pequenos flagelados estão normalmente presentes em grande quantidade na fase do arranque do sistema, quando os flocos ainda não se encontram devidamente formados. Estes consomem bactérias e são posteriormente substituídos por ciliados bacteriófagos. Num sistema com um bom funcionamento o número de indivíduos é geralmente inferior a $5 \times 10^6/L$. Para valores superiores verifica-se um decréscimo na eficiência depurativa. Os grandes flagelados são menos frequentes nas lamas ativadas e a sua presença está normalmente associada a efluentes com baixa carga orgânica.

Os ciliados nadadores predominam no tanque de arejamento na fase inicial do tratamento. Assim que a floculação aumenta, estes ciliados começam a ser substituídos pelos sésseis, que são filtradores muito mais eficientes, ganhando dessa forma a competição pelas bactérias suspensas no

meio líquido (Madoni 1994^a). Nos casos em que os ciliados nadadores são o grupo dominante, a qualidade do efluente é, geralmente, má (Curds e Cockburn 1970).

Os ciliados móveis de fundo e os sésseis podem coexistir no mesmo sistema devido a ocuparem nichos ecológicos diferentes, e a abundância de cada espécie varia com a carga orgânica do efluente. Na presença de elevadas cargas orgânicas, a densidade de ciliados móveis de fundo é geralmente a primeira a sofrer um decréscimo, já que os ciliados sésseis são mais resistentes a essas cargas.

Alguns tipos de ciliados encontrados geralmente em lamas ativadas apresentam-se na Figura 4.

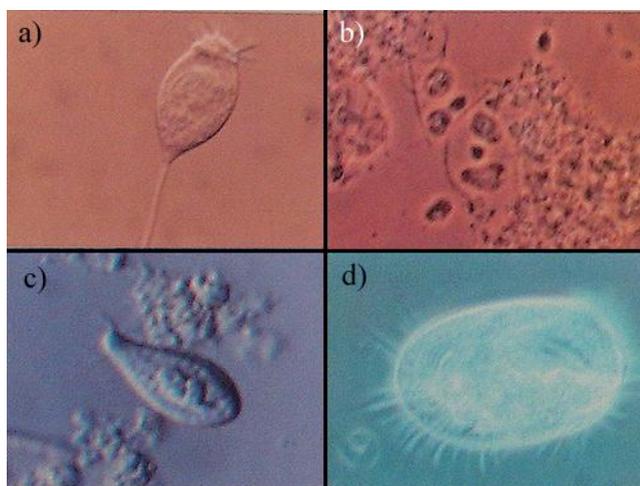


Figura 4: Ciliados: a) sésseis; b) flagelados; c) nadadores; e d) móveis de fundo.

Adaptado de E.M. Saviour *et al.* (1997).

A presença abundante dos ciliados sésseis provoca diferentes respostas nos sistemas de tratamento consoante a espécie ou espécies presentes. Se espécies do género *Opercularia spp.* forem dominantes, verifica-se geralmente uma CBO elevada no efluente ou cargas demasiado elevadas no tanque de arejamento. Já a observação de *Vorticella microstoma*, frequentemente presente na fase de colonização das lamas ativadas, indica uma carência de oxigénio no tanque de arejamento, sendo substituída posteriormente pela *Vorticella convalaria*, que é muito menos resistente à depleção de oxigénio (Nicolau *et al.* 2002).

As amibas com teca são indicadoras de boas condições de nitrificação e estão geralmente presentes em lamas com baixas cargas orgânicas, elevada concentração de oxigénio e grandes tempos de retenção.

Segundo Madoni (1994^b), um sistema de lamas ativadas eficiente apresenta as seguintes características:

- Elevada densidade microbiana ($\geq 10^6$ organismos/L);
- Microfauna composta essencialmente por ciliados móveis de fundo e sésseis, sendo os flagelados praticamente ausentes;
- Comunidade diversificada em que nenhuma espécie domine sobre outra, numericamente, por um fator superior a 10.

Quando o último não se verifica, é possível obter uma indicação, através do grupo dominante, do estado de funcionamento do sistema. Na Tabela 2 são apresentados algumas causas possíveis devido à presença de determinado grupo dominante.

Tabela 2: Situações particulares de estações de tratamento de águas residuais por lamas ativadas. Segundo Madoni (1994^b).

<i>Grupo dominante</i>	<i>Eficiência</i>	<i>Causa possível</i>
Pequenos flagelados	Má	Lamas com baixo teor de oxigénio; entrada de substâncias em vias de fermentação no sistema
Pequenas amibas nuas e flageladas	Má	Carga orgânica elevada e/ou dificilmente degradável
Ciliados nadadores livres (< 50µm)	Medíocre	Baixo tempo de retenção de sólidos; lamas com baixo teor de oxigénio
Ciliados nadadores livres (> 50µm)	Medíocre	Carga orgânica demasiado elevada
Ciliados sésseis	Baixa	Fenómenos transitórios
Ciliados móveis de fundo	Boa	-
Ciliados sésseis + móveis de fundo	Boa	-
Amibas com teca	Boa	Carga orgânica baixa e/ou diluída; boa nitrificação

2.1.2 Processos anaeróbios

2.1.2.1 Biodegradação anaeróbia

A digestão anaeróbia traduz-se por uma série de processos microbianos de biodegradação na ausência de oxigénio e que têm como produto final metano e dióxido de carbono. A natureza microbiológica da metanogénese foi determinada por Koster em 1988 e enquanto os processos de lamas ativadas são levados a cabo por uma grande diversidade de microrganismos, nos processos anaeróbios estão envolvidas maioritariamente bactérias. Na verdade, grande parte das bactérias estritamente ou facultativamente anaeróbias são responsáveis pela hidrólise e fermentação de compostos orgânicos (Amaral 2003).

Em contraste com as bactérias estritamente anaeróbias, sulfato-redutoras e metanogénicas, os microrganismos nitrato-redutores assim como outras bactérias decompositoras, são geralmente facultativos em sistemas anaeróbios, isto é, são capazes de crescer e degradar substâncias orgânicas tanto sob condições aeróbias como anaeróbias. Assim, meios estritamente aeróbios e anaeróbios representam os dois extremos de um espectro contínuo de habitats que estão povoados por uma larga variedade de microrganismos com capacidades de biodegradação específicas. Condições anaeróbias ocorrem onde há elevada decomposição da matéria orgânica e restrição do arejamento, o que resulta na depleção de oxigénio.

A digestão anaeróbia é afetada por condições de operação e ambientais, tais como o TRH (tempo de retenção hidráulica), temperatura, pH e nutrientes, entre outros. Os sistemas de crescimento fixo geralmente possuem valores de TRH mais baixos, que variam entre 1 e 10 dias, que os de crescimento suspenso, que variam entre 10 e 60 dias. (Polprasert 1989) O TRH deve ser suficientemente longo de modo a possibilitar a degradação de compostos complexos pelas bactérias anaeróbias. A temperatura ideal para o crescimento de bactérias mesofílicas é de 25°C a 40°C, enquanto as metanogénicas proliferam a temperaturas na gama dos 30°C a 35°C (Amaral 2003). Num digestor, as várias bactérias têm diferentes requisitos do meio envolvente. Bactérias acidogénicas necessitam de valores de pH entre 4 e 6, enquanto as metanogénicas precisam de valores entre os 6,7 e os 7,4 (Amaral 2003; Temper *et al.* 1986).

2.1.2.1.1 Processos e estágios anaeróbios

Há quatro estágios biológicos e químicos fundamentais no processo de digestão anaeróbia: hidrólise, acidogénese, acetogénese e metanogénese, conforme esquematizado na Figura 5.

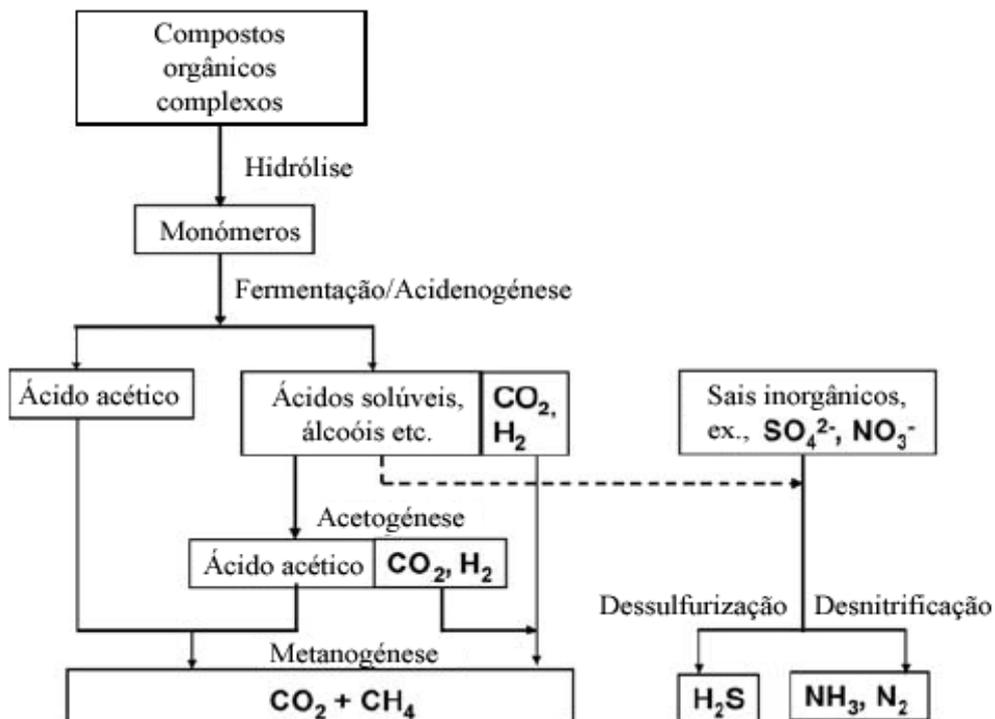


Figura 5: Esquema dos processos de degradação anaeróbia efectuados por microrganismos. Adaptado de Bema *et al.* (2007).

1. Hidrólise

As bactérias hidrolíticas, que incluem *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium* e *Lactobacillus*, hidrolisam moléculas orgânicas complexas (proteínas, celulose, lignina, lípidos) em monómeros solúveis (aminoácidos, glucose, ácidos gordos e glicerol) diretamente disponíveis para as bactérias acidogénicas. A hidrólise é conseguida por enzimas extracelulares relativamente lentas,

tais como celulases, proteases e lipases, sendo assim o passo limitante da digestão anaeróbia de substratos complexos (Polprasert 1989; Speece 1983).

2. Acidogénes

Bactérias acidogénicas ou formadoras de ácidos, convertem açúcares, aminoácidos e ácidos gordos em ácidos orgânicos voláteis, tais como ácido acético, propiônico, fórmico, láctico, butírico e valérico, álcoois e cetonas (etanol, metanol, glicerol e acetona), acetato, dióxido de carbono e hidrogénio molecular. Os produtos formados variam com o tipo de bactérias, condições ambientais (pH, temperatura) e fonte de carbono. O número e composição destes consórcios bacterianos dependem da composição do substrato, mas representam cerca e 90% da população total num digestor anaeróbio (Zeikus 1980). Estas bactérias têm uma taxa de crescimento elevada e por isso a acidogénes nunca é o passo limitante no processo de digestão anaeróbia (Gujer e Zehnder 1983).

3. Acetogénes

As bactérias acetogénicas também chamadas bactérias sintrópicas ou bactérias acetogénicas produtoras obrigatórias de hidrogénio convertem ácidos orgânicos e álcoois em acetato, hidrogénio molecular e dióxido de carbono, que posteriormente são utilizados pelas bactérias metanogénicas. Há uma relação simbiótica forte entre bactérias acetogénicas como *Syntrophomonas* e *Syntrophobacter* e bactérias metanogénicas, porque as últimas ajudam a alcançar as condições de baixa concentração de hidrogénio necessárias para que as conversões acetogénicas ocorram. Pensa-se que, para que esta interação ocorra, é necessária uma proximidade entre estes dois grupos de bactérias (Gujer e Zehnder 1983), o que pode justificar, em certa medida, o fenómeno de granulação (Schnick e Thauer 1987).

4. Metanogénes

A metanogénes é o passo final do processo de digestão anaeróbia e, na maioria dos casos, o passo limitante do processo. As bactérias metanogénicas ocorrem naturalmente em sedimentos marinhos ou no rúmen de herbívoros e crescem lentamente nas águas residuais em tempos de duplicação que vão desde 3 dias a 35°C até 50 dias a 10°C. As bactérias metanogénicas apenas degradam um pequeno número de substratos como acetato, metanol, metilaminas, formato e

dióxido de carbono, e podem ser divididas em duas sub-categorias: metanogénicas hidrogenotróficas e metanogénicas acetotróficas (Amaral 2003).

2.1.2.2 Reatores MBBR

O processo de funcionamento de reatores MBBR (Moving Bed Biofilm Reactor) baseia-se no princípio do biofilme que combina as vantagens tanto do processo de lamas ativadas como dos processos convencionais de filme fixo, sem partilhar as suas desvantagens. O reator pode ser operado a cargas orgânicas muito elevadas já que o processo é insensível a variações de carga e outras perturbações (Dalentoft e Thuhn 1997; Odegaard *et al.* 1994). Ao contrário da maioria dos reatores com biofilme, o volume do reator é completamente misturado e conseqüentemente não existem espaços mortos ou inutilizáveis no reator. Adicionalmente, este sistema possui uma baixa perda de carga e não há necessidade de re-circular as lamas ou a biomassa (Xiao *et al.* 2007).

O processo pode ser usado como:

- Sistema de pré-tratamento antes de um processo de lamas ativadas existente de modo a aumentar a remoção de matéria orgânica;
- Processo biológico único de remoção de CBO, nitrificação e ou desnitrificação;
- Adaptação de um processo de lamas ativadas existente de forma a aumentar a capacidade de nitrificação do sistema (Brinkley *et al.* 2007).

O MBBR usa pequenos elementos de plástico (*carriers*) que proporcionam locais de adesão para bactérias num meio de crescimento suspenso. Os suportes plásticos permitem manter no reator uma maior concentração de biomassa comparado a um sistema clássico de crescimento suspenso, tal como as lamas ativadas. Isto aumenta a capacidade de tratamento biológico para um dado volume de reator. Estes elementos de plástico podem ser instalados num reator anóxico, anaeróbio ou num tanque de arejamento (Brinkley *et al.* 2007).

Uma vantagem importante do MBBR é que a fração de enchimento dos *carriers* de biofilme no reator pode estar sujeita a preferências. Para permitir que os *carriers* se movam livremente em suspensão, é recomendada uma fração de enchimento abaixo dos 70%, pois experiências demonstram que a eficiência de mistura decresce com percentagens mais elevadas de

enchimento (Rusten *et al.* 2006; Weiss *et al.* 2005). A área superficial efetiva para o tipo de *carrier* a utilizar, determina o volume de meio de enchimento requerido (Camp *et al.* 2001).

Reatores MBBR usam crivos para separar o meio circulante do efluente a ser descarregado. A retenção do meio dentro do reator ajuda na seleção e enriquecimento de organismos que estão mais bem adaptados às condições de nutrientes que prevalecem no reator em estado estacionário (Weiss *et al.* 2005).

2.2 Polímeros

Os polímeros naturais (do grego *poly* – “muitos” e *meros* – “partes”) encontram-se em diversas formas, tais como em carapaças de tartaruga, asfalto e alcatrão da destilação de materiais orgânicos. Um dos polímeros naturais mais úteis de sempre, extraído da seiva de árvore *havea* foi a borracha, recebendo o seu nome do químico Joseph Priestly. A borracha natural tinha um uso limitado, já que é quebradiça a baixas temperaturas e derrete quando aquecida (Katz 1998).

Embora muitos polímeros tenham sido produzidos nos anos seguintes, a sua produção em massa apenas ocorreu aquando da Segunda Guerra Mundial, em que a necessidade de produção de borracha sintética para pneus e fibra *nylon* para pára-quadras era elevada. Desde então, a indústria de produção de polímeros cresceu e diversificou-se de tal forma que atualmente são usados em milhares de produtos comuns, tais como plásticos, elastómeros, revestimentos e colas, sendo um das indústrias de mais rápido crescimento no mundo (Katz 1998).

A indústria de produção de polímeros sintéticos trouxe ainda grandes benefícios para a sociedade moderna. Destacam-se no setor de acondicionamento e distribuição de produtos alimentares e outros produtos perecíveis, os polímeros termoplásticos, que possuem propriedades hidrofóbicas e são biologicamente inertes (Gerald 2000).

No entanto, nos anos 70 tornaram-se evidentes as desvantagens dos produtos derivados de polímeros, nomeadamente como resíduos no ambiente. Os efeitos das embalagens provaram ser nefastos para a vida selvagem e assim apelou-se ao retorno do uso de polímeros de origem biológica – renováveis (Gerald 2000).

2.2.1 Características e tipos de polímeros

Um polímero é composto por um conjunto elevado de pequenas unidades moleculares denominadas por monómeros, tipicamente conectadas por ligações químicas covalentes. Por norma, uma macromolécula polimérica possui cadeias de monómeros que atingem comprimentos na ordem dos milhares de unidades. As unidades de monómeros constituintes de um determinado polímero podem ser semelhantes entre si, ou diferentes (Masterton e Hurley 2006).

Estas macromoléculas, constituídas por longas cadeias de monómeros, podem apresentar quatro tipos de estruturas diferentes: linear, presente em termoplásticos como acrílico, *nylon* e PVC; ramificada, como no polietileno; reticulada, que se apresenta em muitas borrachas e elastómeros; ou em rede, como epóxis e fenólicos (Kalpakjian e Schmid 2008). A Figura 6 ilustra os vários tipos de estruturas poliméricas.

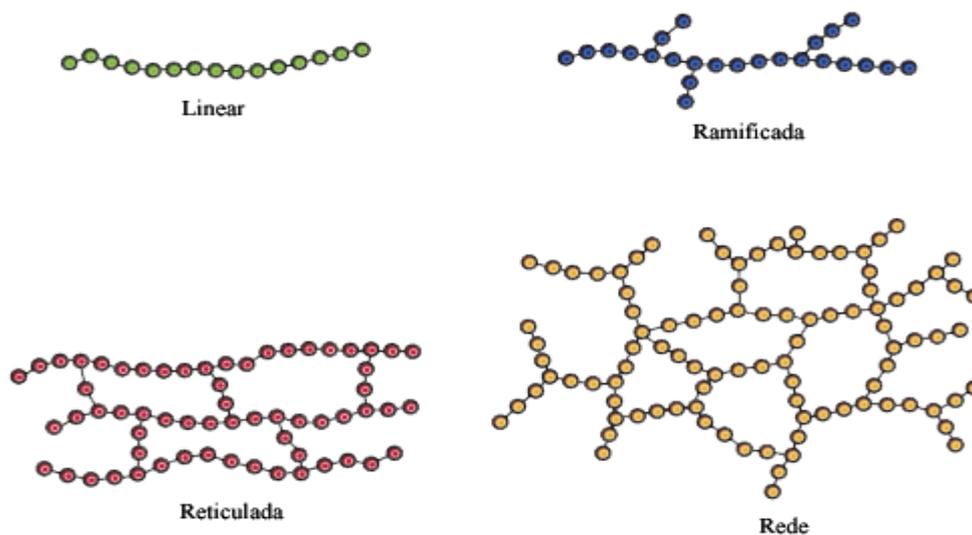


Figura 6: Representação esquemática de tipos de estruturas ou formas de cadeias poliméricas.

Adaptado de Kalpakjian e Schmid (2008).

Os polímeros podem ser naturais ou sintéticos e orgânicos ou inorgânicos. Na Tabela 2 apresentam-se alguns exemplos de alguns polímeros que existem e são formados naturalmente ou criados quimicamente.

Tabela 3: Exemplos de tipos de polímeros naturais e sintéticos de acordo com a sua natureza

	<i>Natural</i>	<i>Sintético</i>
Inorgânico	Areia; argilas	Fibra de vidro; cerâmica; betão
Orgânico	Polissacarídeos (madeira, amido); polipéptídeos (proteínas); ácidos nucleicos (RNA, DNA); poliisopreno natural (borracha natural)	Poliiolefinas; poliésteres; poliamidas; poliisopreno sintético

Um dos polímeros mais importantes de ser estudado é o polietileno. É a poliolefina mais simples, sendo constituído apenas de carbono e hidrogénio, e é polimerizado através de uma ligação dupla. Devido à sua estrutura simples, serviu como um polímero modelo em muitos laboratórios. Igualmente, a elevada importância comercial do etileno como um plástico cristalino tornou os seus resultados imediatamente usáveis (Sperling 2006).

Os polímeros sintéticos têm vindo a ser desenvolvidos desde 1930 pela indústria química e os monómeros são ligados entre si por adição, ou condensação. (Masterton e Hurley 2006)

Polímeros de adição são formados quando unidades de monómeros se ligam diretamente entre si. Alguns dos mais conhecidos incluem o polietileno, polipropileno, PVC, entre outros, com diversificados usos – como sacos, pneus, brinquedos, tetinas, calçado, embalagens de leite e tubos, entre muitos outros (Masterton e Hurley 2006).

Polímeros de condensação formam-se através de uma reação de condensação, em que duas moléculas combinam-se descartando uma molécula pequena, tal como H₂O. De forma a ser criado um polímero de condensação, os monómeros envolvidos no processo devem conter grupos funcionais em ambas as extremidades da molécula. Geralmente estes grupos são –NH₂, –OH ou –COOH. Os produtos formados por este processo são chamados de poliésteres e poliamidas (Masterton e Hurley 2006).

Os polímeros de origem natural orgânica são denominados de biopolímeros. Estes ocorrem naturalmente e alguns são essenciais à existência dos seres vivos, tais como as proteínas e os ácidos nucleicos. Os hidratos de carbono também se inserem na categoria de polímeros naturais, e podem ser classificados como monossacarídeos (glucose, frutose, galactose, etc), dissacarídeos (maltose, sucrose, etc) e polissacarídeos (celulose, amido, etc). Os polihidroxialcanoatos (PHA) são referidos em maior detalhe no ponto 2.2.2.

Geralmente, polímeros provenientes de recursos naturais podem ser classificados em três grupos: polímeros naturais, como amido, proteína e celulose; polímeros sintéticos a partir de monómeros naturais, como o poli(ácido láctico); e polímeros a partir de fermentação microbiana, como o poli(hidroxitirato) (Yu 2009). No entanto, os polímeros podem ser classificados de inúmeras maneiras, já que as suas propriedades físicas e químicas, assim como a maneira como são formados é diversa.

As propriedades físicas de um polímero não dependem apenas dos monómeros que o constituem, mas também das estruturas secundárias e terciárias, isto é, a estereoquímica da ligação, o comprimento e distribuição da cadeia, a sua capacidade de cristalizar ou permanecer amorfo sob diversas condições, e a forma ou distribuição de formas da cadeia nos estados cristalino e amorfo (Mark 2007).

A indústria de polímeros sintéticos trouxe grandes benefícios á sociedade moderna, como por exemplo no embalamento e distribuição de produtos perecíveis, como comida e outros bens. Devido às características hidrofóbicas e o facto de serem biologicamente inertes, estes polímeros tornaram-se essenciais no mercado moderno (Scott 1999).

O maior grupo de polímeros usados tanto no embalamento como na agricultura são poliolefinas, que são duráveis durante o seu tempo de vida útil, pois são resistentes à peroxidação, à água e à degradação por microrganismos (Gerald 2000).

Nos anos 70 tornou-se claro que as vantagens que tornavam estes polímeros extremamente úteis, tornavam os produtos à base dos mesmos extremamente resistentes à degradação, aparecendo assim como resíduos no ambiente no fim da sua vida útil, sendo alguns desses produtos bastante prejudiciais à vida selvagem. Isto levou ao apelo de movimentos “verdes” de se recorrer a polímeros de origem biológica, que são renováveis (Gerald 2000).

Na prática, apenas uma pequena proporção em termos de peso de materiais poliméricos acaba como resíduo. Os tipos de deposição mais utilizados são a incineração ou o encaminhamento para aterro sanitário. No entanto, a última opção não é aceitável a nível ecológico para este tipo de resíduos. Os materiais biológicos, em condições anaeróbias, sofrem degradação e emitem gases como o metano, que é um gás de efeito de estufa mais eficiente que o dióxido de carbono. Este gás é também responsável por explosões de casas construídas por cima de terrenos que já serviram de aterros sanitários. É prevista a completa inutilização deste meio de deposição de resíduos de consumo até ao ano de 2015, tendo em conta os aumentos dos custos dos impostos associados aos

aterros, aliados aos custos logísticos do transporte de resíduos urbanos para áreas rurais. Os planos de gestão de resíduos municipais estão a refletir esta tendência de forma crescente.

Na Figura 7 apresentam-se esquematizadas as alternativas preferenciais à deposição em aterro.

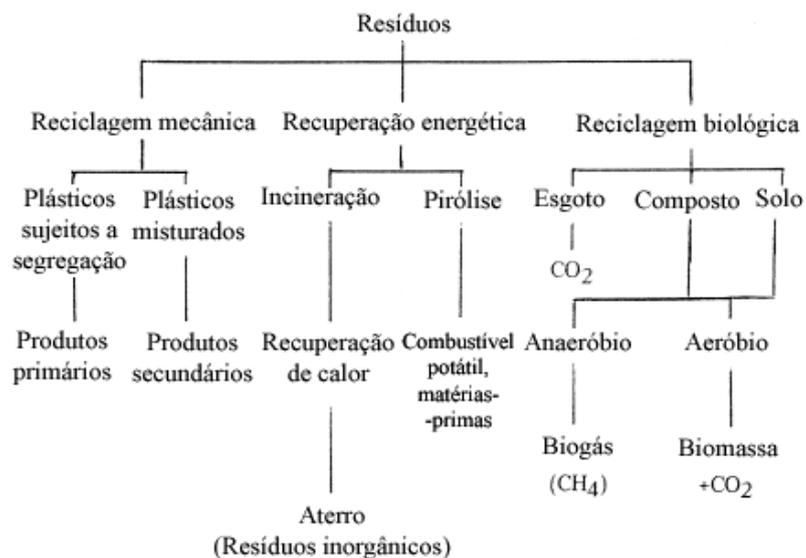


Figura 7: Esquema de opções de gestão de resíduos poliméricos. Adaptado de Gerald (2000).

Das opções acima indicadas, a incineração com recuperação energética é, à primeira vista, uma via ecologicamente aceitável de utilizar resíduos de polímeros à base de carbono, devido ao seu poder calorífico elevado. No entanto, existe ainda uma desconfiança geral por parte do público face à utilização deste processo, já que a emissão de substâncias tóxicas por parte de determinados polímeros é possível, particularmente no PVC, que pode produzir dioxinas durante a combustão. Por outro lado, cada vez mais os plásticos são vistos como recursos a serem reutilizados. A reciclagem mecânica de polímeros individuais resulta na formação de produtos semelhantes, mas de qualidade inferior. Misturas de plásticos não são normalmente indicados para aplicações secundárias. Porém, todos os plásticos podem ser pirolisados de forma a produzir combustíveis, matérias-primas petroquímicas e, em alguns casos, monómeros.

Devido à importância crescente da compostagem municipal, há um interesse crescente em polímeros que sejam totalmente biodegradáveis. Estes polímeros biologicamente recicláveis podem ter como base recursos renováveis ou recursos petroquímicos (Gerald 2000).

2.2.2 Polihidroxicanoatos (PHA)

Polihidroxicanoatos (PHA) são uma família de poliésteres ou copoliésteres sintetizados e acumulados por diversos microrganismos, contendo propriedades materiais semelhantes ao polipropileno e ao polietileno, com a vantagem de serem totalmente biodegradáveis e poderem ser produzidos por culturas mistas (Lee e Chang 1995; Lemos *et al.* 2006; Reis *et al.* 2003). Estes biopolímeros são acumulados como uma reserva de energia quando as células se encontram em condições de crescimento desequilibrado na presença excessiva de carbono. As propriedades semelhantes às dos plásticos e a biodegradabilidade dos PHAs tornam-nos atrativos como potenciais substitutos de polietilenos e polipropilenos não biodegradáveis, assim como biomateriais biodegradáveis e biocompatíveis para implantes (Chen and Wu, 2005).

Os PHA podem ser divididos em dois grupos distintos, consoante o número de átomos de carbono no monómero; PHA de cadeia curta, com 3-5 átomos de carbono (PHA_{SCL}); e os PHA de cadeia média, com 6-14 átomos de carbono (PHA_{MCL}) (Lee e Chang 1995; Tajalli e Ipsita 2010).

Estes poliésteres têm interessado a comunidade polimérica tanto pelas suas propriedades físicas notáveis como pela sua biodegradabilidade. Muitos esforços têm sido levados a cabo de modo a melhorar a economia de processos biotecnológicos usados para preparar estes materiais, de modo a que se tornem competitivos comercialmente relativamente aos polímeros à base de petróleo como propriedades semelhantes (Belgacem e Gandini 2008).

No entanto, até hoje, a limitação da disponibilidade de biopolímeros numa ampla gama de aplicações é de facto de carácter económico, visto o preço do polihidroxicanoato (PHB) (9€/kg) e do PHA (3.5-5.0€/kg) (Lemos *et al.* 2006) não conseguirem competir com o preço dos plásticos convencionais à base de petróleo (1€/kg). O custo acrescido está diretamente ligado ao custo do substrato usado nas culturas puras, como a glucose e o ácido propiónico, e à extração do polímero das células (Reis *et al.* 2003).

De modo a baixar o custo total de produção de polímeros biodegradáveis, Randall Shrogen, 2008, sugere a combinação de amido com PHA, já que o amido é relativamente barato (0,26€/kg para amido de milho). A vantagem do uso de amido, assim como do PHA, é ser completamente biodegradável e estar já sob a forma de um pó branco, fino. O amido pode também servir como enchimento de reforço, aumentando a robustez da mistura. Como o amido sofre uma rápida bioerosão, isto pode também influenciar na taxa de degradação geral das combinações amido-PHA.

A escolha de um organismo para a produção industrial de PHA tem de ter em conta diversos fatores, tais como a capacidade de utilização de substratos baratos por parte das células, o que afeta diretamente o custo de produção de PHA; a taxa de crescimento; a taxa de síntese de PHA e a extensão de acumulação dos mesmos. O último fator afeta diretamente a quantidade produzida, pelo que deve ser o mais elevado possível (Lee e Chang 1995).

Os produtores industriais têm procurado novas formas de baixar os custos da produção destes biopolímeros aumentando a capacidade volúmica dos sistemas de fermentação e melhorando a tecnologia do processo. A utilização de culturas mistas facilita a utilização de substratos complexos, já que os microrganismos se conseguem adaptar continuamente a mudanças no substrato, e deste modo elimina a necessidade de esterilização (Reis *et al.* 2003). De acordo com Choi e Lee (1999), os custos dos substratos de entrada podem chegar a perfazer 38% do custo total da produção de PHA, e estimaram também que os custos operacionais de fermentadores batch de grande escala podem perfazer até 11% dos custos totais de produção, que incluem a esterilização do meio e processos de arejamento (Choi e Lee 1999).

Sabe-se que lamas ativadas submetidas a condições transitórias, causadas principalmente por alimentação descontínua e variações na presença de aceitadores de eletrões, são responsáveis pela capacidade de armazenamento de grandes quantidades de PHA por parte de certos microrganismos. Antigamente a acumulação de PHA por culturas mistas chegava a perfazer cerca de 60% do peso seco das lamas, (Reis *et al.* 2003) estando longe dos acima de 80% alcançados com o uso de culturas puras. Porém, estudos recentes afirmam que já foram conseguidos valores próximos de 78,5% (Lemos *et al.* 2006) e de 89% (Oshiki *et al.* 2011) em peso celular em base seca.

A acumulação de PHA pode ser bastante importante em condições em que as colónias microbiológicas passam por períodos consecutivos de acesso a substrato, “fartura”, e de ausência do mesmo, “fome”. Este processo denomina-se atualmente por *Aerobical Dynamic Feeding* (ADF) ou “Fome e Fartura”. (Lemos *et al.* 2006) Alguns microrganismos acumulam o PHA sob limitação de azoto, enquanto outros, como *Alcaligenes latus* acumulam o polímero durante o seu crescimento.

Os custos do processo de produção utilizando culturas mistas podem assim ser substancialmente reduzidos visto o custo dos substratos usados ser reduzidos e os reatores usados não requererem esterilização nem de tantos processos de controlo como os reatores usados em culturas puras. Além disso, a seleção de microrganismos para a produção de PHA baseia-se em princípios ecológicos ao invés da necessidade de utilização de condições estéreis, como no caso dos processos da indústria biotecnológica. (Reis *et al.* 2003) Substratos de fontes de carbono

provenientes de resíduos orgânicos são a melhor escolha a nível económico. Porém, resíduos à base de hidratos de carbono não são uma boa escolha para a produção de PHA por culturas mistas, pois estes são preferencialmente transformados em glicogénio em vez de PHA. No entanto, se forem antecipadamente fermentados em ácidos orgânicos voláteis (AOVs), servem de substrato às culturas mistas para a produção dos PHA.

A incorporação de diferentes unidades monoméricas nas cadeias poliméricas, além do HB, cria co-polímeros com melhores propriedades mecânicas, semelhantes às do polietileno e polipropeno (Lemos *et al.* 2006; Yu 2009). Um exemplo destes co-polímeros é o P(3HB-co-3HV), que é um co-poliéster de 3-hidroxibutirato e 3-hidroxivalerato.

2.2.3 Substâncias poliméricas extracelulares (EPS)

As substâncias poliméricas extracelulares (EPS) são uma mistura complexa de biopolímeros de elevado peso molecular excretados por microrganismos, produzidos por lise celular e matéria orgânica absorvida do efluente. São um componente crucial nos agregados microbianos por proporcionarem uma área superficial extensa por unidade de volume para a agregação inicial de células a superfícies sólidas. Estes compostos ajudam a formar e manterem a estrutura da colônia microbiológica e do biofilme; e aumentar a resistência do biofilme a stress do meio, a desinfetantes e a substâncias tóxicas (Czaczyk e Myszka 2007; Sheng *et al.* 2008; Sponza 2002).

As suas características (capacidade de adsorção, biodegradabilidade e hidrofobia) e os seus componentes principais (carboidratos, proteínas, substâncias húmicas e ácidos nucleicos e urânicos (Czaczyk e Myszka 2007)) afetam de forma crucial as propriedades dos agregados microbianos, tais como a transferência de massa, características de superfície, capacidade de adsorção, estabilidade, formação de flocos, entre outros (Sheng *et al.* 2008). Estas substâncias constituem a maior porção orgânica das lamas ativadas (Wilén *et al.* 2008).

Willén (2008) observou que a composição das lamas sofreu uma mudança sazonal com concentrações de EPS mais elevadas durante os meses de inverno. O conteúdo proteico das lamas totais e as EPS aumentaram significativamente no inverno. Isto coincidiu com uma maior concentração de sólidos suspensos (SS) no efluente e aumento da fragilidade dos flocos.

Um estudo recente de Li e Yang (2007) revelou que EPS fracamente ligado aos flocos (LB-EPS) está correlacionado positivamente com a concentração de sólidos suspensos no efluente e com o Índice volumétrico de lamas (SVI). Foi observado que elevadas quantidades de biopolímeros impedem a floculação de células bacterianas. Claramente, o tipo e propriedades físicas das EPS afetam a floculação, sendo também significativa, provavelmente, a disponibilidade de iões que tornam possível a ligação entre polímeros. O estudo revela também que as LB-EPS têm um efeito negativo na floculação das lamas e que EPS excessivo sob a forma de LB-EPS pode enfraquecer a agregação das células, o que resulta em má floculação.

Existem vários fatores que influenciam a produção de EPS (Sheng *et al.* 2008):

- Tipo de substrato – o tipo de substrato tem um efeito substancial na comunidade e metabolismo microbianos das lamas, influenciando desta forma a produção de EPS.

Li e Yang (2007) observaram que lamas alimentadas com glucose possuíam uma produção de EPS mais elevada que lamas alimentadas com acetato.

- Teor em nutrientes – Estudos demonstram que a produção de EPS é promovida aquando da escassez de fósforo, outros indicam que a sua síntese é geralmente favorecida com um excesso de uma fonte de carbono e uma carência de azoto ou oxigénio (Freitas *et al.* 2011).
- Fase de crescimento – o tempo de retenção de sólidos (TRS) tem um efeito considerável na formação de EPS, mas os resultados na literatura são um pouco contraditórios. Muitos investigadores verificaram que as EPS em diversos agregados microbianos aumentam com o aumento do TRS, o que sugere que as bactérias produzem mais EPS em condições endógenas.
- Condições externas – como as EPS estão ligadas a células maioritariamente por formação de pontes de iões com metais multivalentes, a concentração de metais pode também influenciar o teor em EPS. Sob condições de limitação ou depleção de oxigénio os flocos tendem a desintegrar-se, o que pode ser causado pela supressão da produção de EPS ou hidrólise do mesmo. De facto, a produção de EPS é maior em condições aeróbias (Freitas *et al.* 2011).

Um aumento na taxa de corte ou intensidade de arejamento em reatores (SBR) pode também aumentar o teor de EPS nas lamas. Pode haver uma correlação positiva entre a produção de carboidratos por parte das bactérias quando a taxa de arejamento é mais elevada (Sheng *et al.* 2008).

2.3 Microscopia

A observação de lamas ativadas sob microscópio é útil na determinação da natureza física dos flocos e da quantidade e tipo de organismos filamentosos presentes. A recolha de informação de carácter biológico e bioquímico das lamas através deste tipo de examinação é limitada. Não é possível afirmar que as lamas são “saudáveis” ou não, “ativas” ou “inativas”, “novas” ou “velhas” baseando-nos apenas na análise microscópica. Para uma avaliação mais precisa das lamas, a microscopia é aliada à análise química, para a determinação da qualidade do efluente e problemas associados à separação de sólidos (Jenkins *et al.* 1993).

Relativamente aos problemas de separação de sólidos em sistemas de lamas ativadas, tanto a análise microscópica como a caracterização de organismos filamentosos é essencial (Jenkins *et al.* 1993).

As amostras de licor misto de sistemas de lamas ativadas devem ser retiradas em pontos de boa mistura, como do efluente no fim do tanque de arejamento ou do efluente entre o tanque de arejamento e o clarificador secundário. As amostras devem ser retiradas abaixo da superfície, evitando quaisquer sólidos suspensos ou espuma que possa eventualmente formar-se à superfície. Embora as espumas possam ser espessas e viscosas não devem ser diluídas, pois uma das observações importantes é a diferença na abundância de organismos filamentosos na espuma relativamente ao licor misto (Jenkins *et al.* 1993).

Em sistemas em que as condições dos reatores/secções variem ou com sequências distintas (anaeróbio/aeróbio) há a necessidade de se tirar amostras nesses mesmos locais/sistemas (Jenkins *et al.* 1993).

A frequência de amostragem e examinação é determinada consoante as condições sob as quais as amostras estão a ser analisadas. Amostragem diária pode ser justificada em casos críticos (quando está a ocorrer *bulking* das lamas ou se antecipa a sua ocorrência; durante a cloração das lamas de retorno (RAS) para o controlo de *bulking*; durante períodos de operação experimental). Para examinação *offsite* (em laboratório), frequências semanais ou mensais já podem ser empregues, tendo em conta a gravidade dos problemas encontrados (Jenkins *et al.* 1993).

As amostras devem ser analisadas o mais depressa possível após a sua recolha. Esperar algumas horas não traz consequências, porém, para períodos mais longos de espera é aconselhável conservar a amostra a 4°C. A amostra não deve ser preservada usando químicos nem ser congelada,

já que estes processos podem alterar as características dos flocos e dos organismos filamentosos. Quanto mais tempo passar desde a recolha até à examinação, mais difícil se torna a análise e interpretação dos dados obtidos através da mesma. Amostras de sistemas com baixa razão F/M e alto tempo de retenção de sólidos (TRS) mantêm as suas características durante mais tempo do que amostras de sistemas com elevada razão F/M e baixo TRS (Jenkins *et al.* 1993).

2.4 Análise e processamento de imagem

Durante anos, os microbiologistas contavam e mediam espécimes visualmente. Recentemente, a análise de imagem tornou-se um complemento indispensável das técnicas de microscopia ótica, permitindo uma quantificação rotineira automática, que reduz ou anula a subjetividade do operador, assim como a identificação e diferenciação de diversas espécies presentes em amostras microbianas. (Amaral 1998)

O decréscimo do custo do material informático possibilitou a transformação da análise de imagem num processo acessível e rotineiro em muitos campos da ciência (Amaral 2003). Desde os anos 70, têm sido comercializados equipamentos de análise de imagem desenvolvidos para a contagem automática de colónias de bactérias, sendo também possível analisar a atividade e estrutura dessas colónias. A maioria das imagens é adquirida em formato monocromático onde a diferença de tonalidade é explorada. No entanto, já estão disponíveis no mercado sistemas a cor, embora ainda bastante dispendiosos e de maior exigência técnica (Neves 2002).

Análise de imagem, em sentido lato, refere-se tanto aos processos estritamente de análise de imagem como aos processos antecedentes de captura e processamento de imagem (Dougherty 1994). A maior parte dos métodos de aquisição de imagem emprega câmaras de vídeo analógicas ou digitais acopladas a microscópios óticos, eletrónicos e estereoscópicos, entre outros aparelhos, nos quais as imagens são captadas por uma placa de aquisição de dados de um computador (Amaral 2003).

De uma forma geral, o termo análise de imagem engloba cinco passos (Amaral *et al.* 1999): a aquisição das imagens, a aplicação dos filtros, a segmentação, a aplicação do programa e a obtenção dos parâmetros pretendidos. Caso as imagens sejam adquiridas inadequadamente (desfocadas, não representativas, entre outros) todo o processo é posto em causa (Dougherty 1994; Glasbey e Horgan 1994; Jähne 1997).

O processo de aquisição começa com o tipo de equipamento utilizado para o efeito, geralmente uma câmara acoplada a um microscópio que por sua vez está ligado a um computador. Existem diversos tipos de câmaras disponíveis, sendo que as mais novas e consideradas *solid state cameras* se baseiam em detetores CCD (*Charge-Coupled Device*), CID (*Charge-Injection Device*), CMOS (*Complementary Metal Oxide Silicon*) ou CMD (*Charge Modulated Device*) (Pons and Vivier, 1999). Por sua vez, a placa de aquisição recebe o sinal analógico da câmara e transforma-o em informação digital que pode ser usada pelo computador. Este processo resulta numa matriz de

elementos de imagem (denominados pixéis) diretamente proporcional à intensidade luminosa recebida por cada sensor da câmara CCD analógica. O número de bits atribuídos aos pixéis de qualquer imagem determina o número de cores da imagem. Para as imagens em escala de cinza, que ainda são as mais utilizadas, é comum representar cada pixel em 8 bits, correspondendo a 256 níveis de cinzento (Amaral 2003). Após serem adquiridas no computador, as imagens são geralmente gravadas nos formatos TIFF (*Tagged Image File*) ou BMP (*Windows Bitmap*). Estes formatos ocupam consideravelmente mais espaço no disco em comparação a outros (GIF (*Graphics Interchange Format*) ou JPEG (*Joint Photographers Expert Group*)), o que significa que retêm uma maior quantidade de informação da imagem, que é de importância crucial no processo de análise de imagem.

Subsequentemente, as imagens são então processadas de forma a se obter a imagem final, em escala de cinzentos ou binária, contendo a informação necessária para determinada aplicação. O primeiro passo deve consistir em eliminar diferenças de luz no fundo ou remove-lo, sendo de seguida importante eliminar ou atenuar o ruído, podendo ser usados para o efeito diversos tipos de filtros, como o Gaussiano ou de *Wiener* (Amaral 2003).

Após a remoção do ruído, as regiões de interesse (ROI) devem ser definidas e acentuadas de modo a ser possível reconhecê-las pelo operador ou por algoritmos de segmentação automáticos. Este propósito pode ser alcançado usando filtros lineares de aumento de contraste, como a normalização e equalização de histograma, ou o uso de funções logarítmicas ou exponenciais no histograma da imagem (Russ 1995). Alternativamente podem ser usadas operações morfológicas em escala de cinzentos tais como filtros de erosão e dilatação (Amaral 2003).

Após o último passo a imagem passa por um processo de binarização, resultando numa imagem que possui apenas duas cores: branco, de valor numérico 255, cor do fundo, e preto, de valor 0, cor dos objetos de interesse, como indicado na Figura 8.

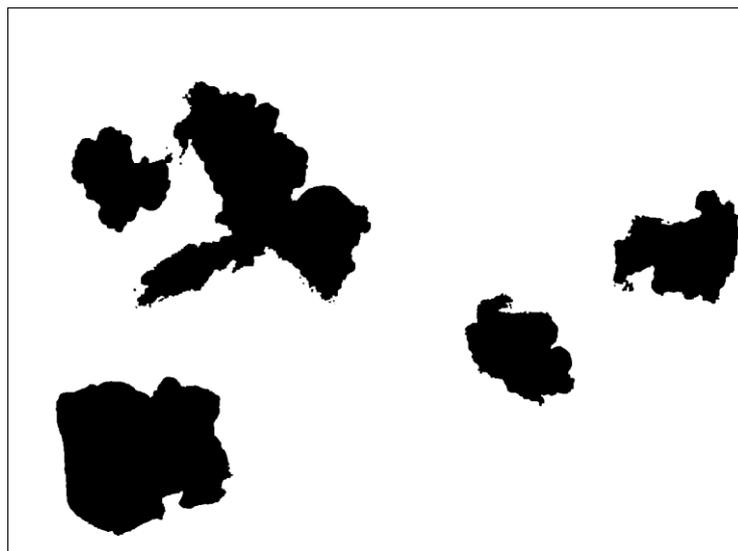


Figura 8: Imagem binarizada e isenta de ruído de fundo de um plano de visão da amostra do dia de operação 85 do reator SBR1 a uma ampliação de 100x.

Por vezes pode ser necessário um tratamento adicional da imagem binarizada, de forma a resolver problemas como a remoção de objetos nas bordas da imagem, remoção de detritos ou a separação de objetos que se sobrepõem. As operações usadas para este propósito incluem operações morfológicas tais como erosão, dilatação, abertura, fecho e transformação de distâncias, enquanto operações de ligação incluem geração de esqueleto (*skeletonisation*), afinamento (*thinning*), espessamento (*thickening*) e divisor de águas (*watershed*) e outros algoritmos avançados (Amaral 2003).

A análise de imagem, propriamente dita, é levada a cabo assim que as imagens finais são obtidas. O tipo de medições determinadas durante a análise de imagem depende do tipo da imagem final e nos dados pretendidos. Em imagens binárias, os parâmetros morfológicos mais comuns são Área, Diâmetro equivalente, Perímetro, Comprimento, Largura, Excentricidade, Fator de forma, Circularidade, Extensão, Convexidade, Grau de Compactação e Solidez entre diversos outros (Amaral 2003).

Para que este processo seja viável, é necessário analisar um grande número de imagens. Porém, a análise de imagem tem como vantagem o requerimento de pouca amostra, não sendo por isso uma técnica que provoque perturbações no funcionamento do reator (Dudley *et al.* 1993). A principal desvantagem é que a aquisição de imagens é um processo demasiado demorado (Amaral *et al.* 2001; Packer e Thomas 1990). É altamente recomendável que as imagens adquiridas contenham o mínimo de ruído de fundo possível, de modo a evitar erros elevados nos resultados

obtidos através do processamento de imagem. Caso o conjunto de imagens de uma determinada amostra não possuam iguais níveis de qualidade aquando da sua aquisição, deverão ser tratadas caso a caso, para assegurar uma correta obtenção dos resultados.

3 Metodologia

3.1 Condições de operação dos reatores anaeróbios

3.1.1 Reator MBBR

A operação do reator MBBR teve como principal objetivo a acidificação em contínuo do efluente simulado (*softdrinks*). Para tal, foi estudado o efeito dos parâmetros de operação alcalinidade e a carga orgânica, por forma a estudar o potencial acidogénico deste tipo de efluente entando maximizar a produção de AOVs.

O reator operou durante 79 dias com cargas orgânicas entre 5 e 8 gCQO/L variando a alcalinidade em duas concentrações: 0 e 2000 mgCaCO₃/L. Foram retiradas um total de 7 amostras à saída do reator para avaliar microbiologicamente este reator, tentando-se abordar os seguintes pontos:

1. Verificar a influência da variação da alcalinidade e da carga orgânica na comunidade microbiológica;
2. Verificar a existência de bactérias metanogénicas através do método direto de microscopia de autofluorescência;
3. Verificar a evolução das características morfológicas dos flocos com as condições de operação do reator.

3.1.2 Reatores Descontínuos

A operação destes reatores foi parte integrante de um trabalho de investigação a decorrer no laboratório.

O efluente de *soft-drink* simulado foi fermentado em condições anaeróbias de forma a estimar o seu potencial acidogénico. A operação dos oito reatores batch teve a duração de 21 dias, tendo sido retiradas apenas duas amostras para observação microscópica: uma no dia 6 de operação e uma no final da experiência. As condições acidogénicas foram aplicadas a várias cargas orgânicas elevadas e ajustando o pH inicial para 6. As lamas inoculadas nos reatores eram provenientes do digestor anaeróbio mesofílico, que trata o excesso de lamas, de uma ETAR municipal. A quantidade de lamas colocadas em cada reator foi calculada de forma a manter uma concentração de SSV em cada reator de aproximadamente 2,5 g/L.

A temperatura foi mantida a 32°C ao longo do ensaio e condições de boa mistura foram asseguradas com o uso de agitadores magnéticos.

O efluente estudado foi preparado misturando dois refrigerantes para simular o efluente real: Coca-Cola (*Sky*), sumo multi-fruta (*Dia*) e água da torneira. Para se obterem as concentrações desejadas, a razão volúmica entre Cola e sumo no efluente foi de 1:2 enquanto a percentagem de água usada variou entre 77% e 94% nos diferentes reatores.

O objetivo da operação dos reatores foi estudar a influência da alcalinidade inicial e da razão F/M na capacidade de produção de AOVs.

Neste trabalho tentaram-se abordar os seguintes aspetos:

1. Verificar a existência de bactérias metanogénicas autofluorescentes através da microscopia;
2. Verificar a influência da variação da alcalinidade e da razão F/M na comunidade microbiológica;
3. Verificar a evolução temporal da formação de diferentes tipos de flocos.

3.2 Condições de operação dos reatores aeróbios

3.2.1 Reatores SBR

A operação dos reatores SBR1 e SBR2 foi feita por Flávio Silva como parte da sua tese de doutoramento em curso e o reator SBR3 foi operado por Fátima Sousa como parte integrante de um projeto de investigação.

As lamas utilizadas nos reatores foram provenientes do sistema de lamas ativadas da SIMRIA Sul. Para os reatores SBR1 e SBR2 foi utilizado soro de queijo acidificado em reator MBBR anaeróbio acidogénico como substrato, tendo sido realizada uma alimentação inicial diferente no reator SBR3. A nova abordagem testada para este reator foi a adaptação da cultura aeróbia ao substrato pretendido, o soro acidificado. Foi testado um decréscimo de AOVs sintéticos na alimentação que se iniciou numa concentração de 100% de AOVs – 0% soro acidificado, seguindo-se para 50% AOVs – 50% de soro acidificado, 30% AOVs – 70% soro acidificado e finalmente 0% AOVs – 100% soro acidificado. A carga orgânica foi mantida a aproximadamente 1,5 gCQO/L.d ao passo que nos reatores anteriores este parâmetro variava consoante a carga orgânica que era obtida no reator MBBR.

Os reatores de 5 L operaram com um TRS de 5 e 10 dias, para um ciclo de operação de 24 horas (30 min para a decantação; 22 min de purga; 22 minutos de alimentação e 22,7 h de reação). Os macronutrientes, fósforo e azoto, são inseridos na alimentação sob a forma de NH_4Cl e KH_2PO_4 . As soluções de micronutrientes e meio mineral utilizados são apresentadas, respetivamente, nas Tabelas 4 e 5.

Tabela 4: Micronutrientes dentro do reator (mg/L)

H_3BO_3	0,3
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,03
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,2
ZnCl_2	0,1
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,05
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,01
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,02
KI	0,03

Tabela 5: Meio mineral dentro do reator (mg/L)

MgSO ₄ .7H ₂ O	100
EDTA	3
CaCl ₂ .H ₂ O	50
n-Alitiourea (inibidor da nitrificação)	20
FeCl ₃ .6H ₂ O	2

O objetivo da operação destes reator foi efetuar uma seleção de culturas que acumulassem o máximo de PHA sob as condições de operação que lhe foram impostas dentro do reator.

As amostras para análise microscópica foram retiradas entre as 11h e as 13h, antes da subida do nível de oxigénio dentro do reator, de forma a assegurar a visualização da quantidade máxima do biopolímero (PHA) acumulado pelos microrganismos.

A análise microscópica das amostras dos reator teve como principais objetivos a abordagem dos seguintes aspetos:

1. Verificar a evolução e caracterizar a formação de flocos ao longo do tempo;
2. Verificar a evolução do número e variedade dos indivíduos e grupos de protozoários existentes nas amostras recolhidas;
3. Verificar a evolução da acumulação de grânulos de PHA em organismos produtores a serem selecionados no reator.

3.3 Análises físico-químicas

3.3.1.1 Determinação de sólidos

Os métodos utilizados para a determinação dos sólidos suspensos totais (SST) e sólidos suspensos voláteis (SSV) foram adaptados dos métodos descritos nos protocolos 2540 B e E, respetivamente, do manual Standard Methods (APHA 1998).

Inicialmente procedeu-se à calcinação dos cadinhos com filtro durante 60min numa mufla a 550°C, arrefecendo-os de seguida num exsiccador. A filtração da amostra foi efetuada os filtros previamente calcinados e pesados ($m_{\text{cadinho+filtro}}$). Para o cálculo dos sólidos suspensos foram colocados os filtros com sólidos na estufa, durante aproximadamente 24h a 105°C. Após arrefecimento os cadinhos são pesados novamente ($m_{\text{cadinho+filtro+amostra seca}}$) e posteriormente são colocados na mufla a 550°C durante 2h. Após arrefecerem são novamente pesados ($m_{\text{cadinho+filtro+amostra calcinada}}$).

Para a determinação dos SST e SSV foram utilizadas as seguintes fórmulas:

$$SST (mg/L) = \frac{m_{\text{cadinho+filtro+amostra seca}} (mg) - m_{\text{cadinho+filtro}} (mg)}{V_{\text{amostra}} (L)} \quad [1]$$

$$SSV (mg/L) = \frac{m_{\text{cadinho+filtro+amostra calcinada}} (mg) - m_{\text{cadinho+filtro+amostra seca}} (mg)}{V_{\text{amostra}} (L)} \quad [2]$$

3.3.1.2 Determinação de CQO

Para a determinação do CQO foram preparados tubos de digestão contendo 1,5ml de solução de dicromato de potássio e 2,5ml de ácido sulfúrico com sulfato de prata agitando depois de adicionados os reagentes. Foram adicionados 2,5ml de amostra fresca, previamente filtrada, agitando de seguida. O branco foi preparado juntando 2,5ml de água destilada aos tubos de digestão, seguindo os mesmos procedimentos.

Os tubos foram digeridos a 150°C durante 2h. Depois de arrefecidos, foi medida a absorvância num espectrofotómetro Aqualytic, modelo PC023212. Os valores obtidos dessa medição correspondem ao CQO, em mg/L.

3.3.1.3 Determinação de ácidos orgânicos voláteis (AOVs)

A concentração de AOVs foi determinada por cromatografia gasosa. As amostras filtradas foram analisadas num cromatógrafo Chrompack modelo CP9001, equipado com detector FID (*Flame Ionization Detector*) a 300°C. Foi usada uma coluna CP-sil 5-CB (25m x 0,53mm x 5µm), o injetor encontrava-se a 270°C e foi usado azoto como gás de arraste para as análises de AOV.

3.4 Métodos clássicos de microscopia para a observação e identificação de microrganismos

3.4.1 Observação microscópica

A morfologia e atividade dos microrganismos foram observadas usando filtros de contraste de fase do microscópio Carl Zeiss Axio Imager A.2 acoplado a uma câmara Carl Zeiss AxioCam MRm. Também está ligada ao sistema uma câmara de fluorescência Zeiss HXP 120 C. As lentes objetivas utilizadas para a observação das amostras possuem ampliações de 10x, 40x e 100x. A lente ocular tem uma ampliação associada de 10x. As imagens foram adquiridas em formato digital através do programa de software AxioVision. A análise e o processamento das imagens foram efetuados com o programa ImageJ.

3.4.2 Amostragem e observação direta da amostra

Aplicaram-se métodos clássicos de análise e classificação dos agregados microbianos e de protozoários, tendo por base características morfológicas e de locomoção, sendo a última apenas aplicável no caso dos protozoários. Todas as amostras foram visualizadas em contraste de fase sem qualquer tipo de tratamento prévio, com exceção das amostras usadas para verificação da existência de EPS. Apenas foram analisadas amostras de lamas frescas, num espaço de tempo inferior a 1 hora após a sua recolha, pelo que não foram utilizados quaisquer procedimentos de conservação das mesmas. O volume de amostragem utilizado para a observação direta foi sempre de 20µl, e para a visualização da fluorescência dos grânulos de PHA foi de 1ml, conforme descrito no ponto 3.2.10.

A amostra é montada no microscópio e a sua observação da mesma é efetuada com a objetiva de menor ampliação (10x). A imagem observada é 100 vezes maior que a da amostra a olho nu, já que se multiplica a ampliação fornecida pela objetiva pela fornecida pela lente ocular. Neste trabalho foram usados os termos “100x”, “400x” e “1000x” para descrever a ampliação total a que está a ser observada a amostra.

É também possível efetuar-se a observação da amostra em campo claro, sendo possível visualizar a sua verdadeira cor, mas sendo impossível visualizar certos componentes das células dos microrganismos. Tendo em conta que esta característica organolética não é de especial importância no âmbito da determinação das condições gerais das lamas nem da comunidade microbiana presente, as amostras foram sempre observadas em contraste de fase, como já foi referido anteriormente.

A observação microscópica direta da amostra fresca tem como principais objetivos analisar a morfologia dos agregados microbianos (Figura 9), efetuar a contagem e identificação dos protozoários existentes na amostra (ponto 3.2.7) e registar qualquer tipo de problema ou condição fora do normal no reator.

Foram efetuadas, para os reatores estudados, duas a três réplicas de cada amostra retirada em cada dia de operação dos reatores. Apenas foi retirada uma amostra por dia para cada reator.

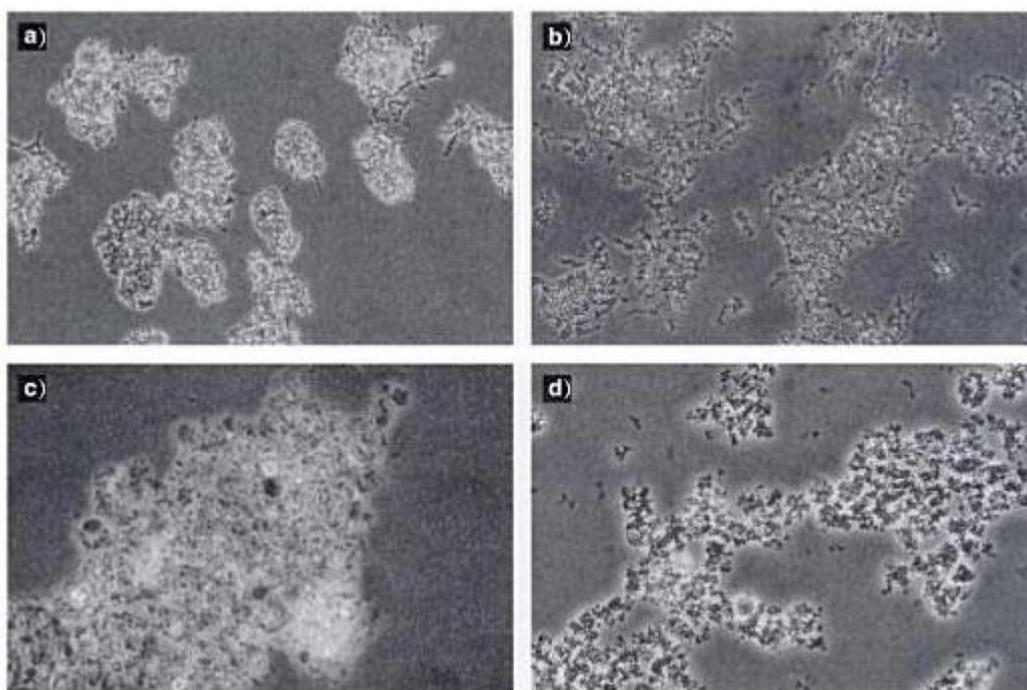


Figura 9: Características de flocos em contraste de fase: a) compacto (100x), b) difuso (100x), c) firme (1000x), d) fraco (1000x). Adaptado de Jenkins *et al.* (1993).

3.4.3 Observação de fluorescência metanogénica

A presença do co-fator F_{420} confere às bactérias metanogénicas a capacidade específica de autofluorescência quando excitadas a um comprimento de onda de 420nm. O F_{420} é encontrado noutras bactérias, tais como *Streptomyces*, mas a níveis muito inferiores àqueles encontrados em bactérias metanogénicas (Daniels 1991). Portanto, na prática, é possível usar a autofluorescência para diferenciar bactérias metanogénicas das não metanogénicas (Vogels *et al.* 1988).

A fluorescência emitida pelas bactérias metanogénicas, é identificada a 470 nm por uma cor azul. Não é necessária qualquer preparação prévia da amostra para possibilitar a visualização da fluorescência destas bactérias, aplicando-se o método clássico de montagem da amostra na lâmina.

3.4.4 Contagem e classificação da microfauna

Foi utilizado um método direto de contagem dos microrganismos, nomeadamente protozoários, presentes nas amostras dos reatores aeróbios. Foi efetuada uma leitura por toda a área da lamela conforme indicado na Figura 10. Nas amostras em que foi verificado um número excessivo de protozoários por plano de visão, foram selecionados aleatoriamente 10 planos de visão e foram contabilizados os protozoários presentes nos mesmos. Posteriormente foi efetuada uma média desse valor e o resultado foi multiplicado pelo número total de campos de visão, que varia consoante as dimensões da lamela utilizada.

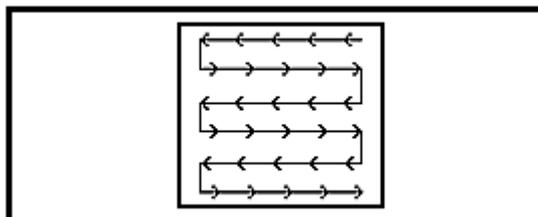


Figura 10: Método de contagem dos microrganismos presentes na amostra.

Foram utilizados dois tamanhos de lamelas: 24 x 32 mm, com 140 planos de visão e 22 x 22 mm, com 100 planos de visão. A utilização de lamelas de dimensões mais pequenas é preferível, pois a rápida evaporação da amostra é favorecida em lamelas de maiores dimensões.

O número total de protozoários por litro foi determinado com a seguinte fórmula:

$$\text{Número de protozoários /L} = \frac{\text{Número de protozoários} \times 10^6 \mu\text{l}}{20\mu\text{l} \times 1\text{L}} \quad [3]$$

A microfauna foi classificada nos diferentes grupos: ciliados móveis de fundo; ciliados nadadores; ciliados sésseis; *Opercularia* spp.; *Vorticella microstoma*; e pequenos flagelados. A identificação das diferentes espécies foi conseguida através das chaves dicotômicas estabelecidas por E.M. Savior *et al.*(1997).

3.4.5 Índice biótico de lamas (Sludge Biotic Index - SBI)

O cálculo do índice biótico de lamas tem como base o método desenvolvido por Madoni (1994^a). O método baseia-se na abundância e na diversidade específica da comunidade e nas diferentes sensibilidades exibidas por alguns grupos de microfauna aos fatores físico-químicos prevalentes no sistema, servindo para estudar a comunidade microbiana.

Este método foi testado nesse estudo em quarenta e cinco estações de tratamento biológico de águas residuais por lamas ativadas durante o período de um ano e a microfauna utilizada neste Índice tem uma distribuição mundial, permitindo a sua utilização em estações de tratamento biológico de águas residuais por lamas ativadas de diferentes áreas geográficas.

Uma das vantagens do SBI assenta na utilização de valores numéricos, permitindo a comparação da qualidade biológica das lamas no tanque de arejamento e consequentemente a qualidade das condições de funcionamento da estação em causa. É de salientar, no entanto, que este método é apenas aplicável ao nível dos tanques de arejamento (reatores biológicos), não sendo aplicável nos tanques de sedimentação secundários, mesmo que nestes ocorram problemas que possam interferir com a estrutura dos agregados microbiológicos (Madoni 1994^b).

- **Método adaptado de Madoni (1996)**

1. Colocar 20 µl de amostra fresca numa lâmina;
2. Efetuar a montagem com uma lamela de forma a evitar a formação de bolhas de ar;

3. Proceder à quantificação e identificação das espécies de protozoários observadas conforme descrito em 3.2.7.

- **Cálculo do SBI**

O índice biótico do processo de lamas ativadas é atribuído mediante o uso de uma tabela de duas entradas (Tabela 6). A entrada vertical é efetuada tendo em conta a riqueza da microfauna da amostra, em termos de números de espécies identificadas excluindo os pequenos flagelados e o número de pequenos flagelados contados na diagonal numa câmara de Fuchs-Rosenthal. Na linha horizontal estão apresentados quatro grupos distintos de microfauna (consoante a abundância do número de espécies, S) associados a uma decrescente qualidade biológica das lamas. A entrada horizontal tem em conta o grupo dominante no tanque de arejamento, assim como a densidade da microfauna, medida como número/L dos microrganismos presentes no mesmo. Se dois ou mais grupos partilharem a dominância, opta-se por aquele que ocupa a posição mais baixa na tabela (Madoni 1994^b).

Tabela 6: Tabela de duas entradas para o cálculo do SBI (S - nº de espécies de microfauna excetuando os pequenos flagelados; F - nº de pequenos flagelados contados na câmara de Fuchs-Rosenthal.

Adaptado de Madoni (1996).

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

* *Opercularia* spp. e *Vorticella microstoma* não dominantes.

Através da intersecção das entradas vertical e horizontal é possível então obter o valor do SBI, que está compreendido entre 0 e 10, e que posteriormente é usado para determinar a classe de funcionamento em que se inserem as lamas biológicas em questão.

Tabela 7: Conversão do valor do SBI em classes indicadoras da capacidade depuradora das lamas.
Adpatado de Madoni (2006).

<i>Valor SBI</i>	<i>Classe</i>	<i>Avaliação</i>
8 – 10	I	Lamas bem colonizadas e estáveis; atividade biológica ótima; elevada eficiência depuradora
6 – 7	II	Lamas bem colonizadas e estáveis; atividade sub-ótimal; eficiência depuradora suficiente
4 – 5	III	Atividade biológica insuficiente; eficiência depuradora medíocre
0 – 3	IV	Atividade biológica muito baixa; eficiência depuradora baixa

3.4.6 Coloração negativa para a determinação de EPS

A visualização de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) que envolvem as colônias microbianas, denominadas de flocos, é possível através da coloração negativa da amostra. Como são impermeáveis, as EPS impedem a entrada de tinta corante nas células (Sheng *et al.* 2008), tornando possível a visualização dessas substâncias em torno dos flocos, como se pode ver na Figura 11.

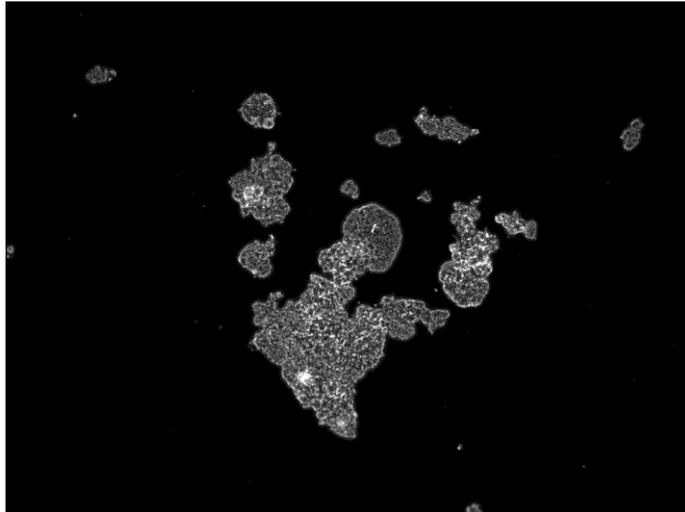


Figura 11: Determinação de EPS ao microscópio. Amostra do dia 16 de operação do reator SBR1 a uma ampliação de 100x.

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

Reagente

Tinta-da-China (suspensão aquosa de partículas pretas de carbono)

Procedimento

1. Misturar uma gota de tinta e 20 μ l de amostra numa lâmina.
2. Colocar uma lamela por cima e observar a 100x usando contraste de fase.
3. Em lamas ativadas “normais” as partículas da tinta penetram os flocos quase por completo, deixando o centro livre de tinta.
4. Em lamas ativadas que contenham muito EPS, observar-se-ão grandes áreas claras, contendo uma baixa densidade de células.

3.4.7 Coloração para a visualização de PHA

Para se visualizar o PHA, colorações de Azul de Nilo e de Negro do Sudão podem ser usadas (Murray 1994; Ostle e Holt 1982). O Azul de Nilo é um método mais específico e sensível de visualização de grânulos de PHA através da detecção da resposta de fluorescência que aumenta com o aumento da concentração de PHA e portanto pode ser usado para avaliar a variação da quantidade acumulada de PHA durante experiências de acumulação anaeróbias/aeróbias (Hui 2005).

Como os grânulos de PHA emitem uma forte fluorescência de cor vermelha quando corados com Azul de Nilo, fazem com que os organismos produtores de PHA sejam facilmente identificáveis quando expostos a este corante (Oshiki *et al.* 2010).

Método adaptado de Jenkins *et al.* (2004):

Reagentes

Solução 1 – Azul do Nilo

Solução 2 – NaCl, 0,9% w/v solução aquosa

Solução 3 – CH₃CO₂H, 8% v/v solução aquosa

Procedimento

1. Colocar cerca de 1 ml da cultura fresca num tubo eppendorf;
2. Adicionar 5 µl de Azul do Nilo;
3. Colocar na estufa a 55 °C durante 10 min;
4. Centrifugar abaixo de 5000 rpm durante 5 min,;
5. Deitar fora o sobrenadante;
6. Ressuspender em 1 ml de NaCl a 0,9%;
7. Centrifugar abaixo de 5000 rpm durante 5 min;
8. Deitar fora o sobrenadante;

9. Ressuspender em 2 ml de ácido acético a 8%;
10. Agitar durante 1 min num vortéx;
11. Centrifugar abaixo de 5000 rpm durante 5min;
12. Deitar fora o sobrenadante;
13. Ressuspender em 500 μ l de NaCl a 0,9%.

3.5 Análise e processamento de imagem

A aquisição das imagens dos agregados microbianos e da intensidade de fluorescência foi conseguida através de contraste de fase no microscópio Carl Zeiss Axio Imager A.2 com uma ampliação de 100x e da câmara AxioCam MRm acoplada ao mesmo. As imagens foram gravadas em formato TIFF em escala de cinza (8-bits). A aquisição das imagens foi obtida em três passagens pela lâmina conforme ilustrado na Figura 12. Cada imagem foi devidamente focada de modo a possibilitar a visualização definida das bordas de cada floco.

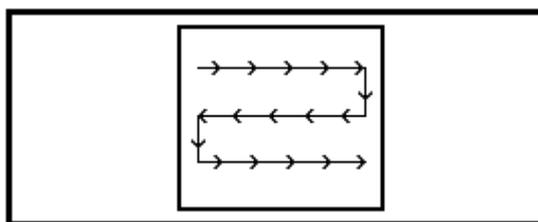


Figura 12: Método de aquisição de imagens em cada lâmina.

O método de análise e processamento das imagens captadas foi conseguido através do desenvolvimento de programas específicos (*macros*) em ImageJ, que se trata de um software gratuito que pode ser usado para estabelecer métodos objetivos, rápidos, facilmente reproduzíveis, pouco dispendiosos e automáticos de análise e processamento de imagem.

3.5.1 Desenvolvimento de *macros* para a análise de agregados microbianos

O método para a análise e processamento das imagens obtidas através de microscopia ótica dos agregados microbianos consistiu nas seguintes etapas:

1. Definições de processamento e calibração

O primeiro passo consiste na identificação do tipo de processamento de imagem: uma a uma ou um conjunto de imagens. De seguida são escolhidos os parâmetros pretendidos. No caso da análise dos flocos os parâmetros escolhidos são: a área média dos flocos; a percentagem de área ocupada pelos flocos; a circularidade dos flocos; e a solidez dos flocos. Os valores de solidez e circularidade variam entre 0 e 1. No caso da solidez, o valor 1 traduz-se num flocos com a capacidade de ocupar o menor espaço possível numa imagem, já para a circularidade significa que o flocos teria a forma de um círculo perfeito.

É efetuada a calibração das unidades de medida, na qual 1 μm corresponde a 0,67 píxeis, no caso das imagens com uma ampliação de 100x adquiridas através do microscópio utilizado neste estudo. Para imagens adquiridas com outras ampliações ou através de outros microscópios, a calibração das unidades terá de ser revista e adaptada para o tipo de imagens em questão. Os agregados foram divididos em três classes diferentes de acordo com o seu tamanho médio. Segundo Jenkins *et al.* (2004), flocos pequenos têm diâmetros inferiores ou iguais a 150 μm ; flocos médios têm um diâmetro compreendido entre 150 μm e 500 μm ; e os flocos grandes possuem diâmetros superiores a 500 μm . Neste estudo optou-se por denominar os flocos de pequenas dimensões de microflocos, os de médias dimensões de mesoflocos e os de grandes dimensões de macroflocos. A Figura 13 ilustra os diferentes tipos de flocos observados. O tamanho dos agregados é convertido seguidamente em píxeis, como indicado na Tabela 8, para que os valores possam ser introduzidos no *software* ImageJ para a análise dimensional dos flocos.

Tabela 8: Atribuição de valores pixel às gamas de diâmetros dos flocos.

<i>Flocos</i>	<i>Diâmetro (μm)</i>	<i>Píxeis</i>
Microflocos	≤ 150	500 - 17671
Mesoflocos	150 - 500	17672-196350
Macroflocos	≥ 500	> 196350

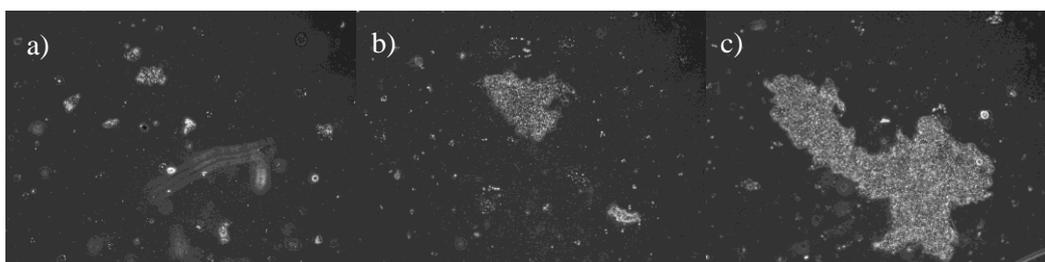


Figura 13: Imagens adquiridas da amostra do dia de operação 21 do reator SBR3.

a) Microflocos; b) Mesofloco; c) Macrofloco.

2. Pré-Tratamento

O pré-tratamento consiste em minimizar ou mesmo eliminar o ruído de fundo da imagem. Primeiro é realizada uma equalização de histograma de modo a melhorar o contraste da imagem e de seguida é aplicado um filtro gaussiano com o objetivo de suavizar a imagem, fazendo com que algum do ruído de fundo se torne menos pronunciado.

3. Segmentação

A segmentação é conseguida através da definição de um valor de “threshold” de 127, resultando desta operação uma imagem binária, na qual é atribuída a cor branca ao fundo e a cor preta aos objetos. Aquando da segmentação são realizadas operações de dilatação, fecho e enchimento de forma a obter uma imagem com os objetos de interesse devidamente evidenciados.

4. Determinação dos parâmetros morfológicos

São determinados os parâmetros referidos no ponto 1.

5. Registo dos resultados

O passo final consiste na transferência dos valores dos parâmetros morfológicos para uma folha de Excel e em salvar as imagens binárias em formato TIFF.

Na Figura 14 está representado o processo de tratamento de imagem por passos, efetuados pela *macro* desenvolvida em ImageJ.

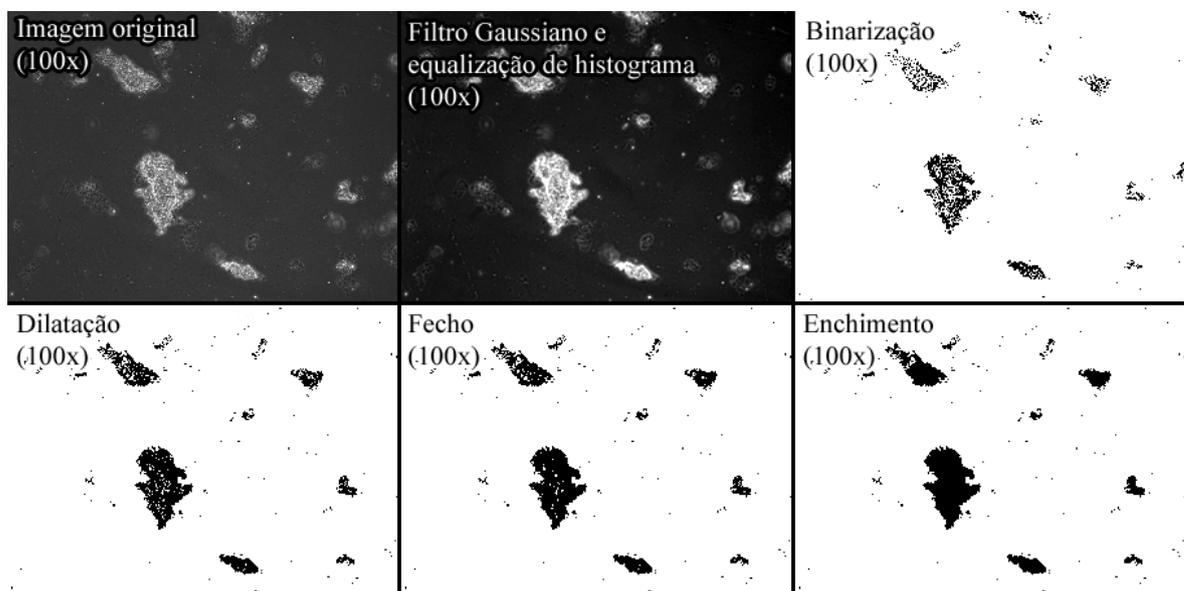


Figura 14: Processo de tratamento de imagem utilizado neste estudo.

3.5.2 Intensidade de fluorescência

O método aplicado na análise e processamento das imagens de fluorescência, para determinação da intensidade da fluorescência, foi baseado no método desenvolvido por Burgess (2010) em ImageJ. Este método apenas pode ser utilizado após a amostra ter sido corada com Azul de Nilo, conforme descrito no ponto 3.2.10. Embora o método não tenha sido inicialmente desenvolvido para agregados microbianos achou-se pertinente utilizá-lo para a determinação da fluorescência emitida. O tratamento de imagem, segundo este método, resume-se, essencialmente, à

determinação de diferenças entre diferentes níveis de cinzento na imagem, pelo que pode ser aplicado a diferentes tipos de células, ou, neste caso, a agregados microbianos fluorescentes.

Foi tido o cuidado de adquirir imagens de flocos que não exibissem uma profundidade muito acentuada, de forma a evitar calcular erroneamente as intensidades de fluorescência, assim como permitir uma comparação viável das diferentes intensidades determinadas entre flocos de diferentes dias de operação.

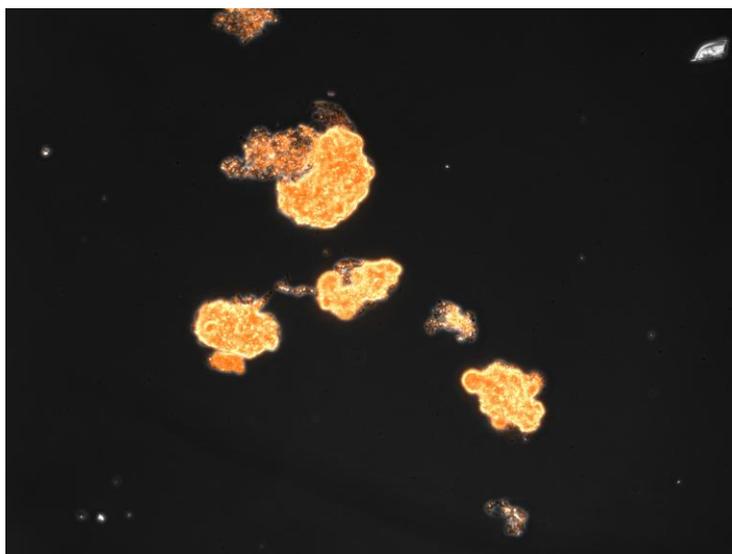


Figura 15: Imagem observada da fluorescência emitida por flocos corados com Azul de Nilo da amostra do dia de operação 85 do reator SBR1. Ampliação a 100x.

O método de medição da intensidade de fluorescência consiste nos seguintes passos:

1. Determinação da região de interesse

Este passo consiste na seleção de toda a área do floco que exhibe fluorescência com a ferramenta de seleção do ImageJ.

2. Seleção e determinação dos parâmetros

São selecionados os parâmetros Área, Densidade Integrada e “Mean Grey Value” e efetuar a medição dos mesmos. Este passo deve ser efetuado para todos os flocos a analisar na imagem. Os resultados são transferidos para uma folha de cálculo do Excel.

3. Medições de fundo

É efetuada uma medição da área do fundo da imagem nas imediações do floco previamente analisado, para que posteriormente seja possível subtrair esse valor ao da fluorescência exibida pelo floco, obtendo desta forma o valor da fluorescência corrigida. Os valores são transferidos para uma folha de cálculo do Excel.

4. Cálculo da intensidade da fluorescência

O último passo deste método é o cálculo da intensidade de fluorescência corrigida, dada pela seguinte fórmula:

$$\begin{aligned} & \textit{Intensidade de Fluorescência} \\ & = \textit{Densidade integrada} - (\textit{Área de seleção do floco} \\ & \times \textit{média das leituras de fluorescência de fundo}) \end{aligned} \quad [4]$$

Com vista a facilitar a compreensão dos resultados, é sugerida a apresentação dos mesmos sob a forma de gráficos de barras.

3.6 Análise de correlação

3.6.1 Coeficiente de correlação linear de Pearson

O coeficiente de correlação linear, também chamado de covariância normalizada e representado por ρ , é expresso por:

$$\rho_{X,Y} = \frac{\sigma_{X,Y}}{\sigma_X * \sigma_Y} \quad [5]$$

onde $\sigma_{X,Y}$ é covariância entre variáveis X e Y ; σ_X e σ_Y são os desvios-padrão das variáveis X e Y , respetivamente.

A covariância pode ser estimada pela equação 6 e representa uma medida possível do grau e do sinal de correlação.

$$S_{X,Y} = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{n - 1} \quad [6]$$

onde $S_{X,Y}$ é a covariância amostral entre as variáveis X e Y ; \bar{x} e \bar{y} são as médias aritméticas de cada uma das variáveis; n é o tamanho da amostra; x_i e y_i são as observações simultâneas das variáveis.

No entanto, admitindo-se que as distribuições das variáveis X e Y são normais, torna-se conveniente utilizar, como medida de correlação, o coeficiente de correlação de Pearson, sendo apresentado o seu estimador na equação 7.

$$r = \frac{S_{X,Y}}{S_X S_Y} \quad [7]$$

onde r é o coeficiente de correlação linear ($-1 \leq r \leq 1$); $S_{X,Y}$ é covariância entre as variáveis; S_X e S_Y são os desvios-padrão das amostras calculados pelas seguintes equações:

$$S_X = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad [8]$$

$$S_Y = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}{n - 1}} \quad [9]$$

O coeficiente de correlação de Pearson é adimensional e varia entre -1 e 1. Caso os dados se alinhem perfeitamente ao longo de uma reta com declive positivo, tem-se uma correlação linear positiva perfeita, que corresponde ao valor de coeficiente de correlação de Pearson igual a 1. O significado de valores intermediários é facilmente percebido (Naghetini e Pinto 2007).

As relações entre as variáveis estudadas foram classificadas da seguinte forma: para valores do coeficiente de correlação de 0,20 até 0,39 a relação é fraca; para valores de 0,40 até 0,69 é moderada; e de 0,70 até 1 é considerada forte. A mesma classificação é válida para os valores negativos correspondentes.

4 Resultados e Discussão

4.1 Resultados dos reatores anaeróbios

4.1.1 MBBR

O reator MBBR analisado é um reator acidogénico anaeróbio que funcionou em modo contínuo durante 61 dias. De modo a avaliar a evolução da população microbiológica foram retiradas 7 amostras à saída do reator.

Ao longo da experiência foram obtidos os valores dos seguintes parâmetros físico-químicos de funcionamento do reator MBBR: concentrações de entrada e saída do CQO solúvel; carga orgânica alimentada ao reator; e concentração de ácidos orgânicos voláteis totais (TAOVs).

Para as análises microscópicas foram recolhidas amostras para a obtenção dos seguintes parâmetros biológicos: número de flocos; área média dos flocos; percentagem de área ocupada pelos flocos; solidez e circularidade dos flocos. Foi ainda efetuada uma monitorização da presença de bactérias metanogénicas através da observação da sua autofluorescência ao microscópio. Não foram identificadas intensidades de fluorescência significativas ao longo de todo o ensaio, pelo que se pode concluir que os reatores funcionaram conforme o pretendido.

4.1.1.1 Análise físico-química do funcionamento do reator

Os parâmetros físico-químicos seguintes foram obtidos durante a operação do reator MBBR de acidificação do efluente simulado denominado *softdrink*, em colaboração com um projeto de investigação. Na Figuras 16 está representada a evolução ao longo do tempo das concentrações de entrada e saída do CQO solúvel do reator.

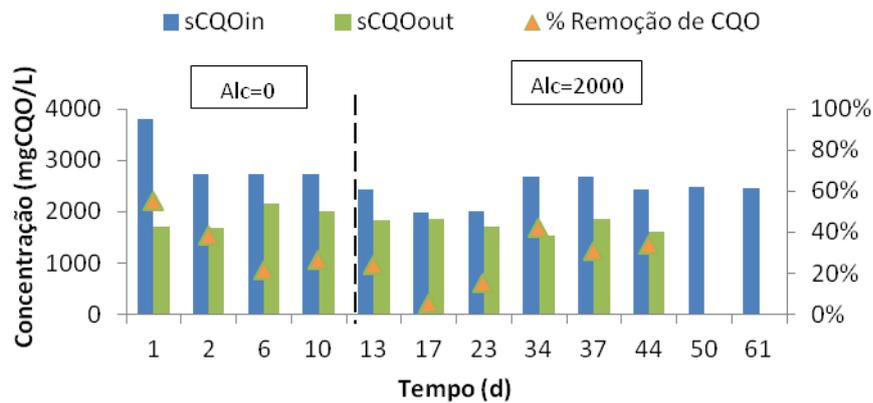


Figura 16: Evolução da concentração e remoção de CQO ao longo do tempo.

É possível verificar pela Figura 16 que os valores do CQO de alimentação variaram entre 2000 e 4000 mgCQO/L, com um valor médio de 2650 mgCQO/L. O CQO de saída variou entre 1500 e 2000 mgCQO/L, com um valor médio de 1780 mgCQO/L, que se traduziu numa percentagem de remoção de CQO média de 30%. Os valores de CQO à saída das amostras dos dias 50 e 61 não foram determinados.

A carga orgânica durante a operação do reator foi mantida próxima de 5gCQO/L.d, como se pode verificar na Figura 17. As variações nos valores da carga orgânica aplicada podem explicar as variações dos valores de remoção de CQO no reator. Há estudos (Aygun *et al.* 2008; Jing *et al.* 2009) que demonstram que cargas orgânicas mais elevadas contribuem, geralmente, para uma redução na eficiência de remoção de CQO em reatores MBBR.

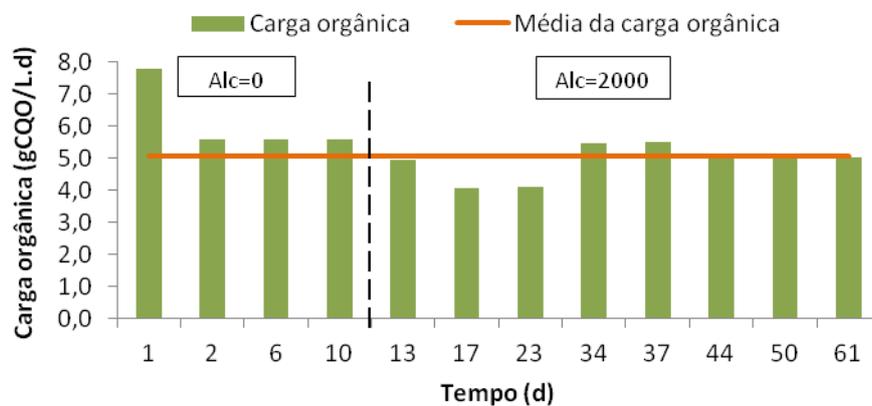


Figura 17: Variação da carga orgânica ao longo do tempo.

Na Figura 17 é possível observar que para os dias 17 e 23 de operação do reator a carga orgânica é inferior mas a percentagem de remoção de CQO mantém-se elevada, como explicado anteriormente.

Na Figura 18 estão representados o pH e a concentração total de AOVs ao longo do tempo de operação do reator, a diferentes alcalinidades. É possível observar que nos dias em que a remoção de CQO foi mais elevada (dias 17 e 23), as concentrações de AOVs obtidas são também elevadas.

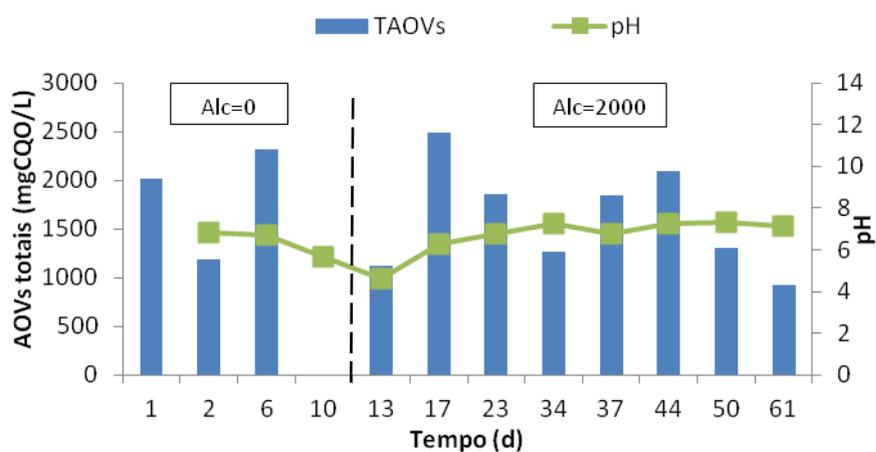


Figura 18: Concentração total de AOVs e evolução do pH no reator ao longo do tempo.

Na Figura 18 é possível verificar também que pouco após a alteração da alcalinidade alimentada ao sistema ocorre uma diminuição brusca da produção de AOVs. No entanto, há um aumento significativo no dia 17 de operação, apresentando nos dias seguintes uma tendência para estabilizar. Observou-se uma maior produção de AOVs neste reator quando os valores de pH se situaram entre 6 e 7, nas duas alcalinidades estudadas.

4.1.1.2 Análise dos agregados microbianos presentes no reator

No decorrer da operação deste reator estudou-se a evolução das características morfológicas dos agregados microbianos assim como dos parâmetros biológicos mencionados anteriormente, para ambos os períodos de operação do reator MBBR.

i) Número dos flocos

Foram identificadas três classes de flocos com tamanhos diferentes nas amostras retiradas à saída do reator MBBR. É apresentado na Figura 19 o número de flocos por litro, por cada classe de tamanho, para cada amostra analisada.

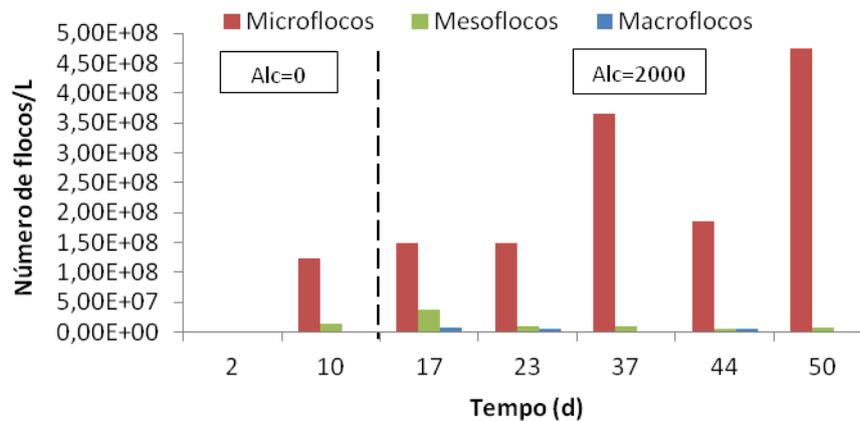


Figura 19: Número de flocos por classe ao longo do estudo.

No segundo dia de operação do reator não foram observadas quaisquer estruturas semelhantes a flocos no reator, sendo apenas visíveis bactérias suspensas no meio. Provavelmente as condições impostas ao reator não eram as mais favoráveis para a formação de flocos.

Ao longo da experiência é possível observar uma relação entre a quantidade de microflocos observados à saída do reator e a produção de AOVs (Figura 18). Aparenta haver uma relação inversamente correlacionada entre os parâmetros, isto é, a produção de AOVs é menor quando a quantidade de flocos de pequenas dimensões observada à saída do reator é maior. Isto verifica-se comparando os dias de operação 37, 44 e 50 das Figuras 18 e 19. Uma explicação para o sucedido poderá ser o facto de se ter observado um decréscimo na produção de AOVs quando existia menos biomassa dentro do reator, traduzido pelo maior número de flocos observados ao microscópio à saída do mesmo. Quando se observaram menos flocos à saída do reator, havendo assim uma maior quantidade de biomassa dentro do reator, observou-se também um aumento na produção de AOVs, apoiando a hipótese referida.

ii) Percentagem de área ocupada pelos flocos

Na Figura 20 está representada a percentagem de área de cada classe de flocos ao longo do tempo de operação do reator MBBR.

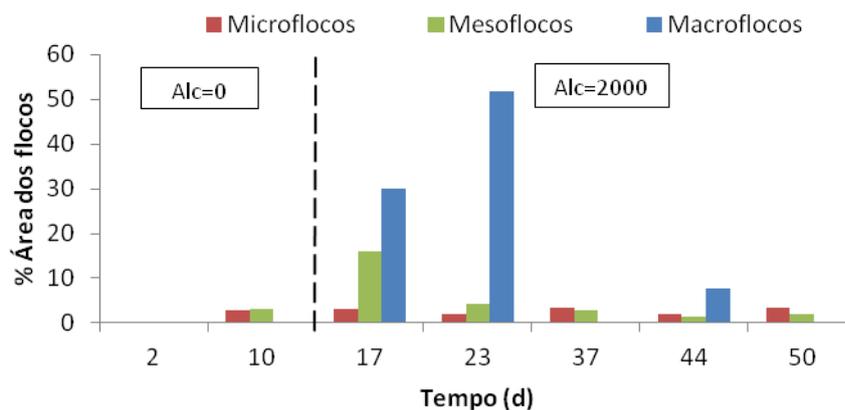


Figura 20: Percentagem de área dos flocos.

A percentagem de área ocupada pelos flocos de menores dimensões (microflocos) manteve-se praticamente constante ao longo do tempo, variando apenas entre 2% e 4%. Também se verifica este tipo de evolução para os mesoflocos, com exceção do valor do dia 17 de operação, em que a percentagem de área atingiu cerca de 15%. A percentagem de área ocupada pelos macroflocos foi superior, comparando com as restantes classes, para os dias em que estes estiveram presentes no reator.

Nos dias 17 e 23 observou-se uma maior percentagem de área ocupada pelos macroflocos, coincidindo com a alteração da alcalinidade no reator. Neste período de tempo também se observou uma produção de AOVs mais elevada (Figura 18). A posterior diminuição da área ocupada pelos macroflocos, aparentemente não afetou a quantidade de biomassa no reator, no entanto proporcionou informação de que as lamas estavam bem formadas e sem problemas de agregação potenciando a formação de AOVs.

iii) Morfologia dos flocos

Foi possível verificar através de observação microscópica das amostras de saída do reator MBBR4 a existência de dois tipos distintos de flocos em dias de operação distintos: flocos fracos, difusos e irregulares nos dias 10, 37 e 50 de operação; e flocos compactos, firmes e irregulares nos dias 17, 23 e 44, que foi quando se observaram macroflocos nas amostras.

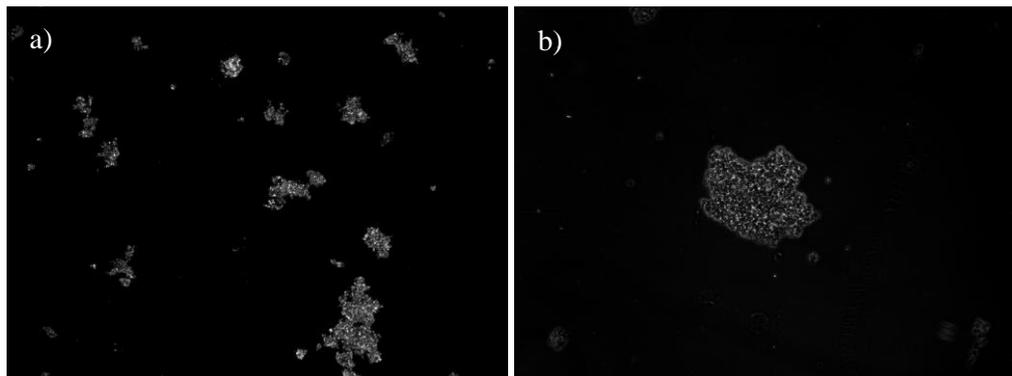


Figura 21: Diferenças entre a morfologia dos flocos: a) no dia 10 de operação; b) no dia 23 de operação. Ampliações a 100x.

A solidez determina a capacidade do floco ocupar o mínimo de espaço possível na imagem (Amaral 2003) e a circularidade determina a irregularidade das bordas do floco. Valores mais elevados de ambos os parâmetros indicam flocos mais compactos e de forma aproximadamente redonda. Nas Figuras 21 e 22 são apresentados os resultados referentes a estes parâmetros.

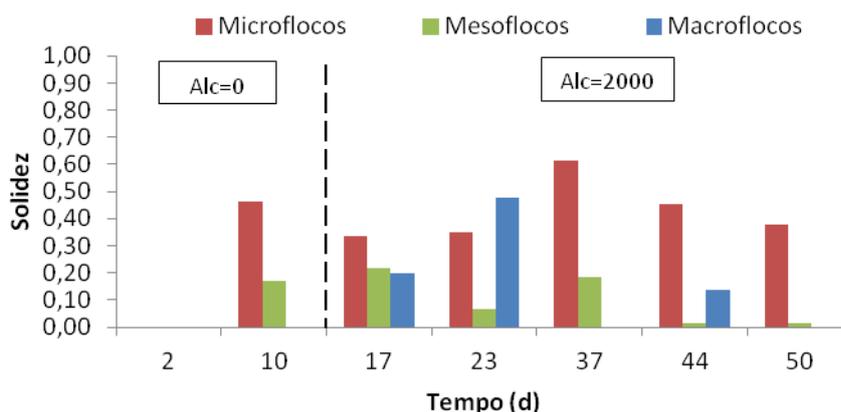


Figura 22: Solidez dos flocos.

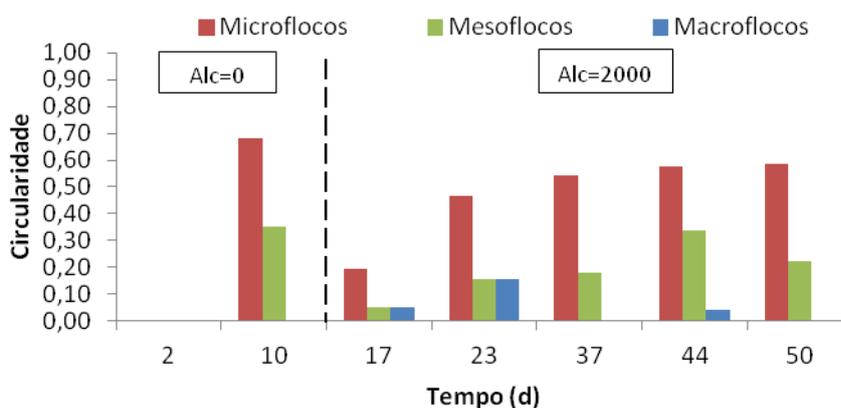


Figura 23: Circularidade dos flocos.

Os valores de solidez variaram ao longo do ensaio, o que indica uma mudança na capacidade de compactação dos flocos ao longo do tempo, revelando flocos com estruturas propensas a possuir aberturas no seu interior, tornando-se, conseqüentemente, mais frágeis. Isto pode contribuir para um maior número de matéria em suspensão e levar à saída de biomassa do interior do reator, o que efetivamente se verificou ao longo do ensaio. Os flocos de menores dimensões apresentaram, no geral, uma capacidade de compactação ligeiramente superior à das restantes classes de flocos, pois apresentam valores mais elevados da solidez. Para os microflocos os valores rondaram os 0,40, sendo que os mesoflocos adquiriram valores de aproximadamente 0,2.

Observando os valores de circularidade obtidos para os microflocos (sempre mais elevados, que para as restantes classes) verificou-se que este tipo de flocos apresentaram bordas mais

regulares que os mesoflocos e macroflocos ao longo do ensaio. Os valores de circularidade dos microflocos rondaram os 0,50; dos mesoflocos os valores médios de circularidade rondaram os 0,20; e os dos macroflocos apresentaram em todo o ensaio bordas mais irregulares, com um valor de circularidade médio de 0,10.

Os microflocos foram o tipo de flocos que se observou em maior quantidade nas amostras de saída do reator, isto porque sendo mais compactos e possuindo superfícies mais lisas que as restantes classes de flocos, são menos propensos a agregar-se ao resto da biomassa e são mais facilmente escoados para fora do reator.

4.1.1.3 Análise global do funcionamento do reator

1. Verificar a presença de bactérias metanogénicas através do método direto de microscopia de autofluorescência e correlacioná-la com as condições de operação do reator:

Em todas as amostras observadas ao microscópio apenas foram detetadas fluorescências de fundo, que não correspondiam à presença de bactérias metanogénicas. Esta observação aliada à baixa percentagem de remoção média de CQO (30%) e à produção de AOVs, confirmam que este reator operou como um reator acidogénico.

2. Verificar a influência da variação da alcalinidade no número de flocos:

Quando a quantidade de microflocos foi mais elevada, verificaram-se valores baixos de produção de AOVs, e vice-versa, verificando-se uma relação inversa entre estes dois parâmetros. Esta condição poderá estar relacionada com o impacto que a biomassa presente no reator tem a produção de AOVs. Foi observado um decréscimo na produção de AOVs quando existia menos biomassa dentro do reator coincidindo com a observação de um maior número de flocos à saída do mesmo. Da mesma forma, quando se observaram menos flocos nas amostras analisadas ao microscópio, havendo assim uma maior quantidade de biomassa dentro do reator, obtiveram-se também valores mais elevados da produção de AOVs.

3. Verificar a influência da variação da alcalinidade na percentagem de área ocupada pelos flocos:

Durante o segundo período de operação do reator, alimentado com uma alcalinidade de 2000 mgCaCO₃/L, quando foram observados macroflocos, a concentração de AOVs medida era mais elevada que a média. Esta observação indicou que a saída destes flocos não afetou significativamente a quantidade de biomassa no reator nesses dias, no entanto permitiu inferir que as lamas estavam bem formadas e sem problemas de agregação, o que promoveu a produção de AOVs.

4. Verificar a influência da variação da alcalinidade nas características morfológicas dos flocos:

Os valores da circularidade dos microflocos foram de aproximadamente 0,5, enquanto os mesoflocos apresentaram valores próximos de 0,2 e os macroflocos de 0,1, revelando uma superfície menos irregular nos microflocos em relação às outras classes, e bordas extremamente irregulares nos macroflocos. A superfície irregular dos flocos de maior dimensão promove a coesão da biomassa, e conseqüentemente uma maior produção de AOVs para as condições de operação deste reator.

A solidez dos microflocos foi de aproximadamente 0,4, tendo a dos mesoflocos e dos macroflocos atingido valores de aproximadamente 0,2, mostrando assim que os microflocos têm uma maior capacidade de ocupar um espaço menor, como é esperado.

As amostras de saída do reator MBBR continham microflocos em maior número relativamente às restantes classes de flocos, pois devido às suas características morfológicas (mais compactos e de superfície mais lisa) são menos propensos a agregar-se à biomassa existente, pelo que foram mais facilmente escoados para fora do reator.

As observações microscópicas nos dias de amostragem após o início do segundo período de operação do reator confirmaram a presença de flocos compactos, firmes e irregulares, que podem ter contribuído para a maior produção de AOVs registada.

4.1.2 Reatores Descontínuos

Oito reatores descontínuos acidogênicos funcionaram durante 21 dias sob diferentes condições de operação, tendo sido obtidos para este trabalho os seguintes parâmetros físico-químicos: percentagem de remoção de CQO; pH; alcalinidade; e AOVs totais.

Foram determinados neste trabalho os seguintes parâmetros biológicos: área média dos flocos; percentagem de área ocupada pelos flocos; solidez e circularidade dos flocos. As análises para determinação dos parâmetros biológicos foram realizadas para o oitavo dia de operação e no final da experiência. O objetivo da operação deste reator foi determinar se a variação da alcalinidade e da razão F/M influenciavam a produção de AOVs.

4.1.2.1 Análise físico-química do funcionamento dos reatores

São apresentados, de seguida, os resultados obtidos de AOVs totais e pH ao longo do tempo nos diferentes reatores acidogênicos, de A a H, apresentados nas Figuras 24 a 27 por ordem crescente de razão F/M.

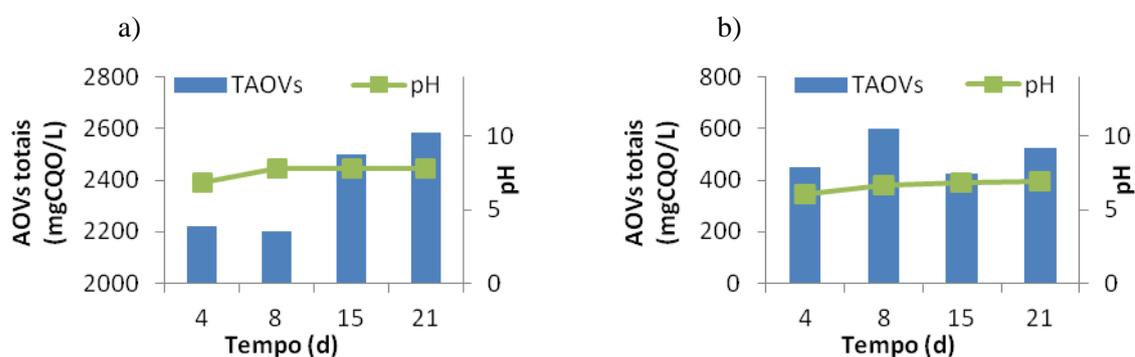
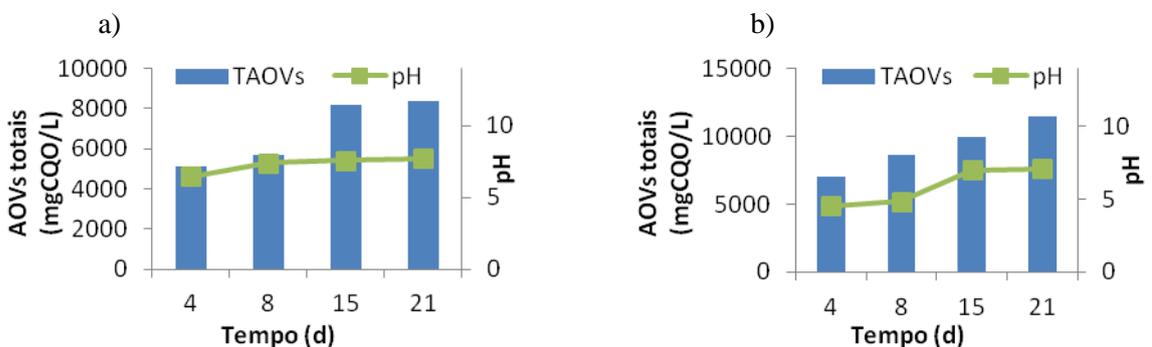
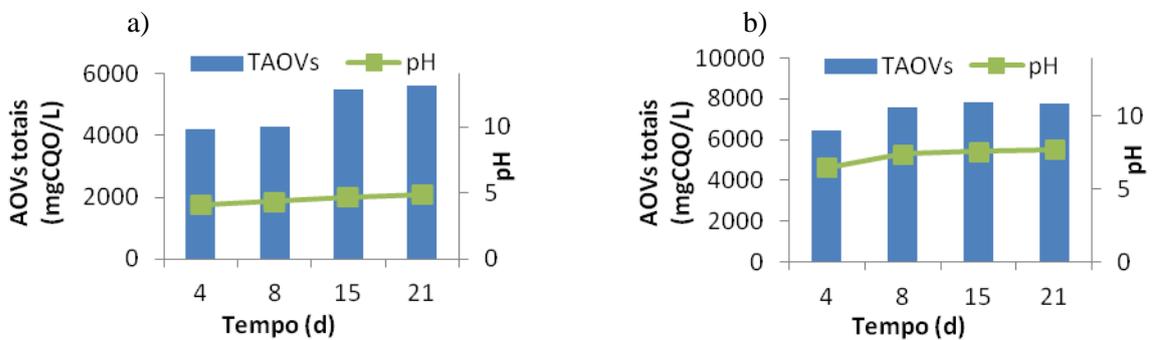
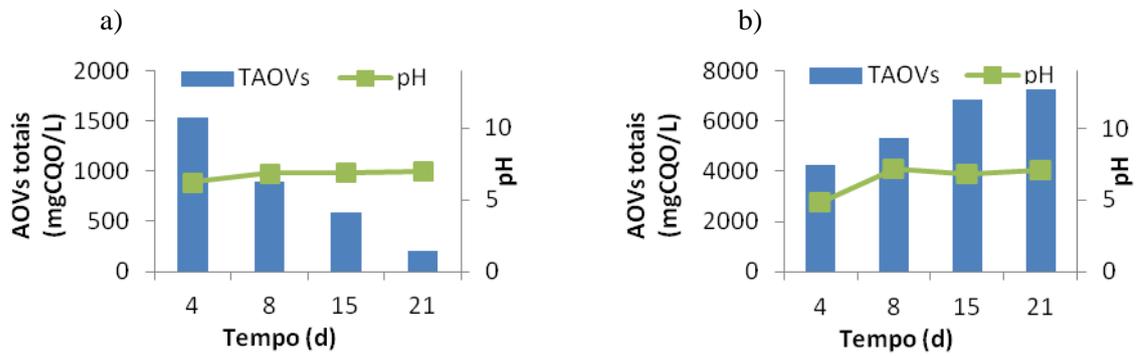


Figura 24: pH e concentração de AOV ao longo do tempo.

a) reator A, com F/M = 1,7 gCQO/gSSV e alcalinidade = 1,95 gCaCO₃/L;

b) reator B, com F/M = 1,8 gCQO/gSSV e alcalinidade = 1,90 gCaCO₃/L.



Na amostra final do reator C (Figura 25- a)) foi detetada a presença de protozoários, o que pode explicar a diferença no perfil de concentração total de AOVs quando comparado com o dos restantes reatores. Como estes organismos não foram identificados na amostragem do dia 8, supõe-se que estes se tenham desenvolvido após este dia de operação, diminuindo a quantidade de bactérias acidogénicas no meio, verificando-se um conseqüente decréscimo da concentração de AOVs até ao final da experiência. OS protozoários surgiram no reator C muito provavelmente devido a um erro do operador e são um excelente indicador da presença de oxigénio no mesmo. Logo, este reator não operou como um reator anaeróbio acidogénico.

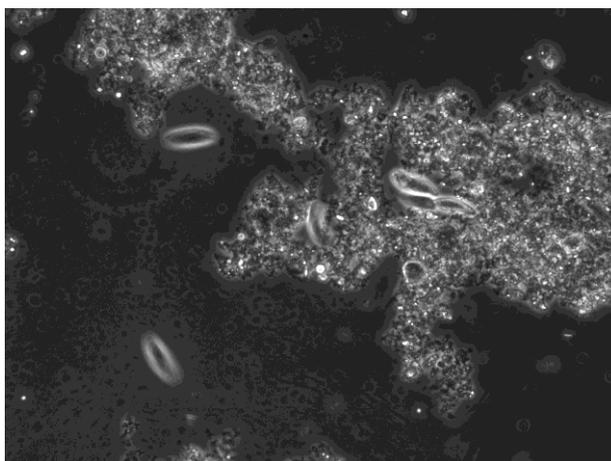


Figura 28: Imagem adquirida de protozoários em movimento na amostra final do reator C. Ampliação a 400x.

Todos os reatores descontínuos apresentam uma evolução temporal positiva da produção de AOVs, exceto o reator C, como referido anteriormente. As percentagens de remoção de CQO mantiveram-se baixas (< 30%), com exceção do reator C, como indicado na Tabela 9.

Tabela 9: Condições de operação dos reatores e respetivas percentagens de remoção de CQO.

<i>Reator</i>	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>D</i>	<i>E</i>	<i>F</i>	<i>G</i>	<i>H</i>
F/M (gCQO/gSSV)	1,7	1,8	2,0	3,8	4,0	4,2	5,5	6,0
Alcalinidade (gCaCO₃/L)	1,95	1,90	1,04	1,97	1,43	2,50	1,76	2,05
% Remoção de CQO	10	n.d.	91	n.d.	20	6	21	23

n.d. – Valores não determinados

4.1.2.2 Análise dos agregados microbianos presentes nos reatores

Nos dois dias de amostragem foram determinadas as características morfológicas dos agregados microbianos assim como os parâmetros biológicos referidos anteriormente. Para todos os reatores apenas foram identificadas duas classes de flocos: microflocos e mesoflocos. Não foram observadas quaisquer estruturas de flocos na amostragem efetuada no dia final de operação do reator D.

i) Número de flocos

Nas Figuras 29 e 30 está representada a evolução do número de microflocos e mesoflocos ao longo do tempo de operação dos reatores.

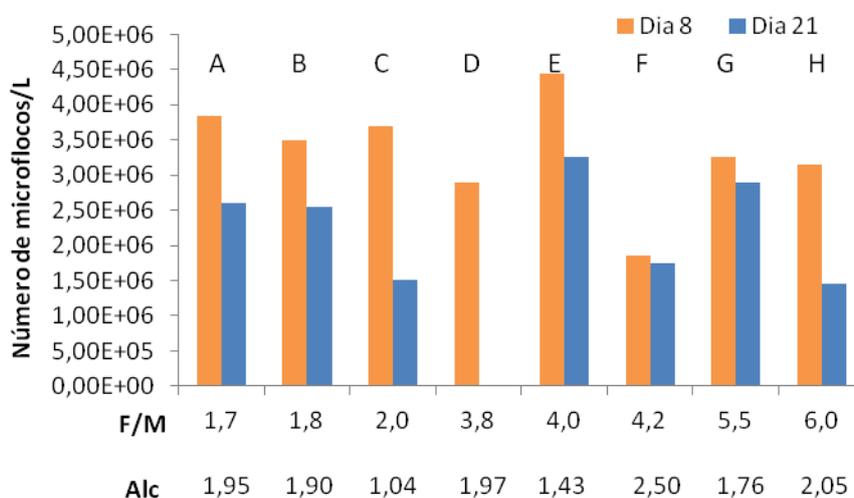


Figura 29: Evolução do número de microflocos nos diferentes reatores ao longo do tempo de ensaio.

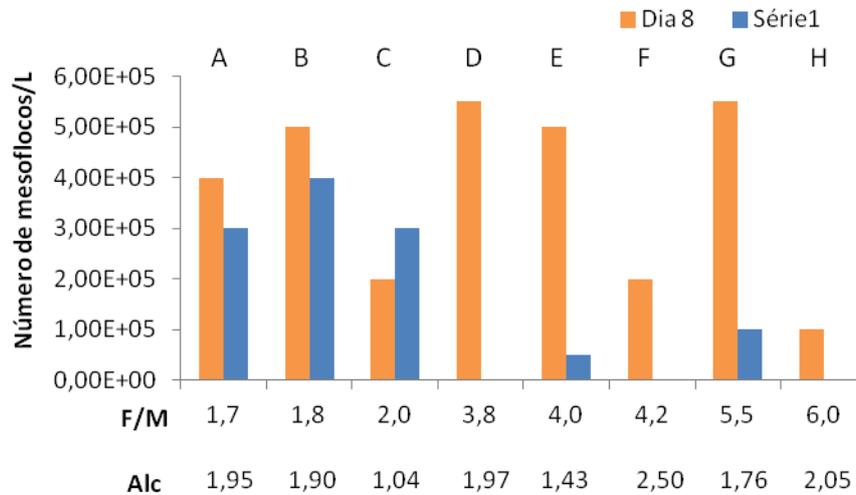


Figura 30: Evolução do número de mesoflocos nos diferentes reatores ao longo do tempo de ensaio.

É possível constatar que o número de mesoflocos apresentou valores cerca de dez vezes inferiores aos registados para os microflocos. Em todos os reatores, quer no caso dos microflocos como no dos mesoflocos, verificou-se um decréscimo da quantidade de flocos do dia 8 de operação relativamente ao dia final da experiência. No entanto, no reator C, verificou-se um aumento do número de mesoflocos, que pode estar relacionado com a presença de protozoários no reator, podendo indicar que as condições para a proliferação de protozoários num reator descontínuo acidogénico condicionem também o desenvolvimento deste tipo de flocos.

A quantidade de flocos não parece ser diretamente afetada pela variação da razão F/M nem da alcalinidade.

ii) Percentagem de área ocupada pelos flocos

Nas Figuras seguintes são apresentados os resultados referentes à percentagem de área ocupada pelos microflocos (Figura 31) e pelos mesoflocos (Figura 32), nos diferentes reatores.

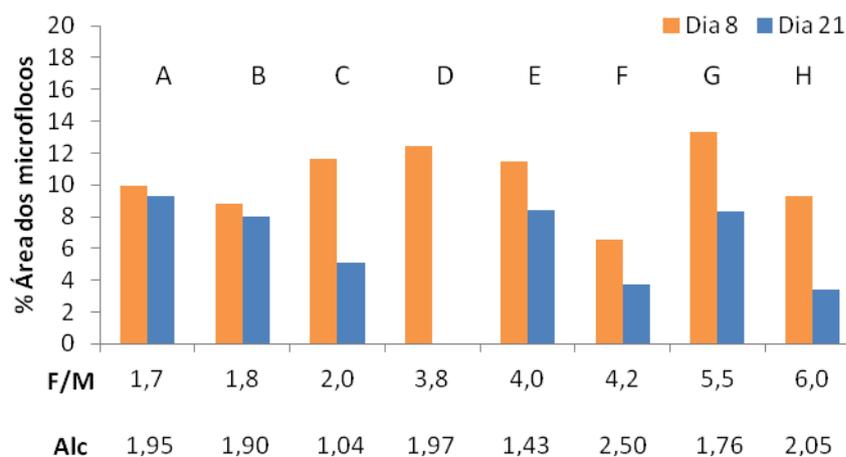


Figura 31: Percentagem de área ocupada pelos microflocos em função da razão F/M.

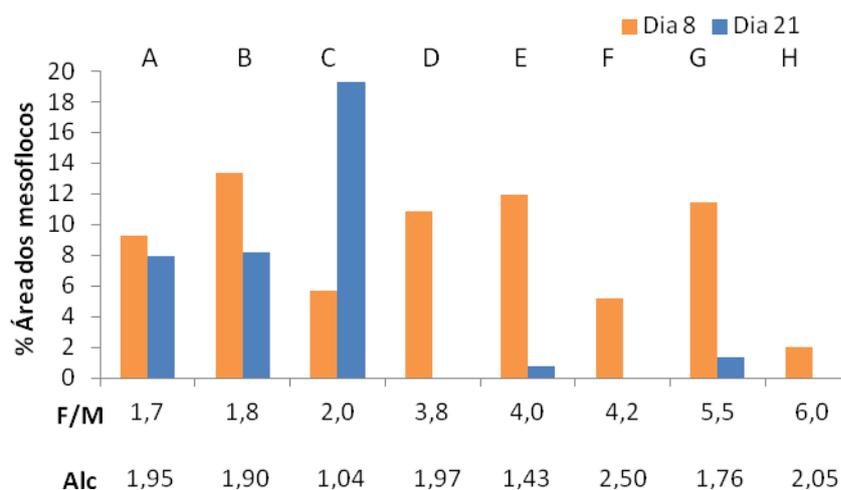


Figura 32: Percentagem de área ocupada pelos mesoflocos em função da razão F/M.

Foi possível observar através da Figura 31 que a percentagem de área dos microflocos diminuiu para todos os reatores acidogénicos no final da experiência, assim como se verificou para os mesoflocos, com a exceção do reator C. Para uma razão F/M acima de 3,8, verificou-se uma diminuição da percentagem de área ocupada pelos mesoflocos existentes nos reatores, chegando a ser inexistentes nas amostras finais dos reatores D, F e H. De facto, nesses três reatores a alcalinidade assume os maiores valores registados ao longo da experiência, acima de 1,95, tendo

sido verificada a existência de mesoflocos no dia 21 para os mesmos, podendo existir uma correlação entre o desenvolvimento dos mesoflocos e a alcalinidade mais elevada.

É possível que a diminuição da percentagem da área ocupada pelos microflocos no fim do ensaio esteja relacionada com o aumento da concentração total de AOVs ao longo da experiência, verificado nas Figuras 24 a 27, com a exceção da evolução de AOVs no reator descontínuo B. A presença de mesoflocos pode também estar relacionada com essa evolução, no entanto teriam de ser efetuadas mais amostragens ao longo de um futuro ensaio para corroborar esta hipótese.

O decréscimo no final do ensaio da percentagem dos microflocos e o aumento dos mesoflocos no reator C pode estar relacionado com a presença de protozoários predadores de bactérias no reator. Sendo bacteriófagos, os protozoários alimentam-se de bactérias dispersas no meio e de bactérias não agregadas na superfície dos flocos mais pequenos, comportamento observado na amostra final do reator em questão. Assim, é de esperar que a percentagem da área ocupada pelos microflocos diminuísse ao longo do tempo, tendo a dos mesoflocos aumentado. As condições do meio parecem ter sido mais favoráveis à formação de mesoflocos em vez de microflocos.

iii) Área média dos flocos

Os resultados referentes à área média dos flocos encontram-se ilustrados nas Figuras 33 (microflocos) e 34 (mesoflocos).

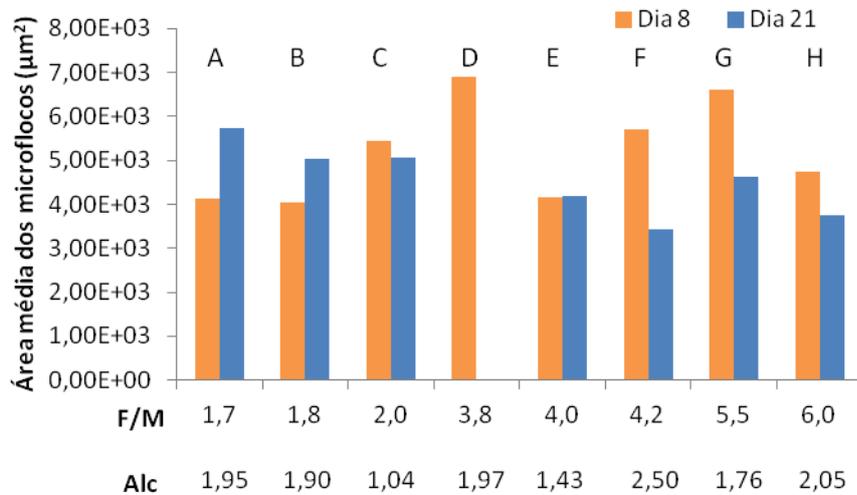


Figura 33: Área média dos microflocos nos reatores.

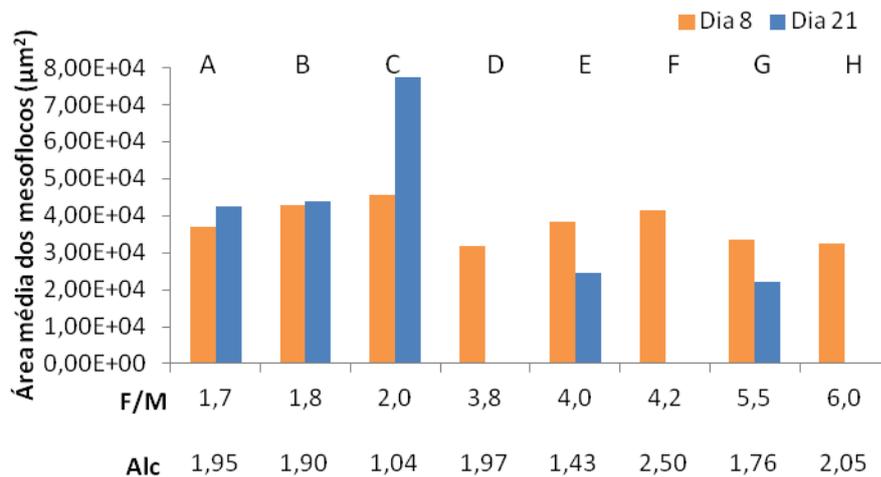


Figura 34: Área média dos mesoflocos nos reatores.

Comparando as amostras de cada reator (dia 8 para dia 21), foi possível verificar uma diminuição da área média dos microflocos para razões F/M superiores a 4,0, e um decréscimo dos valores da área média dos mesoflocos para razões de F/M superiores ou iguais a 2,0. A variação da alcalinidade não parece influenciar significativamente os microflocos, no entanto, tal como referido no ponto anterior, para os maiores valores de alcalinidade verifica-se a inexistência de mesoflocos no final da experiência.

Tal como para as percentagens de área ocupada pelos flocos (Figuras 31 e 32), observa-se uma diminuição dos valores de área média dos microflocos e um aumento do mesmo parâmetro para os mesoflocos, entre o dia 6 e o dia 21, no reator C. Esta condição pode estar relacionada com a presença de protozoários no sistema, tal como referido anteriormente.

iv) Características morfológicas dos flocos

Em ambas as amostragens os flocos apresentaram-se fracos, difusos e irregulares, chegando mesmo a não estarem devidamente formados no fim de operação do reator E.

De seguida são apresentados os resultados da solidez e da circularidade dos microflocos (Figura 35) e dos mesoflocos (Figura 36), para as diferentes condições de operação dos reatores descontinuos.

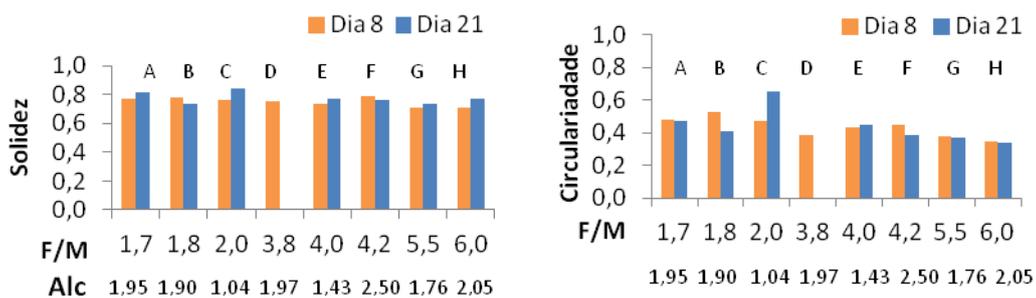


Figura 35: Solidez e Circularidade dos microflocos.

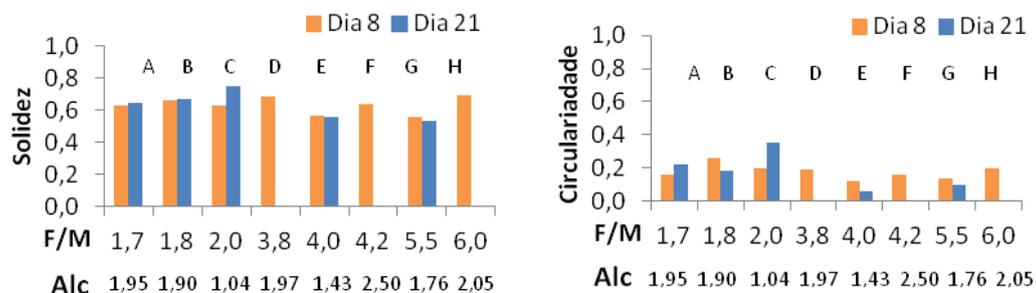


Figura 36: Solidez e Circularidade dos mesoflocos.

A obtenção de valores mais elevados de solidez para os microflocos indica uma maior capacidade de compactação destes flocos de menor dimensão relativamente aos mesoflocos. A solidez dos microflocos apresenta um valor médio para todos os reatores de aproximadamente 0,8. A variação da razão F/M não parece afetar significativamente a variação deste parâmetro para os flocos de pequenas dimensões. Os valores da circularidade para os microflocos revelaram ser mais elevados que os dos mesoflocos, indicando estruturas menos irregulares nos flocos de menores dimensões.

Para razões F/M superiores a 3,8 os mesoflocos apresentam valores de solidez e circularidade no final da experiência inferiores aos do oitavo dia de operação, não se observando valores para o último dia de operação dos reatores D e F devido à inexistência de mesoflocos. Este tipo de flocos apresenta um tamanho pequeno dentro da gama definida para os flocos de média dimensão e possuem uma superfície altamente irregular.

A variação da alcalinidade não parece ter uma influência significativa nas características morfológicas de ambas as classes de flocos.

4.1.2.3 Análise global do funcionamento dos reatores

1. Verificar a presença de bactérias metanogénicas através do método direto de microscopia de autofluorescência e correlacioná-la com as condições de operação do reator:

Não foram verificados níveis significativos de fluorescência para afirmar a presença de bactérias metanogénicas em nenhum dos reatores descontínuos. Verificou-se para a todos os reatores uma produção crescente de AOVs ao longo do tempo, assim como percentagens de remoção de CQO abaixo dos 30%, excetuando para o reator C, no qual houve um decréscimo dos valores de AOVs ao longo do tempo e cuja percentagem de remoção de CQO atingiu os 92%, devido muito provavelmente à presença de protozoários no sistema. Estas condições permitem confirmar que os reatores, exceto o C, operaram como reatores acidogénicos.

2. Verificar a influência da variação da razão F/M e da alcalinidade no número de flocos:

Em todos os reatores analisados, verificou-se uma maior quantidade de microflocos relativamente aos flocos de tamanho mediano tanto no início como no final da experiência. Isto pode indicar que as condições presentes em todos os reatores favorecem o desenvolvimento de flocos de menores dimensões, inibindo a formação de flocos de maiores dimensões. Não se verificou uma relação direta entre a variação da razão F/M e da alcalinidade relativamente à abundância de flocos nos reatores.

3. Verificar a influência da variação da razão F/M e da alcalinidade na percentagem de área ocupada pelos flocos:

Foi observada uma diminuição geral da percentagem da área dos microflocos em todos os reatores descontínuos, exceto no C.

No caso dos mesoflocos verificou-se uma diminuição da percentagem da área ocupada pelos mesmos do dia 8 de operação para o final da experiência para razões F/M iguais ou superiores a 3,8, que incluem os reatores E, D, F, G, H. Para os valores mais elevados da alcalinidade, nomeadamente 1,97 (D), 2,05 (H) e 2,50 (F), verificou-se a inexistência de mesoflocos no final do ensaio, pelo que a razão F/M juntamente com a alcalinidade podem ter uma influência significativa no desenvolvimento dos mesoflocos em reatores acidogénicos.

A diminuição da percentagem da área ocupada pelos microflocos no fim da experiência poderá estar relacionada com o aumento da produção de AOVs ao longo do tempo, com exceção para o reator descontínuo C.

O decréscimo da percentagem ocupada pelos microflocos aliada ao aumento do mesmo parâmetro relativamente aos mesoflocos, no reator C, pode estar relacionado com a presença de protozoários no reator, coincidindo com a diminuição da produção de AOVs ao longo do tempo nesse reator.

4. Verificar a influência da variação da razão F/M e da alcalinidade na área média dos flocos:

Para razões F/M superiores a 4,0 verificou-se uma diminuição da área média dos microflocos com o tempo, tendo-se observado a mesma evolução dos valores da área média dos mesoflocos para razões de F/M iguais ou superiores 2,0.

Os valores da alcalinidade nos reatores parecem não ter influenciado a área média dos microflocos. Já para os mesoflocos verificou-se, tal como para a sua percentagem de área, que para valores de alcalinidade mais elevados os mesoflocos não se conseguiram desenvolver, não sendo visíveis nas amostras do final da experiência para os reatores acidogénicos D, F e H.

Como verificado para as percentagens de área ocupada pelos flocos, houve uma diminuição dos valores de área média dos microflocos com o aumento dos valores de área média dos mesoflocos, no reator C. Esta relação poderá estar relacionada com a existência de protozoários no sistema, observados ao microscópio no último dia de operação.

5. Verificar a influência da variação da razão F/M e da alcalinidade nas características morfológicas dos flocos:

A razão F/M e a alcalinidade aparentam não ter uma influência significativa sobre as características morfológicas dos microflocos.

Relativamente à classe de flocos de médias dimensões foi possível verificar uma diminuição dos valores da solidez e da circularidade no final da experiência nos reatores com uma razão F/M superior a 3,8. A influência de valores elevados da alcalinidade nos mesoflocos já foi anteriormente referida. Este tipo de flocos, quando presentes nos reatores, apresentaram um tamanho pequeno dentro da gama definida para estes flocos e uma superfície muito irregular.

4.2 Resultados dos reatores aeróbios

Os reatores SBR (*Sequencing Batch Reactor*) são reatores aeróbios alimentados com um substrato acidificado (rico em ácidos orgânicos voláteis) de modo a selecionar uma cultura mista produtora de biopolímeros. Para avaliar o comportamento microbiológico foram retiradas amostras ao longo do tempo de operação do reator.

Nos três reatores SBR analisados não foi registrada uma presença significativa de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) aquando da observação microscópica das amostras.

Foi efetuada uma análise de correlação linear de Pearson para os resultados obtidos dos três reatores aeróbios de forma a tentar averiguar a existência de correlações significativas entre os parâmetros físico-químicos determinados e biológicos quantificados ao longo dos ensaios. No entanto, os resultados foram inconclusivos, possivelmente devido à quantidade insuficiente de dados disponíveis para se realizar uma análise mais precisa dos mesmos, pelo que estes não foram incluídos nos resultados.

4.2.1 SBR1

Neste reator foram retiradas 14 amostras ao longo do tempo, incluindo a amostra inicial retirada no arranque do reator.

Durante os 92 dias do ensaio foram quantificados os seguintes parâmetros físico-químicos: SST; SSV; percentagem de remoção de CQO e carga orgânica. Foram também analisados os seguintes parâmetros biológicos: número total de indivíduos de microfauna; número total de flocos; área média dos flocos; percentagem da área ocupada pelos flocos; solidez e circularidade dos flocos.

4.2.1.1 Análises físico-químicas do funcionamento do reator

Os valores de sólidos suspensos totais (SST) ultrapassaram os 3500 mg/L no arranque do reator tendo posteriormente assumido valores inferiores, maioritariamente abaixo dos 2500 mg/L ao longo do ensaio. Os valores de sólidos suspensos voláteis (SSV) exibiram a mesma evolução, mas com um valor máximo no dia do arranque do reator de cerca de 3400 mg/L, mantendo-se abaixo de 2500 mg/L, como se pode verificar na Figura 37. É possível verificar uma descida gradual dos valores em ambos os parâmetros do dia 23 até ao dia 71, tendo estes aumentado até ao dia 85 de operação.

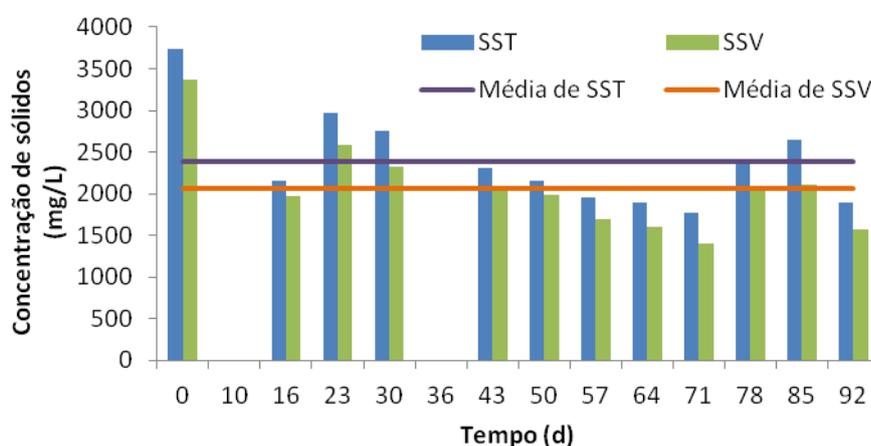


Figura 37: Sólidos suspensos totais e sólidos suspensos voláteis ao longo do tempo no reator SBR 1.

A carga orgânica não ultrapassou os 1,60 gCQO/L.d, como representado na Figura 38. Nos dias de operação 16 e 23 observou-se um decréscimo acentuado da carga orgânica medida, o que levou, provavelmente, ao aparecimento de alguns problemas de sedimentação no reator, verificados neste período de tempo. A alimentação deste reator proveio diretamente de um reator acidogénico do tipo MBBR, produtor de ácidos orgânicos voláteis, que servem de substrato para as culturas presentes no reator SBR. Nos dias 16 e 23 poderá ter havido um decréscimo na produção de ácidos no reator MBBR, traduzindo-se nos valores de carga orgânica mais baixos apresentados na Figura 38.

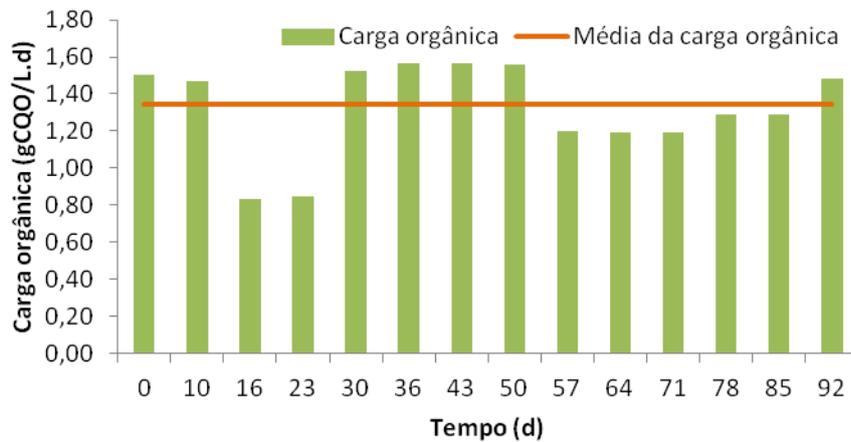


Figura 38: Variação da carga orgânica ao longo do tempo.

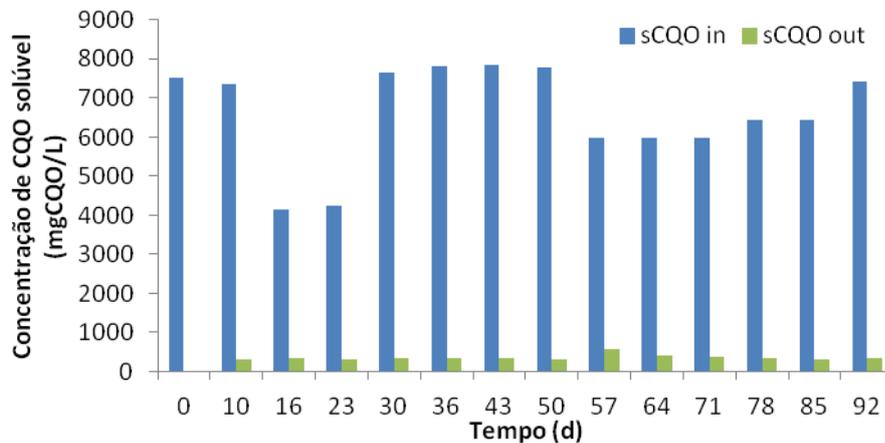


Figura 39: Evolução temporal da concentração de CQO solúvel à entrada (sCQO in) e à saída (sCQO out) do reator.

A percentagem de remoção de CQO manteve-se igual ou superior a 92% durante todo o tempo de operação do reator. Como representado na Figura 39, verifica-se uma redução das concentrações de CQO no reator para os dias em que a carga orgânica que entrou no reator foi inferior, o que coincide com o aparecimento de problemas de sedimentação das lamas.

4.2.1.2 Análise dos agregados microbianos presentes no reator

Durante este ensaio estudaram-se as características morfológicas dos agregados microbianos assim como os parâmetros biológicos indicados no início da presente secção.

i) Número de flocos

Na Figura 40 é apresentada a evolução do número de flocos ao longo do tempo, divididos consoante o tamanho.

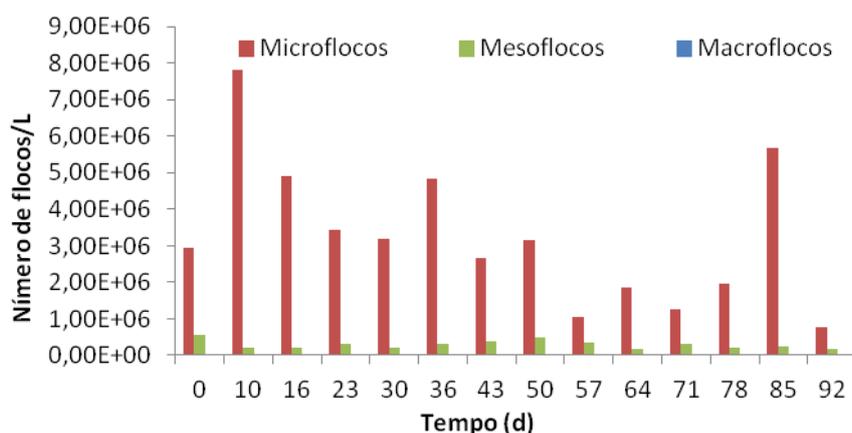


Figura 40: Número de microflocos, mesoflocos e macroflocos por litro ao longo do tempo de operação do reator.

Ao longo do ensaio verificou-se uma maior abundância de microflocos relativamente às restantes classes. Os macroflocos mantiveram-se sempre em menor número, atingindo o valor máximo de 5×10^4 no dia 10 de operação, e os mesoflocos apresentaram um valor médio de 3×10^5 ao longo do ensaio. A evolução ao longo do tempo do número de flocos de pequena dimensão parece estar relacionada com a carga orgânica alimentada ao sistema, já que se verifica uma maior abundância destes flocos quando a carga orgânica foi mais elevada, assim como números menores quando se registaram valores inferiores de carga orgânica no sistema.

ii) Percentagem de área ocupada pelos flocos

Na Figura 41 são apresentadas as percentagens de área ocupada pelas diferentes classes de flocos.

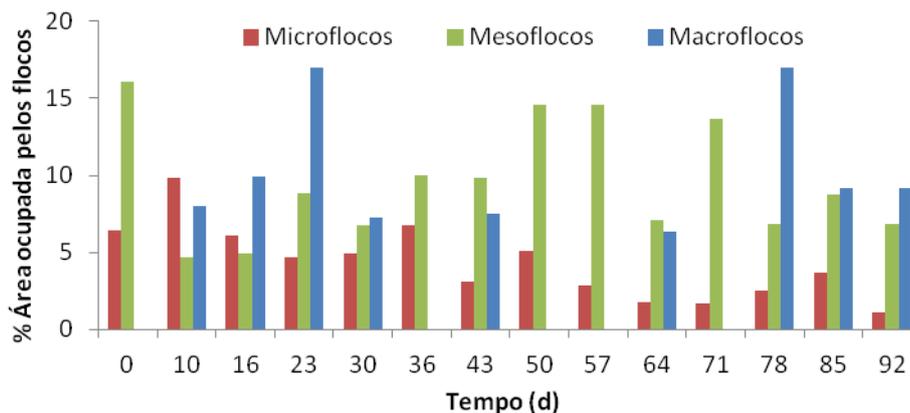


Figura 41: Percentagem de área ocupada pelos diferentes tipos de flocos.

No geral, verificou-se uma tendência decrescente tanto no número (Figura 40) como na percentagem de área ocupada pelos microflocos ao longo do ensaio, tendo a última variado entre 1% e 10%. As percentagens de área ocupada pelos mesoflocos e macroflocos apresentaram valores percentuais mais elevados, como seria de esperar. Nos dias de operação 50, 57 e 71 verificou-se um aumento na percentagem de área ocupada pelos flocos de média dimensão, que coincidiu com os valores nulos da percentagem de área ocupada pelos macroflocos e também com uma diminuição do número de microflocos. Neste período de tempo foi registado um decréscimo dos valores de sólidos suspensos (Figura 37), assim como uma diminuição dos valores da carga orgânica (Figura 38), traduzindo-se igualmente na concentração de CQO (Figura 39) no reator durante esse tempo.

iii) Características morfológicas dos flocos

Nos dez primeiros dias de operação do reator os flocos apresentavam-se fracos, difusos e irregulares. Quando se começaram a verificar problemas de sedimentação das lammas no reator, a partir do dia 23, os flocos passaram de difusos a compactos, mas ainda fracos e irregulares. Do dia

32 de operação até ao final do ensaio, os flocos caracterizavam-se como firmes, compactos e irregulares, provavelmente como resultado da adaptação da cultura às condições impostas no reator.

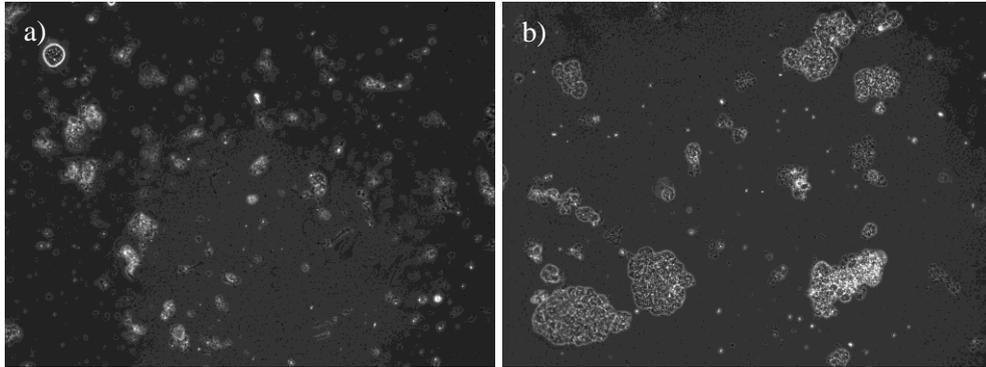


Figura 42: Diferença entre a morfologia dos flocos: a) no dia 10 de operação; b) no dia 36 de operação. Ampliações a 100x.

De seguida são apresentados os resultados referentes à solidez (Figura 43) e à circularidade (Figura 44) dos flocos, que determinam a capacidade de um floco ocupar o menor espaço possível na imagem e a irregularidade das suas bordas, respetivamente. Valores próximos de 1 para ambos os parâmetros indicam flocos mais compactos e com uma superfície mais lisa. Até ao 10º dia de operação, os flocos caracterizavam-se como fracos, difusos, e irregulares.

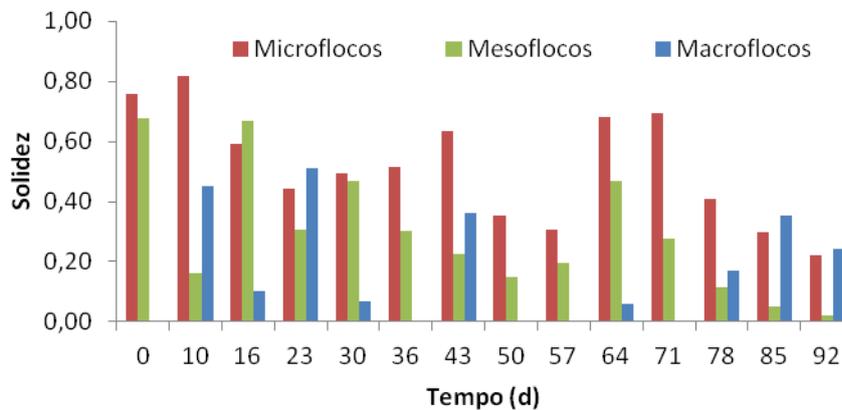


Figura 43: Solidez dos flocos.

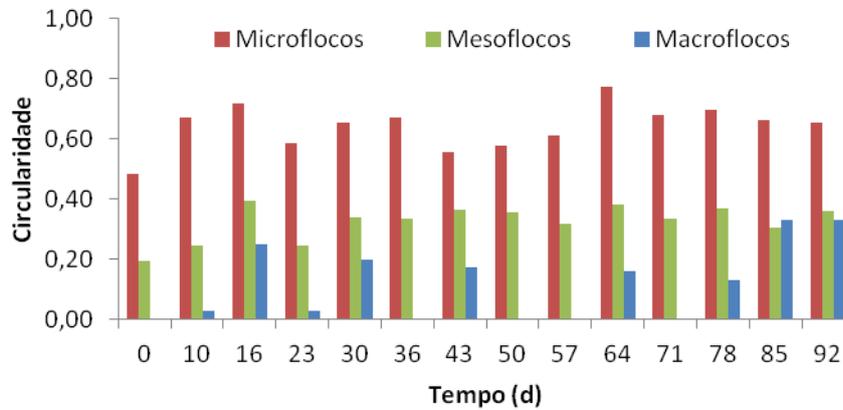


Figura 44: Circularidade dos flocos.

Observando os gráficos acima verifica-se que os microflocos apresentam bordas mais regulares ao longo do ensaio (Figura 43), mantendo-se os valores da circularidade dos microflocos sempre superiores aos obtidos para os mesoflocos e macroflocos.

Flocos de dimensões muito reduzidas contribuem para a turbidez do efluente e interferem com a sedimentação das lamas, traduzindo-se em valores de SST mais elevados e valores de SVI mais reduzidos. Foi possível observar a turbidez constante do efluente ao longo de toda a experiência.

No caso dos mesoflocos, o espaço ocupado por estes nas imagens variou ao longo de todo o ensaio, mas a rugosidade das bordas manteve-se elevada, traduzindo-se pelos baixos valores da circularidade (sempre inferiores a 0,40). Os macroflocos exibiram valores baixos para ambos os parâmetros, revelando que se tratavam de flocos de elevadas dimensões de superfície irregular. Flocos com uma superfície mais irregular proporcionam uma melhor superfície de agregação para bactérias suspensas, levando a um efluente menos turvo.

4.2.1.3 Análise da microfauna presente no reator

Procedeu-se à contagem do número de indivíduos de microfauna conforme descrito em 3.2.7, e foi calculado o índice biótico de lamas de forma a caracterizar a eficiência depuradora do

sistema, seguindo a metodologia descrita no ponto 3.2.8. O registo do número total dos protozoários observados no sistema ao longo do tempo, encontra-se na Figura 45, sendo apresentada na Figura 46 a percentagem dos indivíduos de cada grupo de protozoários observada nas amostras retiradas do reator. Para este reator, a contagem de microrganismos foi iniciada a partir do quarto dia de amostragem, que corresponde ao dia 23 de operação do reator.

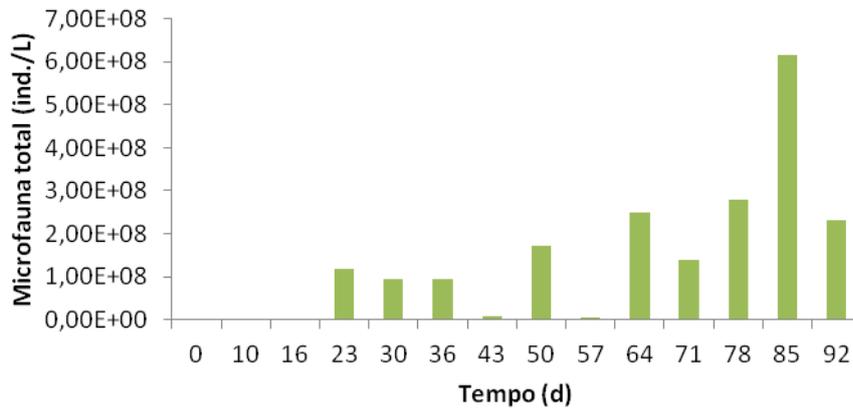


Figura 45: Número total da microfauna contabilizada ao longo do tempo de operação do reator SBR 1.

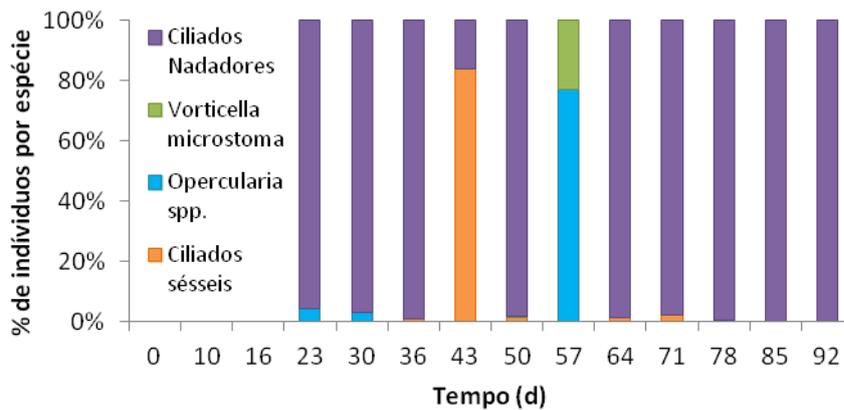


Figura 46: Percentagem dos indivíduos das diferentes espécies observadas no reator ao longo do tempo.

Ao longo da experiência os ciliados nadadores estiveram em maior número, comparando com os restantes grupos representativos da microfauna. Nos dias 43 e 57, a quantidade de ciliados

nadadores é muito inferior à quantidade observada nos restantes dias analisados, não se chegando a visualizar um único indivíduo deste grupo de protozoários no dia 57. No entanto, não foram encontradas causas plausíveis para essa diminuição acentuada no número dos protozoários presentes no reator. Nas amostras analisadas não foram observados quaisquer espécimes de ciliados móveis de fundo nem de amibas com teca.

A Tabela 10 ilustra os valores obtidos para cada grupo de protozoários no reator SBR 1. Os valores a negrito e sublinhados indicam o valor numérico dos indivíduos do grupo dominante na amostra em questão.

Tabela 10: Número de indivíduos para cada grupo de microfauna ao longo do tempo.

<i>Dia de operação</i>	<i>Número total de espécies</i>	<i>Ciliados Móveis de Fundo + Sésseis e/ou Amibas com Teca (ind./L)</i>	<i>Ciliados Sésseis > 80% (ind./L)</i>	<i>Opercularia spp. (ind./L)</i>	<i>Vorticella micróstoma (ind./L)</i>	<i>Ciliados Nadadores (ind./L)</i>	<i>Pequenos Flagelados (ind./L)</i>	<i>Microfauna total (ind./L)</i>
0	-	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	-
10	-	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	-
16	-	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	-
23	2	n.o.	n.o.	4,87E+06	n.o.	<u>1,13E+08</u>	n.o.	1,18E+08
30	3	n.o.	n.o.	2,75E+06	n.o.	<u>9,19E+07</u>	n.o.	9,47E+07
36	3	n.o.	7,67E+05	n.o.	n.o.	<u>9,19E+07</u>	6	9,27E+07
43	6	n.o.	<u>6,37E+06</u>	n.o.	n.o.	1,23E+06	n.o.	7,60E+07
50	4	n.o.	1,84E+06	5,27E+05	2,63E+05	<u>1,69E+08</u>	n.o.	1,71E+07
57	6	n.o.	n.o.	<u>3,20E+06</u>	9,59E+05	n.o.	n.o.	4,16E+07
64	3	n.o.	3,27E+06	n.o.	n.o.	<u>2,45E+08</u>	n.o.	2,49E+07
71	2	n.o.	3,02E+06	n.o.	n.o.	<u>1,37E+08</u>	n.o.	1,40E+07
78	3	n.o.	n.o.	9,33E+05	n.o.	<u>2,79E+08</u>	n.o.	2,80E+07
85	2	n.o.	7,50E+05	n.o.	n.o.	<u>6,14E+08</u>	43	6,15E+07
92	3	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	<u>2,31E+08</u>	n.o.	2,31E+07

n.o. – Não observado

Apresenta-se de seguida a tabela de valores do Índice Biótico de Lamas (SBI) e correspondentes classes, desde o dia 23 de operação até ao fim do ensaio. Os valores foram obtidos através da análise da tabela de duas entradas (Tabela 11) consoante a espécie dominante, o número total de espécies e a abundância de pequenos flagelados em cada dia de operação.

Tabela 11: Tabela de resultados do SBI.

<i>Dia de operação (d)</i>	<i>SBI</i>	<i>Classe</i>
0	-	-
10	-	-
16	-	-
23	2	IV
30	2	IV
36	0	IV
43	6	II
50	2	IV
57	6	II
64	2	IV
71	2	IV
78	2	IV
85	0	IV
92	2	IV

Segundo os resultados obtidos, as lamas podem ser caracterizadas quase na totalidade do tempo como tendo uma atividade biológica e eficiência depuradora muito baixas (classe IV), de acordo com a Tabela 7.

4.2.1.4 Análise da intensidade de fluorescência emitida pelos grânulos de PHA

A intensidade de fluorescência emitida pelos grânulos de PHA presentes nos flocos foi determinada para todos os dias de amostragem de acordo com o método descrito no ponto 3.4.2. A intensidade de fluorescência é uma grandeza adimensional pois trata-se de um parâmetro de comparação de intensidade de fluorescência entre os diversos flocos. É possível verificar pela Figura 47 uma evolução crescente aproximadamente sinusoidal do perfil da intensidade de fluorescência ao longo do tempo de operação do reator.

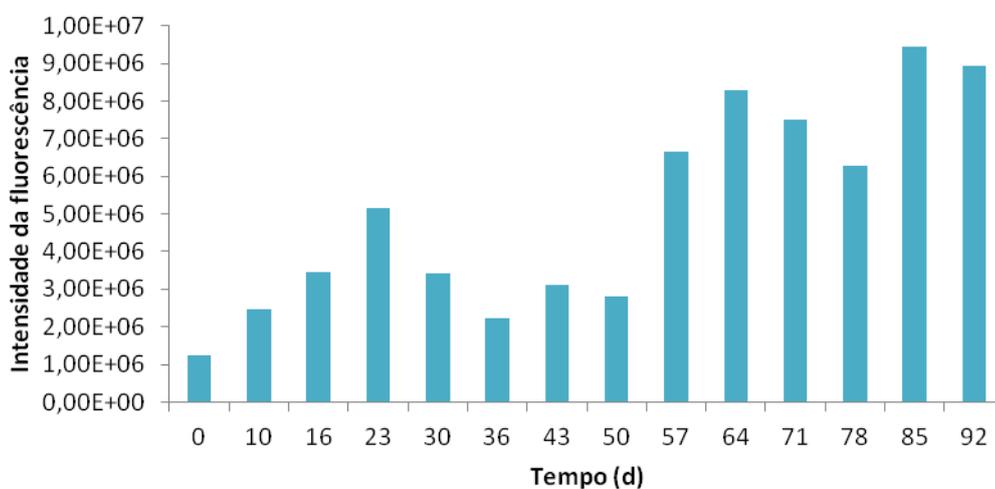


Figura 47: Variação da intensidade de fluorescência emitida pelos grânulos de PHA corados com Azul de Nilo ao longo do tempo

A intensidade da fluorescência emitida pelos grânulos de PHA não se manteve constante ao longo do ensaio, tendo-se registado picos de intensidade de fluorescência emitida nos dias 23, 64 e 85 de operação. Os diferentes períodos de maior ou menor intensidade de fluorescência emitida registados ao longo do ensaio parecem coincidir com a evolução temporal do número de microflocos (Figura 41). Os picos de intensidade também parecem relacionar-se com a quantidade de protozoários quantificados para os mesmos dias de operação.

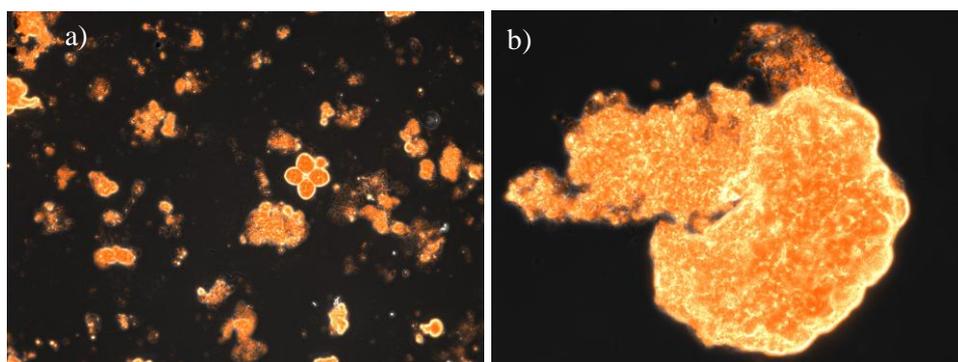


Figura 48: Diferença entre as fluorescências emitidas pelos flocos corados a Azul de Nilo: a) dia de operação 36; b) dia de operação 85. Ampliações a 100x.

4.2.1.5 Análise global do funcionamento do reator

1. Relacionar a quantidade observada de flocos ao longo do tempo com as condições de operação do reator:

No decorrer da operação do SBR los valores mínimos registados foram os dos macroflocos, que apresentaram valores na média dos 3×10^4 . A quantidade de mesoflocos foi ligeiramente superior e rondou os 3×10^5 indivíduos/L, revelando um número dez vezes superior ao registado para os macroflocos. Os microflocos foram a classe de flocos mais abundante no reator, e a sua evolução ao longo do tempo parece estar relacionada com a carga orgânica alimentada ao sistema, pois verificou-se uma maior quantidade destes flocos quando a carga orgânica foi mais elevada.

2. Relacionar a percentagem ocupada pelos flocos ao longo do tempo com as condições de operação do reator:

A percentagem ocupada pelos microflocos apresentou uma tendência decrescente tendo, variado entre 10% e 1%. As outras classes apresentaram valores percentuais mais elevados variando entre 5% e 16% (mesoflocos); e 8% e 17% (macroflocos).

Verificou-se um aumento da percentagem da área ocupada pelos mesoflocos nos dias de operação 50, 57 e 71, que coincidiram com uma redução dos valores dos sólidos suspensos assim como da carga orgânica no reator, que se traduziu também pela redução dos valores de CQO nesses dias.

3. Relacionar a evolução da formação e morfologia dos flocos ao longo do tempo com as condições de operação do reator:

Nos primeiros dez dias de operação do reator os flocos caracterizaram-se como fracos, difusos, e irregulares. Aquando dos problemas de sedimentação do reator verificou-se uma mudança na morfologia dos flocos, que se apresentaram compactos, difusos e irregulares. A partir do dia 32 de operação até ao final do ensaio, os flocos caracterizaram-se como firmes, compactos e irregulares.

É possível verificar através dos valores da circularidade obtidos que a irregularidade dos flocos se manteve ao longo de todo o ensaio. Através de observações microscópicas verificou-se que os flocos de médias e grandes dimensões apresentavam estruturas mais firmes e compactas a partir do 32º dia de operação, e é possível observar na Figura 43 o aumento da área ocupada pelos mesoflocos e macroflocos a partir desse dia.

4. Verificar a evolução do número e variedade das espécies de protozoários existentes nas amostras recolhidas e correlacioná-las com as condições de operação do reator;

Os ciliados nadadores estiveram frequentemente em maior número em comparação com os restantes grupos de protozoários ao longo da experiência. Nos dias 43 e 57 de operação o número de protozoários observados foi muito inferior ao contabilizado nos restantes dias, no entanto, não foram encontradas causas plausíveis para essa diminuição.

Segundo os valores de SBI obtidos para os dias de amostragem, as lamas podem ser caracterizadas quase na totalidade do tempo como tendo tido uma atividade biológica e eficiência depuradora muito baixas (classe IV), o que explica a ausência de quaisquer espécimes de ciliados móveis de fundo nem de amibas com teca ao longo do tempo de operação do reator. Estes grupos de protozoários são indicadores de boas condições de nitrificação e estão geralmente presentes em lamas com baixas cargas orgânicas, elevadas concentrações de oxigénio e longos tempos de retenção.

5. Verificar a intensidade de fluorescência emitida pelos grânulos corados com Azul de Nilo dos organismos acumuladores de PHA ao longo do tempo e correlacioná-la com as condições de operação dos reatores.

Foi possível verificar uma evolução crescente aproximadamente sinusoidal no perfil da intensidade de fluorescência ao longo do tempo de operação do reator. Foram determinados valores de intensidade de fluorescência entre 1×10^6 e 9×10^6 tendo-se registado picos de intensidade emitida nos dias 23, 64 e 85 de operação. Esses picos de intensidade aparentam relacionar-se com a quantidade de protozoários presentes no reator nos mesmos dias de operação. A evolução da intensidade de fluorescência parece semelhante à observada para o número de microflocos, podendo existir alguma correlação entre o número deste tipo de flocos e a fluorescência emitida pelos grânulos de PHA.

Segundo um estudo recente de Oshiki *et al.* (2011) foi possível estabelecer uma correlação forte ($R > 0,97$) entre a intensidade de fluorescência do Azul de Nilo e a concentração de PHA, determinada por cromatografia de gás, nas amostras de lamas ativadas. Devido à falta de equipamento laboratorial específico não foi possível determinar a concentração de PHA. O desenvolvimento de métodos para a determinação de concentração de PHA recorrendo a diferentes equipamentos laboratoriais seria um ponto a ter em conta para estudos futuros.

4.2.2 SBR2

Este reator operou durante 62 dias, tendo sido efetuadas, na totalidade, 10 amostragens para análise microscópica. Os parâmetros físico-químicos e biológicos determinados durante este ensaio são os mesmos que os estudados no SBR1.

4.2.2.1 Análise físico-química do funcionamento do reator

Os valores determinados ao longo da experiência de sólidos suspensos (SST e SSV), assim como os seus valores médios, são apresentados na Figura 49.

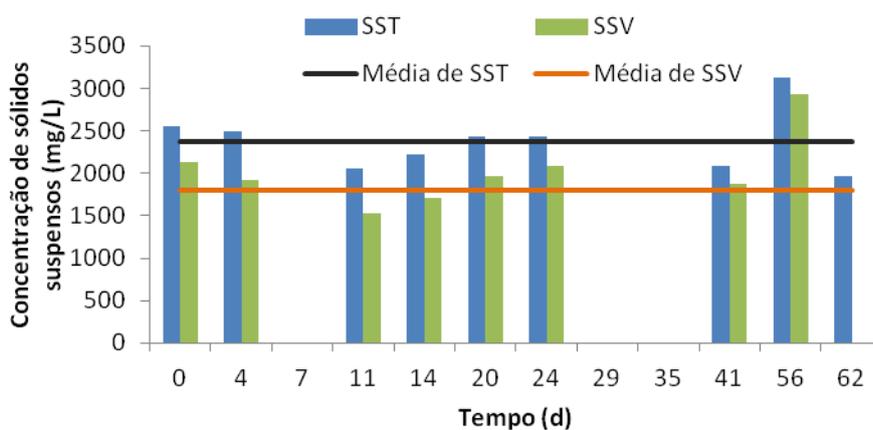


Figura 49: Evolução da concentração de Sólidos Suspensos Totais e Voláteis durante o tempo de operação do reator.

A concentração de SST manteve-se sempre acima dos 2000 mg/L, com valores médios de cerca de 2400 mg/L, e a concentração de SSV apresentou um valor médio de 1800 mg/L. A concentração dos sólidos suspensos aparenta ter uma tendência geral positiva.

Na Figura 50 são apresentados os dados referentes à carga orgânica alimentada ao sistema no decorrer do ensaio.

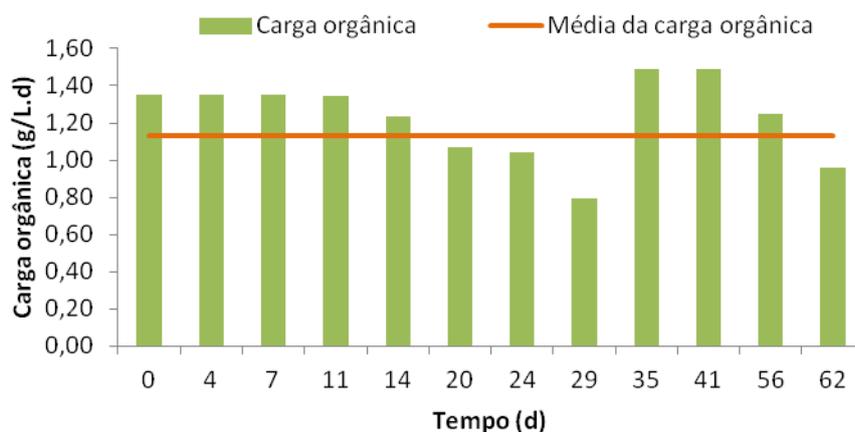


Figura 50: Evolução da concentração da carga orgânica ao longo do tempo.

A carga orgânica apresentou valores entre 0,79 e 1,35 mgCQO/L.d ao longo do tempo, apresentado uma média próxima de 1,20 mgCQO/L. O valor mínimo foi determinado no 29 dia de operação devido a um decréscimo na produção de ácidos orgânicos voláteis por parte do reator do tipo MBBR que alimentou diretamente este reator.

A Figura 51 ilustra a concentração do CQO solúvel e a percentagem de remoção de CQO determinada no reator SBR2 ao longo do tempo.

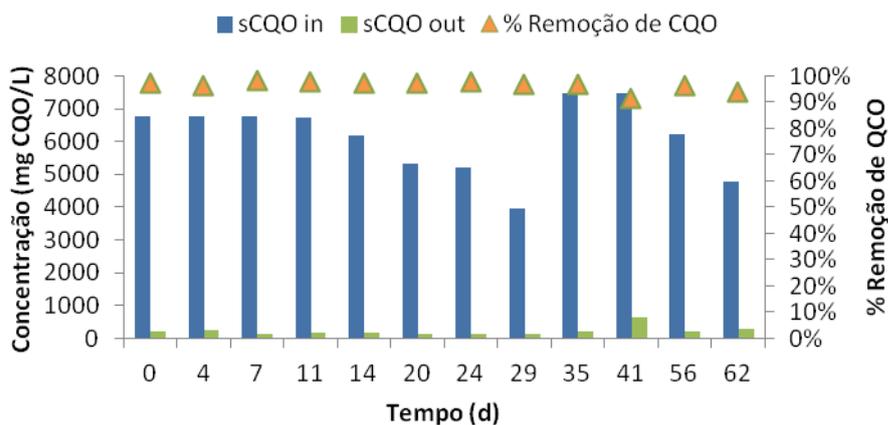


Figura 51: Concentração e percentagem de remoção de CQO ao longo do tempo.

Os valores de percentagem de remoção de CQO obtidos ao longo do tempo foram praticamente constantes, mantendo-se uma percentagem de remoção média de 96%. A carga

orgânica influencia diretamente este parâmetro, pelo que para os dias em que essa foi mais baixa verifica-se também uma diminuição a concentração de CQO no reator.

4.2.2.2 Análise dos agregados microbianos presentes no reator

Tal como para o SBR1, foram estudados os seguintes parâmetros biológicos: número de flocos; percentagem de área ocupada pelos flocos; solidez dos flocos e circularidade dos flocos.

i) Número de flocos

A Figura 52 representa o número de microflocos, mesoflocos e macroflocos ao longo do tempo de operação do reator.

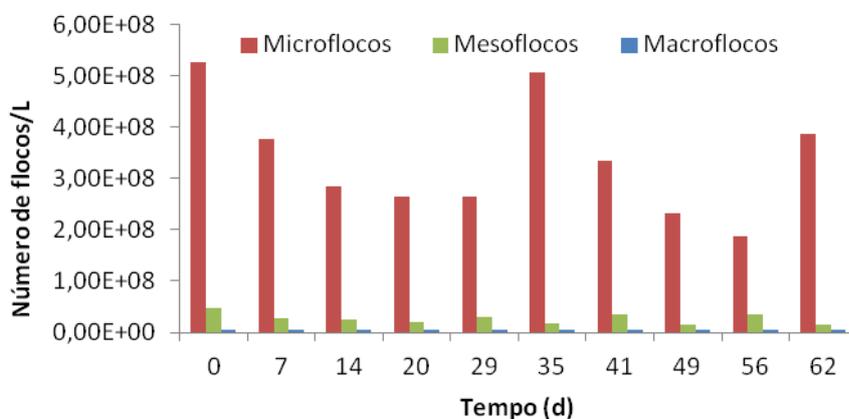


Figura 52: Evolução da quantidade de flocos ao longo do estudo.

Ao longo do ensaio foi verificada uma maior abundância do número de microflocos relativamente aos mesoflocos e macroflocos. A diferença da quantidade de microflocos e as restantes classes é acentuada, sendo a quantidade de microflocos cerca de dez vezes superior à quantidade de mesoflocos e cem vezes superior à quantidade dos macroflocos. A variação do número de microflocos parece estar relacionada com a variação da carga orgânica alimentada ao reator.

Comparando as Figuras 50 (Carga orgânica ao longo do tempo) e 52 (Quantidade de flocos ao longo do tempo), o tempo de operação do reator pode ser dividido em duas fases distintas. A primeira fase está compreendida entre os dias 0 e 29, em que há uma tendência decrescente dos parâmetros referidos. Após o dia 29 de operação ocorreu um aumento brusco da quantidade de microflocos presentes no reator, o que se pode relacionar com o aumento de carga orgânica. Após o aumento de carga orgânica verifica-se novamente uma tendência decrescente dos dois parâmetros, entre os dias 35 e 56.

ii) Percentagem ocupada pelos flocos

A Figura 53 ilustra o desenvolvimento temporal da percentagem da área ocupada pelas diferentes classes de flocos presentes no reator.

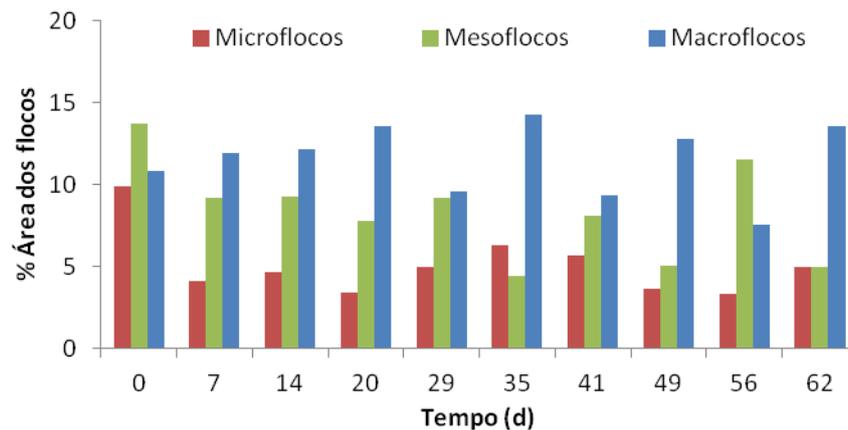


Figura 53: Percentagem de área ocupada pelos flocos.

Os microflocos apresentam uma evolução aproximadamente sinusoidal, na qual a percentagem pelos flocos varia entre 3% e 6%. Este tipo de evolução também se verificou para a percentagem de área ocupada pelos mesoflocos, que apresentou um valor médio de 8%. Como seria de esperar os macroflocos exibiram as percentagens mais elevadas ao longo do ensaio, mantendo-se sempre acima dos 8%.

Este parâmetro não aparenta correlacionar-se diretamente com nenhum dos parâmetros físico-químicos determinados para este reator.

iii) Características morfológicas dos flocos

Os resultados dos parâmetros solidez e circularidade são apresentados nas Figuras 54 e 55.

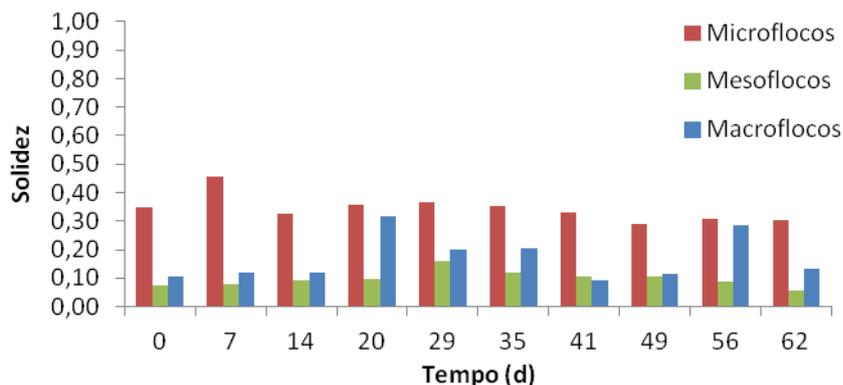


Figura 54: Solidez dos flocos.

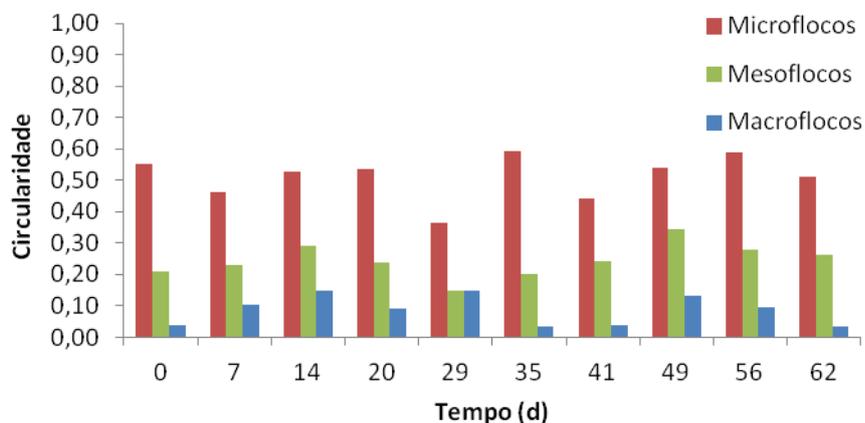


Figura 55: Circularidade dos flocos.

Os microflocos apresentam bordas mais regulares que as restantes classes, traduzindo-se pelos valores mais elevados de circularidade, com uma média aproximada de 0,50. Esta classe de flocos ocupa um menor espaço no meio líquido, devido aos valores de solidez obtidos, apresentando uma média de 0,35.

É possível verificar que tanto os mesoflocos como os macroflocos possuem bordas bastante irregulares, traduzido pelos valores baixos de circularidade determinados (média de 0,25 e 0,10, respetivamente), e não são tão compactos como os microflocos, exibindo uma estrutura de floco fraca, o que pôde ser confirmado durante a observação dos mesmos ao microscópio.

Os parâmetros de solidez e circularidade parecem não ser influenciados diretamente por nenhum dos parâmetros de operação do reator estudados.

4.2.2.3 Análise da microfauna presente no reator

Foi efetuada a quantificação da microfauna no reator SBR2 e determinado o valor do SBI, assim como a correspondente classe das lamias.

Na Figura 56 apresenta-se a evolução numérica da microfauna total ao longo do tempo.

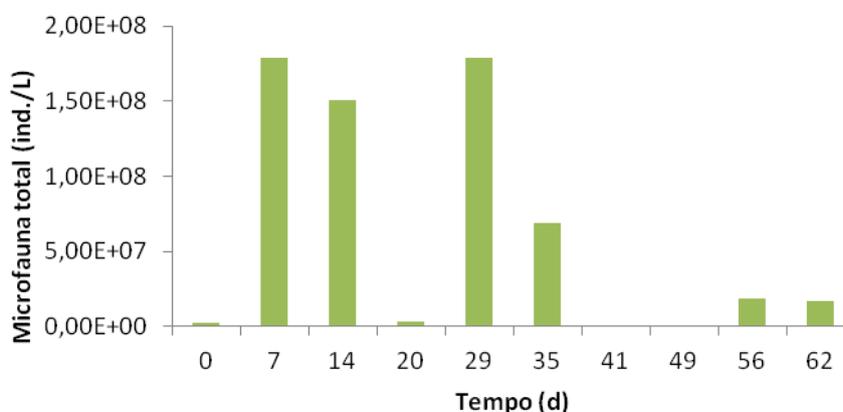


Figura 56: Evolução da microfauna total em indivíduos por litro ao longo do tempo.

No arranque do reator não se verificou um número elevado de protozoários. É possível verificar uma diminuição geral dos valores da microfauna após o dia 29 de operação até ao final da experiência. No dia 41 não foram observados quaisquer protozoários nas amostras analisadas. Parece não existir uma correlação direta entre a quantidade de microfauna no reator e os parâmetros determinados ao longo do tempo de operação do reator.

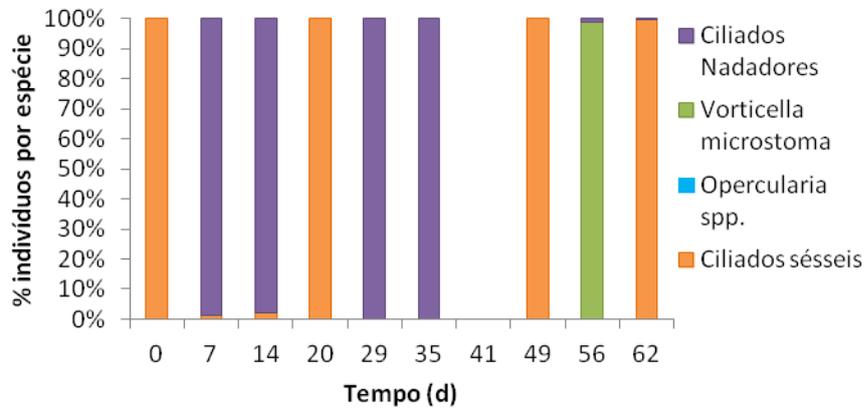


Figura 57: Percentagem de indivíduos por espécie de protozoário no reator.

Nas amostras recolhidas deste reator não foi observada, no geral, uma grande diversidade de espécies dentro dos quatro grupos de protozoários observados microscopicamente, apresentados na Figura 57. O número máximo de diferentes espécies observadas nas amostras retiradas foi 5, pertencentes ao grupo dos ciliados sésseis, no início e no fim da operação do reator.

A Tabela 12 ilustra o número de indivíduos de cada grupo, assim como os valores da microfauna total, em cada dia de amostragem.

Tabela 12: Quantificação do número de protozoários no reator ao longo do tempo

<i>Dia de operação</i>	<i>Número total de espécies</i>	<i>Ciliados Móveis de Fundo + Sésseis e/ou Amibas com Teca (ind./L)</i>	<i>Ciliados Sésseis > 80% (ind./L)</i>	<i>Opercularia spp. (ind./L)</i>	<i>Vorticella microstoma (ind./L)</i>	<i>Ciliados Nadadores (ind./L)</i>	<i>Pequenos Flagelados (ind./L)</i>	<i>Microfauna total (ind./L)</i>
0	5	n.o.	<u>2,43E+06</u>	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	2,43E+06
7	2	n.o.	1,88E+06	n.o.	n.o.	<u>1,77E+08</u>	n.o.	1,79E+08
14	2	n.o.	3,28E+06	n.o.	n.o.	<u>1,47E+08</u>	n.o.	1,50E+08
20	4	n.o.	<u>3,45E+06</u>	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	3,45E+06
29	2	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	<u>1,79E+08</u>	n.o.	1,79E+08
35	1	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	<u>6,92E+07</u>	n.o.	6,92E+07
41	-	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	-
49	3	n.o.	<u>7,17E+05</u>	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	7,17E+05
56	2	n.o.	n.o.	n.o.	<u>1,81E+07</u>	2,33E+05	n.o.	1,83E+07
62	5	n.o.	<u>1,70E+07</u>	n.o.	n.o.	8,33E+04	n.o.	1,71E+07

n.o. – Não observado

Tabela 13: Classificação das lamas no reator.

<i>Dia de operação (d)</i>	<i>SBI</i>	<i>Classe das lamas</i>
0	6	II
7	2	IV
14	2	IV
20	6	II
29	2	IV
35	2	IV
41	-	-
49	5	III
56	3	IV
62	6	II

A classe de lamas predominante neste reator é a classe IV, correspondendo a uma baixa eficácia de depuração e a uma atividade microbiológica reduzida. No entanto, nos dias 0, 20 e 62 de operação, as lamas obtiveram uma melhor classificação (classe II), correspondendo a lamas estáveis e com eficácia de depuração suficiente. Nestes dias de operação os ciliados sésseis foram o grupo dominante na amostra, e a abundância de ciliados nadadores foi muito baixa ou nula, o que contribuiu para a estabilidade das lamas.

4.2.2.4 Análise da intensidade de fluorescência emitida pelos grânulos de PHA

Foi determinada a intensidade de fluorescência para todos os dias de amostragem e os resultados são apresentados na Figura 58.

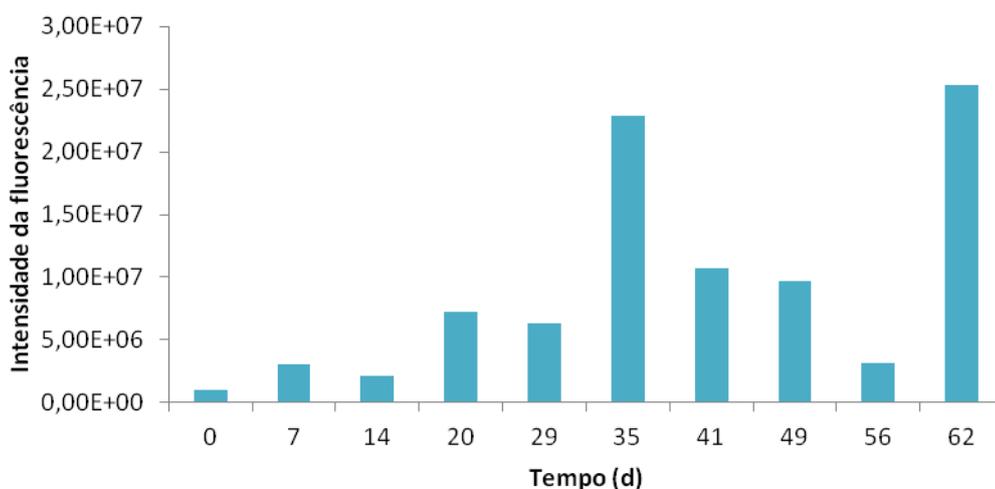


Figura 58: Intensidade de fluorescência emitida por flocos corados com Azul de Nilo ao longo do tempo.

É possível verificar pela Figura 58 que a evolução do perfil de intensidades de fluorescência não é constante ao longo do tempo, e apresenta os valores máximos nos dias de operação 35 e 62. Nestes dias verificou-se um número elevado de microflocos (Figura 52) no reator, e valores médios de 0,90 para a carga orgânica (Figura 50).

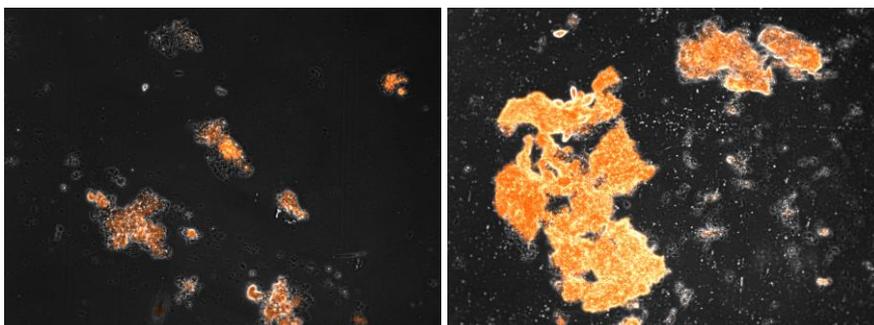


Figura 59: Diferença entre a intensidade de fluorescência emitida pelos flocos: a) dia de operação 14; b) dia de operação 35. Ampliações a 100x.

A evolução da intensidade de fluorescência emitida parece semelhante à evolução descrita pelos valores de número de flocos de pequenas dimensões, para o período de tempo entre os dias 35 e 56, podendo haver uma relação entre a intensidade de fluorescência emitida e a abundância desta classe de flocos.

No entanto, no dia 0 de operação do reator, a relação descrita anteriormente não se verificou, como seria de esperar. No início da operação do reator SBR a biomassa não se encontra selecionada para acumulação de biopolímero, pelo que a intensidade de fluorescência emitida é muito baixa, mesmo com elevada carga orgânica e elevado número de microflocos.

A tendência ligeiramente crescente da fluorescência emitida ao longo do tempo pode indicar uma boa seleção da cultura produtora de PHA. No entanto seria necessário uma quantificação (através de cromatografia gasosa, por exemplo) do biopolímero produzido para se estabelecer essa relação e poder tirar conclusões positivas acerca da seleção da cultura.

4.2.2.5 Análise global do funcionamento do reator

1. Relacionar a quantidade de flocos observada ao longo do tempo com as condições de operação do reator:

O número de microflocos ao longo da experiência foi cerca de dez vezes superior ao número de mesoflocos e cem vezes superior ao número de macroflocos.

A variação da quantidade de microflocos no decorrer da experiência parece estar relacionada com a variação da concentração da carga orgânica alimentada ao reator, revelando valores inferiores quando a carga orgânica apresentou valores mais baixos.

2. Relacionar a percentagem ocupada pelos flocos ao longo do tempo com as condições de operação do reator:

A percentagem de área ocupada pelos microflocos, mesoflocos e macroflocos apresentou uma evolução aproximadamente sinusoidal ao longo do tempo, tendo sido registados valores superiores para a classe de flocos de maiores dimensões, como esperado.

A percentagem de área ocupada pelos microflocos parece não ter uma correlação direta com as condições impostas neste reator em particular.

3. Relacionar a evolução da formação e morfologia dos flocos ao longo do tempo com as condições de operação do reator:

Os parâmetros de solidez e circularidade revelaram que os microflocos se apresentaram , relativamente às restantes classes, como mais compactos e com superfície menos irregular, confirmando as observações microscópicas das amostras retiradas do reator. No entanto, não foram encontradas relações diretas entre estas características morfológicas dos agregados microbianos e os parâmetros físico-químicos monitorizados durante a operação deste reator.

4. Verificar a evolução do número e variedade das espécies de protozoários existentes nas amostras recolhidas e correlacioná-las com as condições de operação do reator;

Para este reator não foi possível concluir acerca da existência de uma correlação entre a quantidade total da microfauna e os parâmetros da operação do reator. Desta forma, propõe-se, para um estudo futuro, a análise de parâmetros físico-químicos adicionais ou o desenvolvimento de diferentes técnicas microbiológicas, por forma a poder relacionar as condições do reator com a microfauna observada.

O tipo de lamas predominantes neste reator teve uma baixa eficácia de depuração e a uma atividade microbiológica reduzida, o que corresponde, segundo o SBI, a lamas de classe IV. No entanto, em três dias de amostragem distintos (0, 20 e 62) as lamas obtiveram uma classificação de nível II, correspondendo a lamas estáveis e com eficácia de depuração suficiente. Isto deveu-se ao facto de o grupo de protozoários dominante observado nesses dias ter sido de ciliados sésseis, aliado à grande diversidade microbiológica observada nas amostras retiradas nesses dias.

5. Verificar a intensidade de fluorescência emitida pelos grânulos corados com Azul de Nilo dos organismos acumuladores de PHA ao longo do tempo e correlacioná-la com as condições de operação dos reatores.

A intensidade de fluorescência emitida pelos grânulos de PHA apresentou valores máximos nos dias de operação 35 e 62, coincidindo com o registo de valores elevados do número de microflocos no reator. A variação dos valores da intensidade de fluorescência emitida é semelhante

à observada para os valores da quantificação dos microflocos, podendo existir algum tipo de relação entre a intensidade de fluorescência emitida e a abundância desta classe de flocos.

4.2.3 SBR3

Os parâmetros físico-químicos determinados para este reator foram: a concentração de sólidos suspensos; a carga orgânica alimentada ao reator; e CQO de entrada e saída do reator, tal como para os reatores SBR analisados anteriormente.

Foram retiradas, no total, 9 amostras de lamas frescas nos 38 dias de operação do reator. Foram analisados os parâmetros biológicos seguintes: número de flocos; percentagem de área ocupada pelos flocos; circularidade dos flocos; solidez dos flocos; densidade da microfauna; e intensidade de fluorescência emitida pelos grânulos de PHA.

4.2.3.1 Análise físico-química do funcionamento do reator

A evolução temporal da concentração de sólidos suspensos (SST e SSV) apresenta-se na Figura 60.

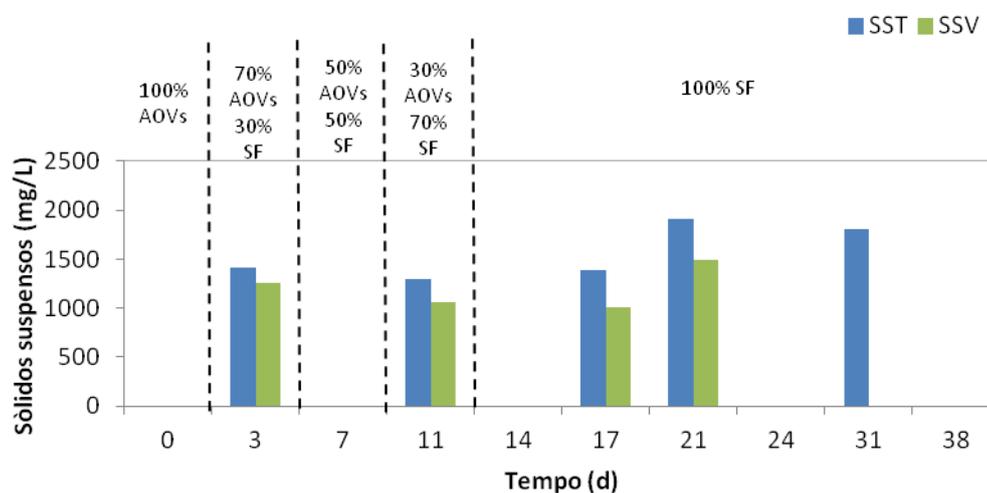


Figura 60: Sólidos suspensos totais e sólidos suspensos voláteis ao longo do estudo (AOVs – ácidos orgânicos voláteis; SF – Soro fermentado).

A escassez de resultados de sólidos suspensos obtidos comprometeu a tentativa de correlacionar este parâmetro com parâmetros biológicos, tendo sido difícil obter conclusões para a relação destes parâmetros.

A Figura 61 ilustra a variação da carga orgânica ao longo do tempo experimental.

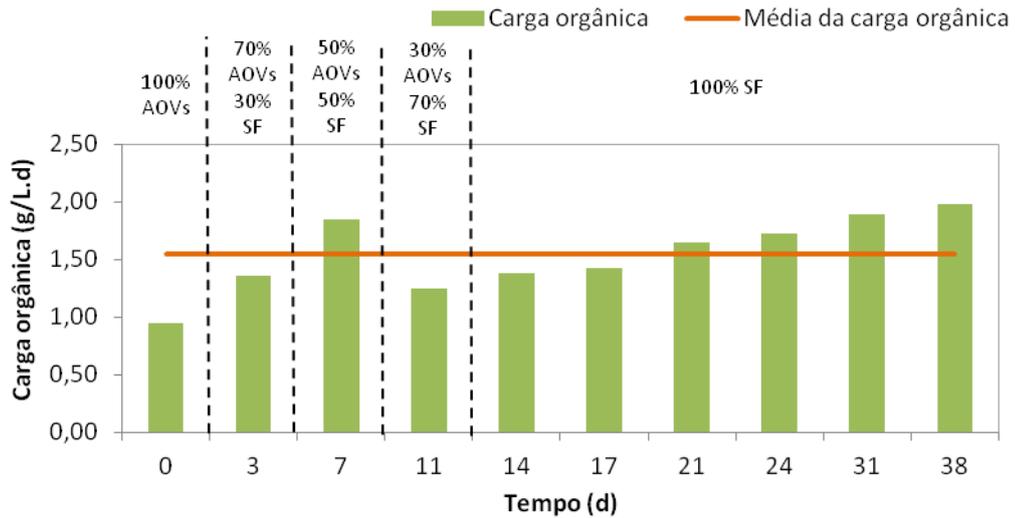


Figura 61: Variação da carga orgânica ao longo do tempo
(AOVs – ácidos orgânicos voláteis; SF – Soro fermentado).

Tentou manter-se a carga orgânica a um valor constante de 1,5g/L.d, no entanto verificaram-se variações da mesma ao longo do tempo, possivelmente devido à variação das concentrações de AOVs no soro fermentado, proveniente do reator MBBR, e também devido aos erros associados ao operador. Verifica-se para o quarto período de alimentação (30% AOVs – 70% soro fermentado) um decréscimo na carga orgânica, quando no período anterior de verificou um valor próximo dos registados nos três últimos dias de operação.

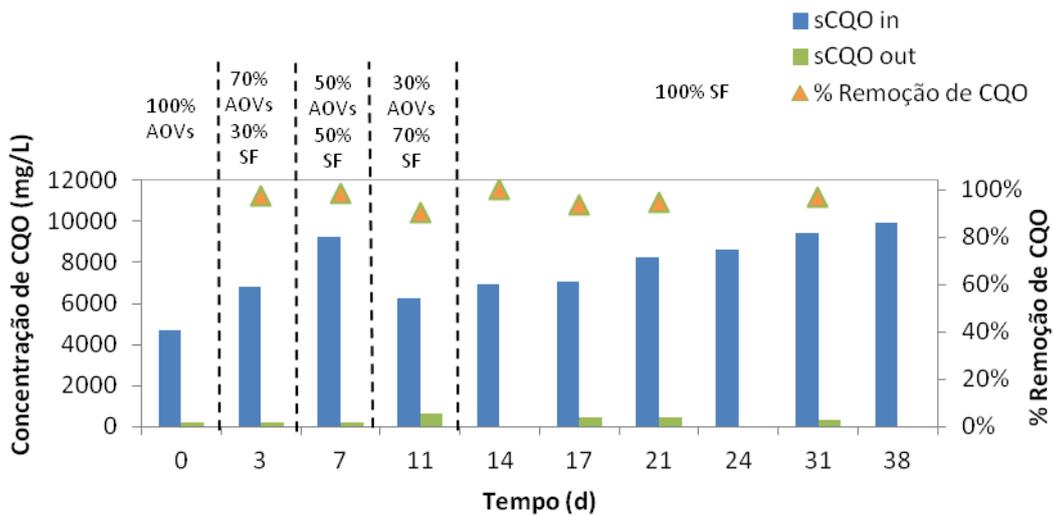


Figura 62: Concentração de entrada e saída de CQO e percentagem de remoção de CQO ao longo do tempo. (AOVs – ácidos orgânicos voláteis; SF – Soro fermentado).

A percentagem de remoção de CQO manteve-se superior a 94% durante todo o ensaio, como se pode verificar na Figura 62. Os valores da carga orgânica refletem-se nos valores obtidos de CQO de entrada, que apresentam uma evolução geral crescente ao longo do tempo. Não foram registados parâmetros biológicos durante o período de alimentação a 30% de AOVs e 70% de soro fermentado devido à impossibilidade de comparecimento no laboratório durante o tempo em que esta fase decorreu.

4.2.3.2 Análise dos agregados microbianos presentes no reator

i) Número de flocos

A abundância dos diferentes tipos de flocos no reator durante a experiência apresenta-se na Figura 63.

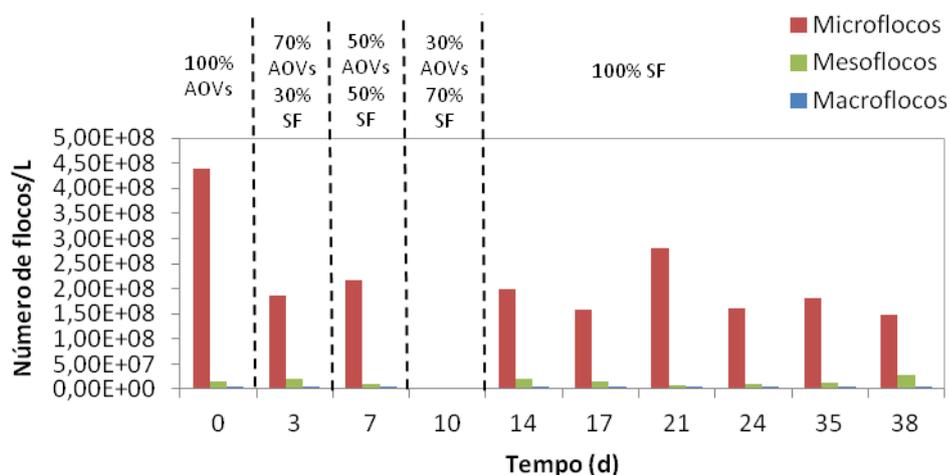


Figura 63: Número de flocos ao longo do estudo.

Ao longo do ensaio verificou-se uma maior abundância do número de microflocos relativamente às outras classes de flocos, tendo atingido valores 100 vezes superiores aos registados para as outras classes. Os macroflocos mantiveram-se sempre em menor número, apresentando um valor máximo próximo de 6×10^6 , nunca ultrapassando os valores registados pelos mesoflocos, que apresentaram uma média de $1,50 \times 10^7$. No arranque do reator observou-se o valor máximo de flocos registados de todo o ensaio ($4,40 \times 10^8$), tendo baixado significativamente nas fases de alimentação seguintes, para uma média de $1,90 \times 10^8$. Isto pode indicar uma preferência do desenvolvimento de agregados microbianos pequenos para condições em que a alimentação seja exclusivamente constituída por AOVs. No entanto teriam de ser obtidos mais dados microbiológicos para ser possível fomentar esta hipótese.

ii) Percentagem de área ocupada pelos flocos

A Figura 64 ilustra a percentagem de área ocupada pelos flocos durante o ensaio.

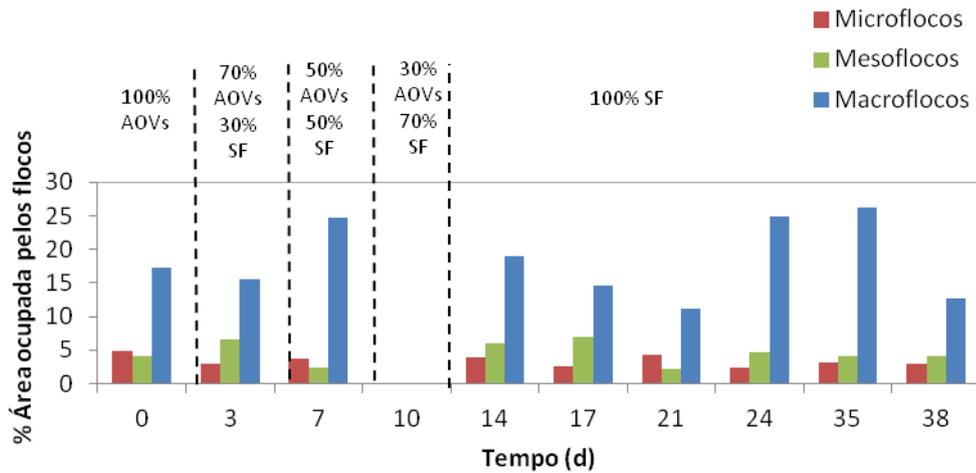


Figura 64: Percentagem de área ocupada pelos flocos.

A evolução das percentagens de área ocupada pelos microflocos e mesoflocos manteve-se relativamente constante ao longo do tempo. Registou-se para os flocos de maior dimensão variações mais acentuadas ao longo do tempo, verificando-se valores superiores para o dia 7, inserido no período de alimentação a 50% de AOVs e 50% de soro fermentado, e para os dias 24 e 35, no período de alimentação a 100% de soro fermentado. Para estes dias de operação verificaram-se valores acima da média da carga orgânica (Figura 61), pelo que pode existir uma correlação entre ambos os parâmetros.

iii) Características morfológicas dos flocos

Durante a maior parte do tempo de operação do reator SBR3 existiram, em simultâneo, dois tipos de flocos: flocos fracos, difusos e irregulares; e flocos compactos, difusos e irregulares. No entanto, verificou-se a predominância do primeiro tipo de flocos nos primeiros dias de operação, tendo-se verificado, posteriormente, um aumento gradual ao longo do tempo dos flocos compactos. Os flocos de aparência fraca verificados para o dia de arranque do reator corresponderam a microflocos.

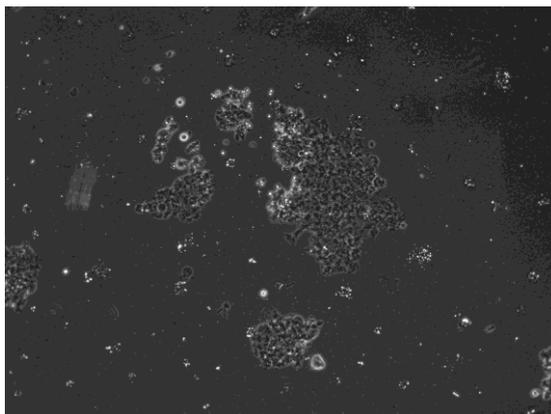


Figura 65: Flocos encontrados na amostra do dia 14 de operação do reator SBR3. Ampliação a 100x.

Nas Figuras 66 e 67 são apresentados, respectivamente, os valores de solidez e circularidade dos diferentes tipos de flocos ao longo do tempo, para o reator SBR3.

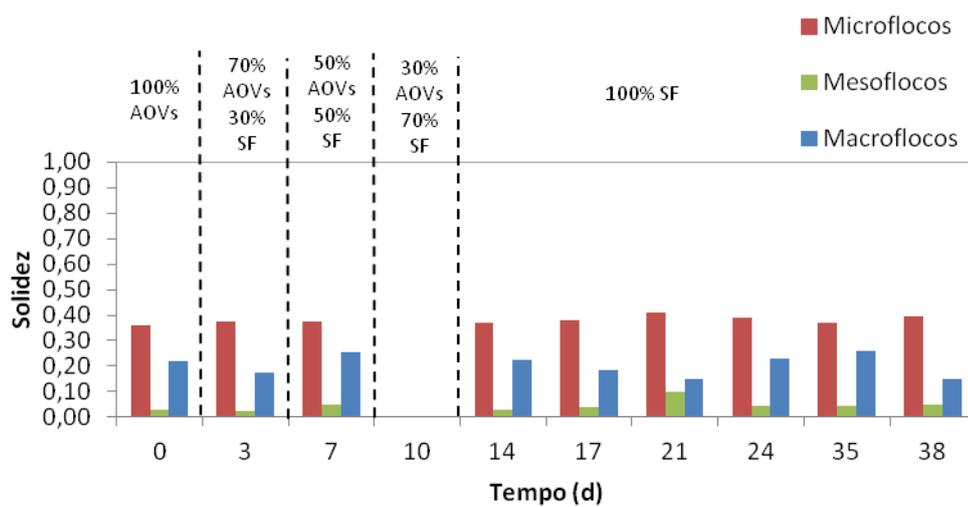


Figura 66: Solidez dos flocos.

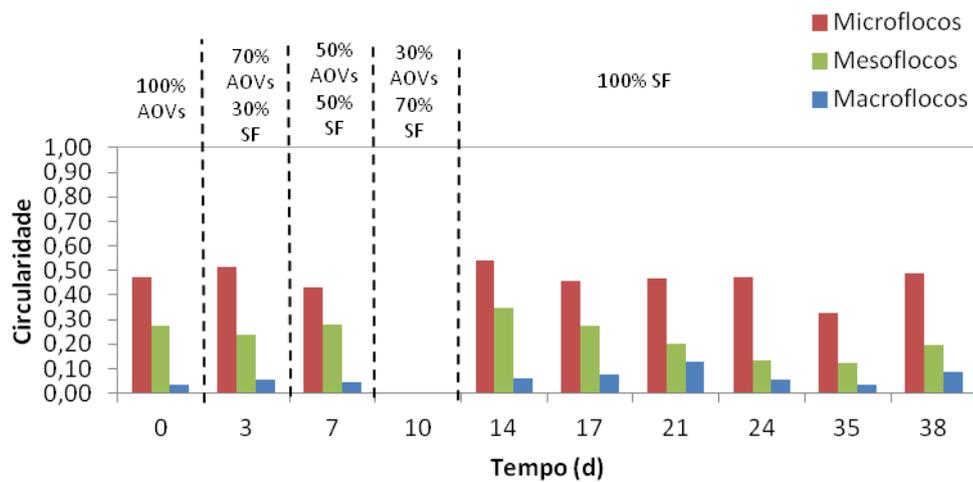


Figura 67: Circularidade dos flocos.

Os microflocos apresentam valores mais elevados de solidez e circularidade relativamente às outras classes de flocos. No entanto, nenhuma das classes de flocos apresentou valores de ambos os parâmetros acima dos 0,60, revelando flocos que ocuparam um espaço considerável no meio líquido, avaliando pelos valores muito reduzidos de solidez (média de 0,20) e apresentaram uma superfície irregular, tendo em conta os baixos valores da circularidade.

Os parâmetros morfológicos não parecem ter sido influenciados pelas alterações efetuadas na alimentação deste reator.

4.2.3.3 Análise da microfauna presente no reator

Foi efetuada a contagem do número total de protozoários e posteriormente determinado o índice biótico de lamas de forma a caracterizar a eficiência depuradora do sistema. O registo da comunidade microbiana ao longo do tempo encontra-se ilustrado nas Figuras 68 e 69.

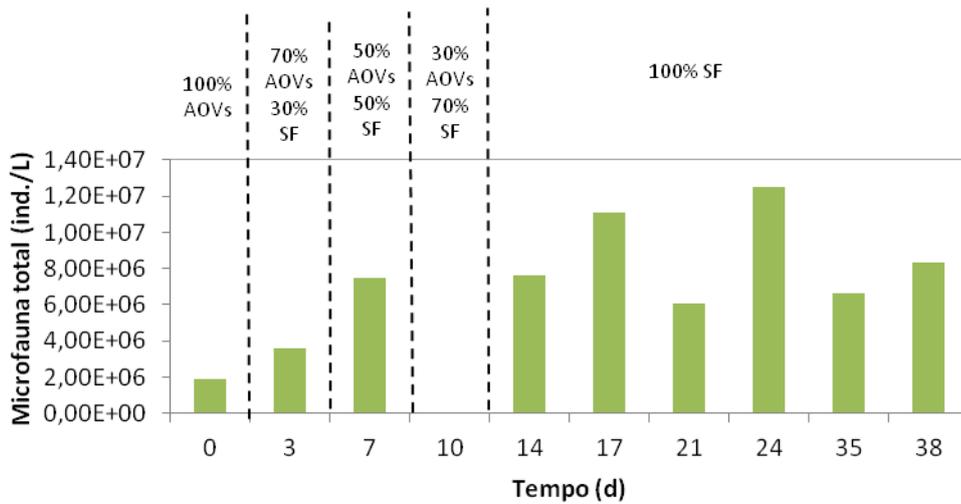


Figura 68: Evolução da microfauna total em indivíduos por litro ao longo do tempo.

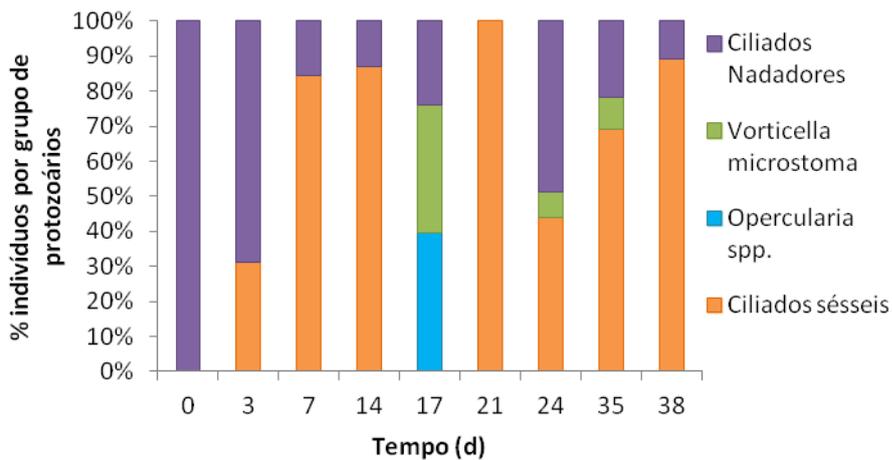


Figura 69: Percentagens de indivíduos por grupo de protozoários ao longo do tempo.

A abundância dos protozoários no reator variou ao longo do tempo, registrando-se para os dias 17 e 24 os valores mais elevados, de $1,10 \times 10^{07}$ e $1,25 \times 10^{07}$. A variação do número total dos protozoários no decorrer do ensaio pareceu aproximar-se da variação observada para a percentagem de área ocupada pelos macroflocos no reator.

Com o aumento da percentagem de soro fermentado na alimentação, parece haver um aumento da percentagem de ciliados sésseis nas amostras analisadas (exceto para o dia 17 de operação). Inicialmente, os ciliados nadadores encontravam-se em maioria, diminuindo

drasticamente a quantidade ao longo do tempo. A alteração do pico de microfauna no reator pode estar diretamente relacionado com as condições impostas, nomeadamente a composição da alimentação dada ao reator.

A Tabela 14 ilustra a quantidade de protozoários por grupo contabilizados aquando da observação das amostras retiradas do reator SBR3.

Tabela 14: Quantificação dos protozoários presentes no reator por grupos, nos diferentes dias de amostragem.

<i>Dia de operação</i>	<i>Número total de espécies</i>	<i>Ciliados Móveis de Fundo + Sésseis e/ou Amibas com Teca (ind./L)</i>	<i>Ciliados Sésseis > 80% (ind./L)</i>	<i>Opercularia spp. (ind./L)</i>	<i>Vorticella microstoma (ind./L)</i>	<i>Ciliados Nadadores (ind./L)</i>	<i>Pequenos Flagelados (ind./L)</i>	<i>Microfauna total (ind./L)</i>
0	3	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	<u>1,87E+06</u>	5	1,87E+06
3	3	n.o.	1,12E+06	n.o.	n.o.	<u>2,45E+06</u>	n.o.	3,57E+06
7	6	n.o.	<u>6,35E+06</u>	n.o.	n.o.	1,17E+06	n.o.	7,52E+06
14	7	n.o.	<u>6,60E+06</u>	n.o.	n.o.	1,00E+06	n.o.	7,60E+06
17	5	n.o.	n.o.	<u>4,40E+06</u>	4,05E+06	2,63E+06	n.o.	1,11E+07
21	6	n.o.	<u>6,10E+06</u>	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	6,10E+06
24	4	n.o.	5,50E+06	n.o.	9,00E+05	<u>6,08E+06</u>	32	1,25E+07
35	6	n.o.	<u>4,60E+06</u>	n.o.	6,00E+05	1,45E+06	n.o.	6,65E+06
38	7	n.o.	<u>7,45E+06</u>	n.o.	n.o.	9,00E+05	4	8,35E+06

n.o. – Não observado

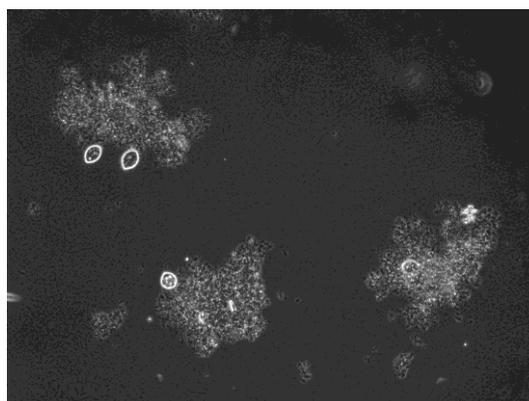


Figura 70: Protozoários no dia 24 de operação do reator SBR3. Ampliação a 100x-

Na Tabela 15 são apresentados os valores determinados de SBI e correspondentes classes de lamas do sistema em estudo.

Tabela 15: Determinação do SBI e classificação das lamas no reator.

<i>Dia de operação (d)</i>	<i>SBI</i>	<i>Classe das lamas</i>
0	2	IV
3	2	IV
7	7	II
14	7	II
17	5	III
21	6	II
24	4	IV
35	7	II
38	7	II

Como se pode constatar pelos valores obtidos de SBI, determinados através da tabela de duas entradas (Tabela 6), as lamas deste reator apresentaram uma classificação geral boa (classe II). Isto significa que as lamas possuem uma boa colonização e são estáveis, e têm uma capacidade de depuração suficiente. No entanto, no dia de arranque do reator e nos dias 3 e 24 de operação, as lamas obtiveram uma classificação menos desejável num reator aeróbio (classe IV), que corresponde a lamas com uma baixa eficácia de depuração e a uma atividade microbiológica reduzida.

4.2.3.4 Intensidade de fluorescência

A intensidade de fluorescência foi registada para todos os dias de amostragem, num total de nove medições, e apresenta-se na Figura 71.

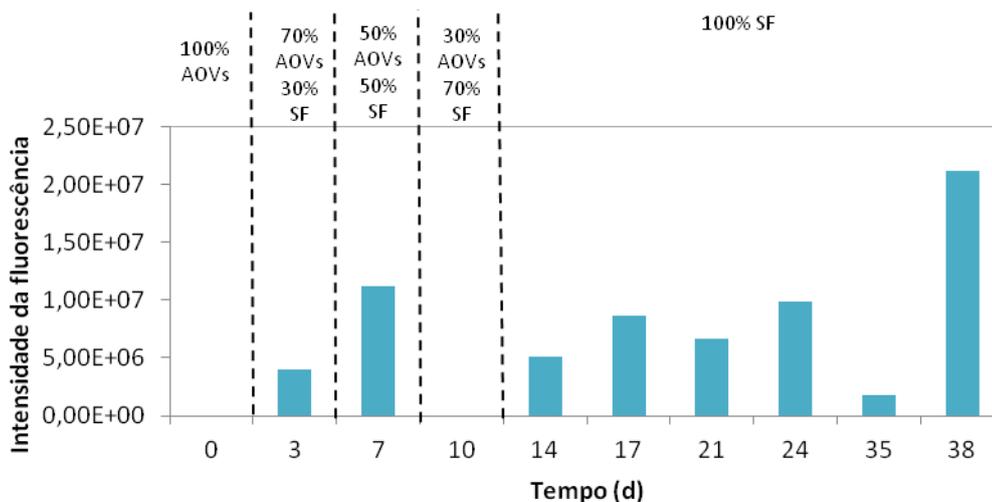


Figura 71: Intensidade de fluorescência ao longo do tempo.

A intensidade emitida pelos grânulos de PHA corados com Azul de Nilo variou ao longo do ensaio, tendo apresentado valores maiores no terceiro período (50% AOVs – 50% soro fermentado) e no último período (100% soro fermentado).

Os valores máximos observados para os dias 7 e 38 na intensidade da fluorescência pareceram coincidir com valores elevados de carga orgânica (Figura 61) e dos sólidos suspensos (Figura 60). No entanto não é possível concluir com certeza a causa provável de um aumento tão acentuado nos valores de fluorescência emitida pelos flocos corados nestes dias de operação.

4.2.3.5 Análise global do funcionamento do reator

1. Relacionar a quantidade observada de flocos ao longo do tempo com as condições de operação do reator:

Foi observada microscopicamente, ao longo do ensaio, uma abundância do número de microflocos muito superior à verificada para os macroflocos, tendo estes atingido valores 100 vezes superiores aos valores das restantes classes. Os macroflocos e os mesoflocos apresentaram sempre valores muito reduzidos, com uma média de $1,50 \times 10^7$ no caso dos mesoflocos e uma média de $5,20 \times 10^6$ para os macroflocos.

Observou-se um decréscimo geral do número de microflocos ao longo do tempo de operação do reator, o que pode indicar uma preferência do desenvolvimento de agregados microbianos pequenos de sistemas com elevadas concentrações de AOVs provenientes de fonte sintética. De forma a ser possível comprovar esta hipótese, teriam de ser obtidos mais dados ao longo do tempo num futuro estudo.

2. Relacionar a percentagem ocupada pelos flocos ao longo do tempo com as condições de operação do reator:

A percentagem de área ocupada pelos microflocos e mesoflocos não sofreu alterações significativas ao longo da experiência. Já para os macroflocos foram verificadas variações mais acentuadas ao longo do tempo, destacando-se os valores do dia 7, no período de alimentação a 50% de AOVs e 50% de soro fermentado, e dos dias 24 e 35, no período de alimentação a 100% de soro fermentado. Também para estes dias de operação foram registados valores acima da média da carga orgânica, podendo existir uma correlação entre estes parâmetros.

3. Relacionar a evolução da formação e morfologia dos flocos ao longo do tempo com as condições de operação do reator:

Foram identificados nas amostragens do reator SBR3 a coexistência de dois tipos de flocos: flocos fracos, difusos e irregulares; e flocos compactos, difusos e irregulares. O primeiro tipo de flocos foi predominante nos primeiros dias de operação, observando-se, nos dias seguintes, um aumento gradual dos flocos compactos.

Nenhuma das classes de flocos apresentou valores de circularidade e solidez acima dos 0,60, traduzindo-se em flocos com estruturas difusas e com uma superfície irregular.

Os parâmetros morfológicos não aparentam ter sido influenciados pelas fases de alimentação aplicadas a este reator.

4. Verificar a evolução do número e variedade das espécies de protozoários existentes nas amostras recolhidas e correlacioná-las com as condições de operação do reator;

Os valores mais elevados da quantidade total de protozoários contabilizados nas amostras foram observados nos dias 17 e 24, de $1,10 \times 10^{07}$ e $1,25 \times 10^{07}$, respetivamente. A variação temporal do número total dos protozoários assemelha-se ligeiramente da variação da percentagem de área ocupada pelos macroflocos no reator ao longo do tempo.

Segundo os resultados obtidos após o cálculo do SBI foi possível caracterizar as lamas deste reator, para a maioria dos dias, como lamas que possuem uma boa colonização e são estáveis, e têm uma capacidade de depuração suficiente. No entanto, as lamas obtiveram uma classificação indesejável para três dias de amostragem distintos (0, 3 e 24), que correspondeu a lamas com uma baixa eficácia de depuração e a uma atividade microbiológica reduzida.

5. Verificar a intensidade de fluorescência emitida pelos grânulos corados com Azul de Nilo dos organismos acumuladores de PHA ao longo do tempo e correlacioná-la com as condições de operação dos reatores.

Os valores mais elevados determinados para a intensidade de fluorescência emitida ocorreram no terceiro período (50% AOVs – 50% soro fermentado), no dia 7 e no último período (100% soro fermentado), no dia 38. Estes valores pareceram coincidir com os valores máximos da carga orgânica e dos sólidos suspensos registados nos mesmos dias de operação. No entanto, não foram encontradas causas possíveis para o aumento abrupto dos valores de intensidade de fluorescência no dia 38 de operação do reator, pelo que num futuro estudo, aconselha-se o aumento da frequência de amostragem num reator com este tipo de alimentação, procedendo-se à determinação mais regular dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos.

5 Considerações gerais dos resultados obtidos

Através da análise dos resultados obtidos referentes aos reatores acidogénicos foi possível obter as seguintes conclusões:

- i) Nas observações efetuadas ao microscópio das amostras de ambos os tipos de reator (MBBR e descontínuos) apenas foram detetadas fluorescências de fundo que não correspondiam à presença de bactérias metanogénicas. Esta observação, aliada ao facto de terem sido registadas percentagens médias de remoção de CQO baixas (abaixo ou aproximadamente iguais a 30%) e à produção de AOVs confirmam a operação destes reatores como reatores acidogénicos (exceto o reator C).
- ii) A amostra final retirada do reator descontínuo C indicou a presença de protozoários no sistema, que vieram a alterar a sua operação ideal como reator acidogénico. Neste reator foi verificada uma percentagem de remoção de CQO na ordem dos 90% e um decréscimo na produção de AOVs ao longo do tempo, pelo que se pode concluir que a presença de protozoários em reatores descontínuos de acidificação causa uma alteração negativa no sistema, inibindo a produção de AOVs.
- iii) Nos reatores descontínuos (exceto o C), foi verificada uma diminuição crescente da percentagem de área ocupada pelos microflocos ao longo do tempo, podendo existir uma relação entre esta e a crescente produção de AOVs, tal como verificado para o reator MBBR. No entanto, nestes reatores, a biomassa está sempre presente no reator, e as amostras são retiradas à saída do mesmo, pelo que as causas poderão não ser as mesmas. Foi verificado que a percentagem ocupada pelos mesoflocos sofreu uma diminuição para valores de F/M superiores a 3,8, chegando mesmo a não se verificar a presença deste tipo de flocos nos reatores que apresentaram os valores mais elevados de alcalinidade (1,97 – D; 2,05 – H; e 2,50 – F). Através da análise destes resultados pode existir uma relação entre a formação de mesoflocos e as condições de operação do reator, nomeadamente a variação da razão F/M e da alcalinidade.
- iv) Foi possível verificar, nos reatores descontínuos, que para razões de F/M superiores a 4,0 a percentagem de área dos microflocos diminuiu ao longo do tempo, observando-se o mesmo para os mesoflocos para razões de F/M iguais ou

superiores a 2,0. A alcalinidade pareceu não alterar a percentagem de área ocupada pelos microflocos. Já no caso dos mesoflocos, estes não se observaram na amostra final dos reatores que possuíam uma alcalinidade superior a 1,95.

- v) A razão F/M e alcalinidade parecem não ter tido influência nas características morfológicas dos microflocos nos diferentes reatores descontínuos acidogénicos. Já no caso dos mesoflocos foi possível observar o decréscimo dos valores da solidez e circularidade no final da experiência nos reatores com uma razão F/M superior a 3,8.
- vi) É possível concluir que a classe de flocos de médias dimensões é mais propensa a sofrer alterações a nível morfológico e de percentagem de área ocupada com a variação da razão F/M e da alcalinidade em reatores descontínuos acidogénicos, relativamente à classe de flocos de pequenas dimensões.
- vii) No reator MBBR verificou-se uma relação entre o número de flocos de pequena dimensão observados ao microscópio nas amostras à saída do reator e a produção de AOVs, sendo esta maior quando o número de microflocos observados era menor. Uma causa possível para esta relação aparente tem a ver com a quantidade de biomassa presente no reator aquando da determinação dos valores da produção de AOVs. Com a observação de um maior número de microflocos à saída do reator, supõe-se uma quantidade menor de biomassa dentro do reator, fazendo com que se verifique um decréscimo na produção de AOVs. De forma a poder fomentar esta hipótese, teriam de ser recolhidas mais amostras biológicas à saída e interior do reator assim como uma determinação mais frequente dos parâmetros de operação do reator.
- viii) Foi possível observar na segunda fase de operação do reator MBBR (alcalinidade = 2000 mgCaCO₃/L) o aparecimento de macroflocos nas amostras à saída do reator, com uma percentagem de área superior à das restantes classes de flocos. Os dias em que se verifica este tipo de flocos (17, 23 e 44) são dias em que se observam valores de AOVs superiores à média, pelo que pode existir uma correlação entre os macroflocos, que são grandes agregados de biomassa que esteve presente no interior do reator, e a produção de AOVs.
- ix) Para o reator MBBR foram definidas duas fases de operação, a primeira com alcalinidade 0 mgCaCO₃/L, e a segunda com alcalinidade de 2000 mgCaCO₃/L. No

segundo período de operação do reator observou-se ao microscópio a presença de flocos compactos, firmes e irregulares, cujas características podem ser confirmadas analisando os valores baixos (abaixo de 0,50) obtidos para a solidez e circularidade dos flocos. Os macroflocos apresentaram os menores valores de solidez (0,20) e circularidade (0,10), revelando uma superfície bastante irregular quando comparado com os restantes tipos de flocos. A superfície irregular dos flocos de maior dimensão promove a coesão da biomassa, e promove, conseqüentemente uma maior produção de AOVs para as condições de operação deste reator. Apenas foram retiradas duas amostras durante o primeiro período de operação do reator, não sendo possível encontrar correlações entre as características morfológicas dos agregados microbianos e as condições de operação, pelo que se aconselha, num futuro estudo, a aumentar a frequência de amostragem para análises biológicas e físico-químicas.

Relativamente aos reatores aeróbios foi possível concluir o seguinte:

- i) Nos três reatores SBR analisados não foi observada, ao longo de todos os ensaios, uma quantidade significativa de substâncias poliméricas extracelulares (EPS), pelo que as condições de operação poderão ter inibido o desenvolvimento das mesmas.
- ii) Em todos os reatores SBR foi observada uma predominância do número de microflocos nas amostras analisadas microscopicamente, relativamente aos mesoflocos e aos macroflocos. Para os reatores SBR1 e SBR2 a evolução do número de flocos de pequenas dimensões ao longo do tempo assemelhou-se à evolução obtida para a carga orgânica, podendo existir uma correlação positiva entre ambos os parâmetros. Já no reator SBR3 observou-se uma variação inconstante do número de microflocos ao longo do tempo, que não coincidiu com a tendência geral crescente da carga orgânica, o que poderá indicar que a variação gradual e faseada da alimentação do reator com AOVs e soro fermentado iniba a correlação entre estes dois parâmetros.
- iii) O aumento da percentagem de área ocupada pelos mesoflocos no reator SBR1 nos dias de operação 50, 57 e 71 pareceu coincidir com valores reduzidos de sólidos suspensos totais e sólidos suspensos voláteis no reator, assim como com a diminuição da carga orgânica para esses dias. As restantes classes de flocos

presentes neste reator não apresentaram uma relação direta com nenhum dos parâmetros físico-químicos analisados neste estudo.

- iv) No reator SBR2 não se verificou uma relação direta entre a variação da porcentagem de área ocupada pelas diferentes classes de flocos e as condições de operação no reator.
- v) A porcentagem de área ocupada pelos macroflocos no reator SBR3 revelou valores superiores no período de alimentação a 50% de AOVs e 50% de soro fermentado e no último período de alimentação (100% soro fermentado), que coincidiram com valores acima da média da carga orgânica, podendo existir uma correlação entre estes parâmetros. As porcentagens de área ocupada pelas restantes classes não aparentam ter uma relação direta com as condições impostas no sistema.
- vi) Os parâmetros físico-químicos analisados durante a operação dos reatores SBR parecem não influenciar diretamente as características morfológicas dos agregados microbianos. Os flocos observados microscopicamente revelaram-se sempre como tendo bordas irregulares, o que pôde ser confirmado através dos valores da circularidade obtidos por análise e processamento de imagem.
- vii) Não foi encontrada uma relação direta entre a variação da densidade total dos protozoários quantificada nas amostras recolhidas de diferentes reatores SBR e os parâmetros físico-químicos de operação analisados neste estudo. No entanto, foi possível observar nos reatores, ao longo do ensaio, uma maior abundância, no geral, de ciliados nadadores relativamente aos restantes grupos de protozoários identificados, provavelmente porque o modo de operação dos reatores proporcionou condições que potenciaram a proliferação deste tipo de protozoário.
- viii) Nos reatores aeróbios SBR1 e SBR2 verificou-se uma semelhança, dentro das condições de cada reator, da variação ao longo do tempo de intensidade de fluorescência emitida e a abundância de microflocos ao longo do ensaio, podendo existir uma correlação entre estes dois parâmetros. No SBR3, a intensidade de fluorescência emitida destacou-se nos dias 7 (50% AOVs – 50% soro fermentado) e 38 (100% soro fermentado), que coincidiram com os valores máximos da carga orgânica e dos sólidos suspensos. No entanto, não foi possível explicar o aumento abrupto do valor da intensidade registado no dia 38.

6 Conclusões e trabalho futuro

Este trabalho teve como objetivo principal o controlo microbiológico, através de análise microscópica, de amostras recolhidas de 12 reatores distintos: um reator MBBR de acidificação, oito reatores descontínuos de acidificação e três reatores SBR aeróbios. Ao longo de trabalho foi possível monitorizar através de métodos microscópicos as variações morfológicas das populações microbianas dentro dos reatores e correlacioná-las com os parâmetros de operação dos mesmos. Foi também possível seguir a evolução do processo de seleção de uma cultura com elevada capacidade de acumulação de biopolímeros nos reatores aeróbios.

Foram utilizados métodos rápidos, simples e rotineiros de microscopia para efetuar as observações microbiológicas das amostras retiradas ao longo deste estudo, e foi aplicado um tratamento e análise de imagem simples e reprodutível de forma a quantificar os parâmetros biológicos estudados.

Uma das características morfológicas dos agregados microbianos observados ao microscópio (superfície dos flocos) pôde ser confirmada através dos valores obtidos da circularidade por análise a processamento de imagem.

Foi possível concluir que a presença de protozoários num reator acidogénico descontínuo afeta o equilíbrio do sistema, inibindo a produção de AOVs e aumentando a percentagem de remoção de CQO.

Os mesoflocos aparentaram ser a classe de flocos mais suscetível a valores elevados de alcalinidade ($\geq 1,97$) e razão de F/M ($\geq 3,8$), em reatores acidogénicos descontínuos.

Verificou-se o que aparenta ser uma correlação positiva entre a quantidade de flocos de pequenas dimensões nos reatores aeróbios alimentados apenas com soro fermentado e a variação da carga orgânica, assim como para a intensidade de fluorescência emitida pelos grânulos de PHA corados com azul de Nilo.

Para um futuro estudo, apresentam-se as seguintes considerações:

- i) Adotar uma maior frequência de amostragem para análise microbiológica e físico-química das amostras;
- ii) Estudar uma variedade maior de parâmetros biológicos e físico-químicos;
- iii) Utilizar ou desenvolver diferentes métodos de análise microbiológica de acordo com os tipos de reator a estudar;
- iv) Analisar estatisticamente os resultados obtidos de forma a tentar estabelecer correlações numéricas entre as variáveis em estudo;
- v) Desenvolver um método para determinação da concentração de PHA com o equipamento disponível no laboratório e correlacioná-lo com o método da determinação da intensidade de fluorescência emitida descrito neste trabalho ou com outro método em que se obtenha a mesma informação.

7 Referências bibliográficas

Al-Yousfi, A. B., Mason, S. H., Romagnoli, R. J. e Williams, J. B. (2000). Viscous Sludge Bulking Due to Zooglea Proliferation at an Industrial Wastewater Treatment Plant: Background Causes and Remedies. "Proceedings of the 1st World Congress of IWA", Paris.

Amaral, A. L. P. (1998). Desenvolvimento de técnicas de análise de imagem para aplicação em processos biotecnológicos. Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho. Mestrado, 156.

Amaral, A. L. P. (2003). Image analysis in biotechnological processes: applications to wastewater treatment. Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho. Doutorado, 240.

Amaral, A. L. P., Mota, M. e Ferreira, E. C. (1999). Aplicações de técnicas de análise de imagem em microbiologia ambiental. Actas da 6ª Conferência Nacional sobre a Qualidade do Ambiente. Lisboa. 2, 29-38.

Amaral, A. L. P., Pereira, M. A., Neves, L. M. G. F., Da Motta, M., Pons, M. N., Vivier, H., Ferreira, E. C. e Alves, M. M. d. S. (2001). Characterization by image analysis from two EGSB reactores treating oleic acid: automatic detection of granules disintegration. 9th World Congress on Anaerobic Digestion. Technologisch Institute. 1, 89-94.

APHA (1998). Standard Methods for the examination of water and wastewater. W. E. F. American Water Works Association. Washington, American Public Health Association.

Aygun, A., Nas, B. e Berktaş, A. (2008). "Influence of High Organic Loading Rates on COD Removal and Sludge reduction in Moving Bed Biofilm Reactor." Environmental Engineering Science 25(9).

Belgacem, M. N. e Gandini, A. (2008). Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources, Elsevier, 552.

Bema, J. L., Gassani, G., Hager, C.-D., Rehman, N., López, I., Schowanek, D., Steber, J., Taeger, K. e Wind, T. (2007). "Anaerobic Biodegradation of Surfactants - Scientific Review." Tenside Surfactants Detergents 44(6), 313-347.

Bento, A. P., Sezerino, P. H., Philippi, L. S., Reginato, V. e Lapolli, F. R. (2005). "Caracterização da microfauna em Estação de Tratamento de Esgotos do tipo Lodos Ativados: um instrumento de avaliação e controle de processo."

Bitton, G. (2005). *Wastewater Microbiology*. Hoboken, New Jersey, John Wiley & Sons, Inc.

Brinkley, J., Johnson, C. H. e Souza, R. (2007). *Moving Bed Biofilm Reactor Technology – A Full Scale Installation for Treatment of Pharmaceutical Wastewater*.

Burgess, A., Vigneron, S., Brioudes, E., Labbé, J. C., Lorca, T. e Castro, A. (2010). "Loss of human Greatwall results in G2 arrest and multiple mitotic defects due to deregulation of the cyclin B-Cdc2/PP2A balance." *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 107(28), 12564-12569.

Camp, W. W., Johnson, C. H., Tischler, L. F., Green, J. B. e Gossett, R. E. (2001). *Evaluation of Moving Bed Biofilm Reactor (MBBR) Technology for the Removal of Volatile Organic Compounds* "Proceedings of the Water Environment Federation", Water Environment Federation.

Campbell, F. C. (2004). *Manufacturing Processes for Advanced Composites*. The Boulevard, Langford Lane, Kindlington, Oxford OX5 1GB, UK, Elsevier Advanced Technology.

Choi, J. e Lee, S. Y. (1999). "Factors affecting the economics of polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation." *Applied Microbiology and Biotechnology* 51(1), 13-21.

Colin, R. e Curds, C. R. (1992). *Protozoa in the Water Industry*. Cambridge, Cambridge University Press.

Curds, C. R. e Cockburn, A. (1970). "Protozoan in Biological Sewage Processes - II. Protozoa as indicator in the activated sludge process." *Water Research* 4, 237-249.

Czaczyk, K. e Myszka, K. (2007). "Biosynthesis of Extracellular Polymeric Substances (EPS) and Its Role in Microbial Biofilm Formation." *Journal of Environmental Studies* 16(6), 799-806.

Dalientoft, E. e Thuhn, P. (1997). "The use of the Kaldnes suspended carrier process in treatment of wastewaters from the forest industry." *Water Science and Technology* 35(2-3), 123-130.

Dancey, C. e Reidy, J. (2006). *Estatística Sem Matemática para Psicologia: Usando SPSS para Windows*, Porto Alegre : Artmed, 2006.

Daniels, L. (1991). The Archaeobacteria: Biochemistry and Biotechnology. M. J. Danson, Hough, D.W. e Lunt, G.G. (Ed.). Biochemical Society Symposium nº58, Edimburgh, 181-193.

Dougherty, E. R. (1994). Digital Image Processing Methods, Taylor & Francis.

Duchène, P. e Cotteux, E. (1998). "La Problématique des Disfonctionnements Biologiques: Bulking et Moussage Biologique en Boues Activées." Tribune de L'Eau 59(5), 59-66.

Dudley, B. T., Howgrave-Graham, A. R., Bruton, A. G. e Wallis, F. M. (1993). "Image analysis to quantify and measure UASB digester granules." Biotechnol Bioeng. 42(3), 279-283.

Florida, U. (2000). Sequencing Batch Reactor Operations and Troubleshooting. TREEO Center.

Freitas, F., Alves, V. D. e Reis, M. A. M. (2011). "Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnologic alapplications." Trends in Biotechnology, 11.

Gerald, S. (2000). "'Green' Polymers." Polymer Degradation and Stability 68, 1-7.

Gerardi, M. H. e Horsfall, F. L. (1990). Wastewater Biology: The Microlife. Virginia, Water Environment Federation.

Glasbey, C. A. e Horgan, G. W. (1994). "Image analysis for the biological sciences." 23.

Gujer, W. e Zehnder, A. J. B. (1983). "Conversion Processes in Anaerobic Digestion." Water Science & Technology 15, 127-167.

Ho, P. T., Nair, L. e Visvanathan, C. (2003). "The effect of nutrients on extracellular polymeric substance production and its influence on sludge properties." Water SA 29(4).

Hrabak, O. (1992). "Industrial Production of Poly-B-hydroxybutyrate." FEMS Microbiology Reviews 103, 135-176.

Hui, Y. (2005). Characterization on the metabolism in a sequencing membrane batch reactor with deteriorated enhanced biological phosphorus removal activity. Civil Engeneering. Master of Engineering.

Jähne, B. (1997). Digital Image Processing, Springer.

Jenkins, D., Richard, M. G. e Daigger, G. T. (1993). Manual on the Causes and Control of Activated Sludge Bulking and Foaming, Lewis Publishers.

Jenkins, D., Richard, M. G. e Daigger, G. T. (2004). Manual on the Causes and Control of Activated Sludge Bulking, Foaming, and Other Solids Separation Problems, IWA Publishing.

Jing, J. Y., Feng, J., Li, W. e Xu, Y. (2009). "Removal of COD from coking-plant wastewater in the moving-bed biofilm sequencing batch reactor." Korean Journal of Chemical Engineering 26(2), 564-568.

Kalpakjian, S. e Schmid, S. R. (2008). Manufacturing processes for engineering materials.

Katz, D. A. (1998). Polymers.

Koster, I. W. (1988). Microbial, Chemical and Technological Aspects of the Anaerobic Degradation of Organic Pollutants. Biotreatment Systems. D. L. E. Wise. Boca Raton, CRC Press, 285-316.

Lee, S. Y. e Chang, H. N. (1995). "Production of Poly(hydroxyalkanoic acid)." Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology 52.

Lemos, P. C., Serafim, L. S. e Reis, M. A. M. (2006). "Synthesis of polyhydroxyalkanoates from different short-chain fatty acids by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding." Journal of Biotechnology 122, 226-238.

Madoni, P. (1994^a). "A sludge Biotic Index for evaluation of the biological performance of activated sludge based on the microfauna analysis." Water Research 28, 67-75.

Madoni, P. (1994^b). "La Microfauna nell'Analisi di Qualità Biologica dei Fanghi Attivi - Indice Biotico del Fango: SBI, Manuale di Applicazione;" Azienda Gas Acqua Consorziale di Reggio Emilia.

Madoni, P. (1996). "The Sludge Biotic Index for evaluation of the activated-sludge plant performance: the allocation of the ciliate *Acineria uncinata* to its correct functional group." Acta Protozoa 35.

Mark, J. E. (2007). Physical Properties of Polymers Handbook, Springer.

Masterton, W. L. e Hurley, C. N. (2006). Chemistry: Principles and Reactions, Updated Fifth Edition. United States of America, Thomson Brooks/Cole.

Metcalf, Eddy, I., Tchobanoglous, G., Burton, F. L. e Stensel, H. D. (2002). Wastewater Engineering: Treatment and Reuse, McGraw-Hill.

Murray, R. G. E. (1994). Determinative and cytological light microscopy. Methods for General and Molecular Vacteriology. P. Gehardt, Murray, R.G.E., Wood, W.A. e Krieg, N.R., American Society for Microbiology, Washington, DC, 21-41.

Naghetini, M. e Pinto, É. J. d. A. (2007). Correlação e Regressão. Hidrologia Estatística. E. v. Sperling and J. M. H. Soares. Belo Horizonte, CPRM, 357-358.

Neves, L. M. G. F. d. (2002). Caracterização de biomassa anaeróbia granular: análise qualitativa e quantitativa de imagem, hibridização com sondas genéticas (FISH) e técnicas histológicas. Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho. Mestrado, 102.

Nicolau, A., Martins, M. J., Mota, M. e Lima, N. (2002). A Importância da Microfauna como ferramenta de trabalho em Estações de Tratamento de Águas Residuais. ENCONTRO NACIONAL DE SANEAMENTO BÁSICO; SIMPÓSIO LUSO-BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL. Braga.

Novak, L., Larrea, L., Wanner, J. e CGarcia-Heras, J. L. (1994). "Non Filamentous Bulking Caused by Zooglea." Water Science & Technology 29(7), 301-304.

Odegaard, H., Rusten, B. e Swestrum, T. (1994). "A new moving bed biofilm reactor – applications and results." Water Science and Technology 29(10-11), 157-165.

Oshiki, M., Satoh, H. e Mino, T. (2010). "Acetate uptake by PHA-accumulating and non-PHA-accumulating organisms in activated sludge from an aerobic sequencing batch reactor fed with acetate."

Oshiki, M., Satoh, H. e Mino, T. (2011). "Rapid quantification of polyhydroxyalkanoates (PHA) concentration in activated sludge with the fluorescent dye Nile blue A." Water Science & Technology 64(3), 747-753.

Ostle, A. G. e Holt, J. G. (1982). "Nile Blue as a fluorescent stain for poly- β -hydroxybutyrate." Applied Environmental Microbiology 44, 238-241.

Packer, H. L. e Thomas, C. R. (1990). "Morphological measurements on filamentous microorganisms by fully automatic image analysis." Biotechnol Bioeng. 35(9), 870-881.

Polprasert, C. (1989). Organic Waste Recycling, John Wiley & Sons Inc.

Reis, M. A. M., Serafim, L. S., Lemos, P. C., Ramos, A. M., Aguiar, F. R. e Van Loosdrecht, M. C. M. (2003). "Production of polyhydroxyalkanoates by mixed microbial cultures." *Bioprocess and Biosystems Engineering* 25, 377–385.

Rim, Y. T., Yang, H. J., Yoon, C. H., Kim, Y. S., Seo, J. B., Ryu, J. K. e Shin, E. B. (1997). "A full-scale test of a biological nutrients removal system using the sequencing batch reactor." *Water Science & Technology* 35, 241-247.

Russ, J. C. (1995). *The Image Processing Handbook*, CRC Press.

Rusten, B., Eikebrokk, B., Ulgenes, Y. e Lygren, E. (2006). "Design and operations of the Kaldnes moving bed biofilm reactors." *Aquacultural Engineering* 34(3), 322-331.

Schnick, B. e Thauer, R. K. (1987). Energetics of Syntrophic Methane Formation and the Influence of Aggregation. "Proceedings of Granular Anaerobic Sludge: Microbiology and Technology (GASMAT) Workshop", Wageningen.

Scott, G. (1999). *Polymers and the Environment*, Royal Society of Chemistry.

Seviour, E. M., Seviour, R. J. e Lindrea, K. C. (1997). *Common Protozoa and Metazoa in Activated Sludge Plants*. B. R. Center. La Trobe University, Bendigo.

Sezgin, M. (1982). "Variation of Sludge Volume Index with Activated Sludge Characteristics." *Water Research* 16, 83-88.

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

Speece, R. E. (1983). "Anaerobic Biotechnology for Industrial Wastewater Treatment." *Environmental Science and Technology* 17, 416A-427A.

Sperling, L. H. (2006). *Introduction to physical polymer science*. Hoboken, New Jersey, John Wiley & Sons, Inc.

Sponza, D. T. (2002). "Extracellular polymer substances and physicochemical properties of flocs in steady- and unsteady-state activated sludge systems." *Process Biochemistry* 37, 983-998.

Tajalli, K. e Ipsita, R. (2010). "Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda." *Current Opinion in Microbiology*(13), 321–326.

Temper, U., Pfeiffer, W. e Bischofsberger, W. (1986). Stand und Entwicklungspotentiale der anaeroben Abwasserreinigung unter besonderer Berücksichtigung der Verhältnisse in der Bundesrepublik Deutschland Berücksichtigung der Verhältnisse in der Bundesrepublik Deutschland, München : Technische Universität München.

USEPA (1992). Sequencing Batch Reactors for Nitrifications and Nutrient Removal. W. Office of Water, D.C, U.S. Environmental Protection Agency.

USEPA (1999). Wastewater Technology Fact Sheet: Sequencing Batch Reactors. D. C. Office of Water Washington, U.S. Environmental Protection Agency.

Vogels, G. D., Keltjens, J. T. e van der Drift, C. (1988). Biology of Anaerobic Microorganisms. J. B. Z. E. Alexander, Jhon Wiley & Sons, New York, 707-770.

Weiss, J. S., Alvarez, M., Tang, C.C., Horvath, R. W. e Stahl, J. F. (2005). "Evaluation of Moving Bed Biofilm Reactor Technology for Enhancing Nitrogen Removal in a Stabilization Pond Treatment Plant." Water Environment Federation.

Wilén, B. M., Lumley, D., Mattsson, A. e Mino, T. (2008). "Relationship between floc composition and flocculation and settling properties studied at a full scale activated sludge plant."

Xiao, L. W., Rodgers, M. e Mulqueen, J. (2007). "Organic carbon and nitrogen removal from a strong wastewater using a denitrifying suspended growth reactor and a horizontal-flow biofilm reactor." Bioresource Technology 98(4), 739-744.

Yu, L. (2009). Biodegradable Polymer Blends and Composites from Renewable Resources. United States of America, John Wiley & Sons, Inc., 465.

Zeikus, J. G. (1980). Microbial Populations in Digesters. Anaerobic Digestion. D. A. Stafford, B. I. Wheatly and D. E. E. Hungus. London, Applied Science Publishers.