

# DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS DE ANÁLISE DE IMAGEM PARA QUANTIFICAR PHA, POLIFOSFATOS E GLICOGÉNIO INTRACELULAR EM ESTAÇÕES DE TRATAMENTO DE ÁGUAS RESIDUAIS

António L. P. AMARAL<sup>1</sup>; Cristiano S. LEAL<sup>2</sup>; Daniela P. MESQUITA<sup>3</sup>; Jorge R. CUNHA<sup>4</sup>; Adrian OEHMEN<sup>5</sup>; Maria A. M. REIS<sup>6</sup>; Eugénio C. FERREIRA<sup>7</sup>

## RESUMO

O processo de remoção biológica de fósforo, em estações de tratamento de águas residuais, é um processo efetuado por culturas mistas contendo organismos acumuladores de polifosfatos (PAO) e de glicogénio (GAO). No decurso deste processo os microrganismos podem formar inclusões de glicogénio, polihidroxialcanoatos (PHA) e polifosfatos (poli-P). Neste processo, é fulcral monitorizar o metabolismo intracelular para determinar a sua eficiência. Contudo, a sua monitorização, realizada através de análises químicas em diferido, é laboriosa e morosa. Deste modo, existe uma clara necessidade do desenvolvimento de métodos mais expeditos, como metodologias de análise de imagens, para a monitorização destes polímeros intracelulares. Estas técnicas foram implementadas neste estudo, encontrando-se, no caso da determinação da concentração intracelular de poli-P, em fase de desenvolvimento dos protocolos de coloração e aquisição de imagens. Para a determinação da concentração intracelular de glicogénio, foi obtida uma boa correlação inicial. Na determinação da concentração intracelular de PHA, este estudo foca-se na otimização dos protocolos de coloração e no desenvolvimento do programa de análise de imagem.

---

<sup>1</sup> Professor Adjunto, Instituto Superior de Engenharia de Coimbra, Instituto Politécnico de Coimbra, Rua Pedro Nunes, Quinta da Nora, 3030-199 Coimbra, Portugal, [lpamaral@isec.pt](mailto:lpamaral@isec.pt), Tel: 239790340, Fax: 239790340  
Investigador Doutorado, IBB- Instituto de Bioengenharia e Biotecnologia, Centro de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Campus de Gualtar, 4710-057 Braga, Portugal

<sup>2</sup> Bolseiro de Investigação, Instituto Superior de Engenharia de Coimbra, Instituto Politécnico de Coimbra, Rua Pedro Nunes, Quinta da Nora, 3030-199 Coimbra, Portugal, [cristiano.leal@isec.pt](mailto:cristiano.leal@isec.pt), Tel: 239790340, Fax: 239790340

<sup>3</sup> Bolseira de Pós-Doutoramento, IBB- Instituto de Bioengenharia e Biotecnologia, Centro de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Campus de Gualtar, 4710-057 Braga, Portugal, [daniela@deb.uminho.pt](mailto:daniela@deb.uminho.pt)  
Tel: 253604400; Fax: 253604429

<sup>4</sup> Bolseiro de Investigação, IBB- Instituto de Bioengenharia e Biotecnologia, Centro de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Campus de Gualtar, 4710-057 Braga, Portugal, [ricardocunha@ceb.uminho.pt](mailto:ricardocunha@ceb.uminho.pt), Tel: 253604400; Fax: 253604429

<sup>5</sup> Investigador Auxiliar, CQFB/REQUIMTE, Departamento de Química, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, 2829-516 Caparica, Portugal, [a.oehmen@fct.unl.pt](mailto:a.oehmen@fct.unl.pt), Tel: 212 948 571, Fax: 212 948 550

<sup>6</sup> Professor Catedrático, CQFB/REQUIMTE, Departamento de Química, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, 2829-516 Caparica, Portugal, [amr@fct.unl.pt](mailto:amr@fct.unl.pt), Tel: 212948375, Fax: 212 948 550

<sup>7</sup> Professor Catedrático, IBB- Instituto de Bioengenharia e Biotecnologia, Centro de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Campus de Gualtar, 4710-057 Braga, Portugal, [ecferreira@deb.uminho.pt](mailto:ecferreira@deb.uminho.pt), Tel: 253604400; Fax: 253604429

**Palavras-chave:** análise de imagem; glicogénio; lamas ativadas; polifosfatos; Polihidroxicanoatos (PHA)

## 1 INTRODUÇÃO

O processo de remoção biológica de fósforo, em estações de tratamento de águas residuais, é um processo efetuado por culturas mistas contendo organismos acumuladores de polifosfatos (PAO) e de glicogénio (GAO). No decurso deste processo os microrganismos podem formar inclusões de glicogénio, polihidroxialcanoatos (PHA) e polifosfatos (poli-P). Neste processo, é fulcral monitorizar o metabolismo intracelular para determinar a sua eficiência. Contudo, a sua monitorização, realizada através de análises químicas em diferido, é laboriosa e morosa. Deste modo, existe uma clara necessidade do desenvolvimento de métodos mais expeditos para a monitorização destes polímeros intracelulares, surgindo a análise de imagem como uma técnica promissora.

Apesar de comumente utilizadas, as metodologias tradicionais de coloração de poli-P por azul-de-metileno, PHA por Negro do Sudão e glicogénio por soluto de Lugol são, contudo, difíceis de implementar e extremamente dependentes de um passo de descoloração meticuloso. Este fato pode limitar esta metodologia quando se trate de flocos grandes e densos cuja descoloração poderá ser problemática. Desta forma, o uso de metodologias de coloração por corantes fluorescentes específicos, como Azul do Nilo para PHA, DAPI para poli-P e azul-de-anilina para glicogénio, pode obviar a alguns destes problemas.

Este estudo centrou-se, assim, no desenvolvimento destas metodologias de coloração por fluorescência e dos procedimentos de aquisição, processamento e análise de imagens e posterior correlação com os dados analíticos obtidos.

## 2 METODOLOGIA

### 2.1 Operação do reator e composição da alimentação

Para a realização deste trabalho foi usado um reator descontínuo sequencial de 5 L. O reator foi inoculado com lamas provenientes de uma estação de tratamento de águas residuais domésticas. Foi adotada uma estratégia por ciclos de 6 h, onde durante 2 h decorreu a fase anaeróbia, durante 3 h a fase aeróbia e 1 h para a fase de sedimentação/decantação e descarga do efluente. Em cada ciclo, 2 L de alimentação sintética (descrita abaixo), composta principalmente por acetato e ortofosfatos, foi adicionada ao reator nos primeiros 5 min da fase anaeróbia. A solução de ortofosfatos ( $K_2HPO_4$  e  $KH_2PO_4$ ) foi preparada em separado. A carência química de oxigénio (CQO) na alimentação foi de  $200 \text{ mg COD L}^{-1}$ , enquanto que a concentração de fósforo foi  $2 \text{ mg P-PO}_4^{3-} \text{ L}^{-1}$ . O tempo de retenção hidráulico (TRH) e tempo de retenção de sólidos (TRS) foi de 12 h e 8 d, respetivamente. Durante cada ciclo, a velocidade de agitação foi mantida a 500 rpm, com exceção do período de sedimentação. Duas válvulas foram usadas para controlar os períodos aeróbio e anaeróbio. De modo a estabelecer as condições anaeróbias no interior do reator foi injetado azoto a um caudal de  $0,5 \text{ L min}^{-1}$ . Durante a fase aeróbia foi fornecido ar comprimido onde a concentração de oxigénio dissolvido se manteve a cerca de  $3 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$ . O pH foi controlado a 7 durante todo o ciclo usando duas bombas associados a um controlador doseando  $0,1 \text{ M HCl}$  ou  $0,1 \text{ M NaOH}$ . A temperatura foi controlada a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ . A composição da alimentação sintética utilizada foi a seguinte (por L):  $0,59 \text{ g NH}_4\text{Cl}$ ,  $0,95 \text{ g MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $0,44 \text{ g CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $11,66 \text{ mg allyl-N thiourea (ATU)}$ , inibidor de nitrificação),  $0,03 \text{ g EDTA}$ , e  $3,16 \text{ mL}$  de solução de micronutrientes para manutenção da biomassa. A solução de micronutrientes foi previamente descrita por Smolders *et al.* (1994) apresentando

a seguinte composição (por L): 1.5 g FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O, 0.15 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.03 g CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, 0.18 g KI, 0.12 g MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O, 0.06 g Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0.12 g ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0.15 g CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O.

## 2.2 Determinação dos parâmetros físico-químicos

O sistema foi regularmente monitorizado através da avaliação dos seguintes parâmetros: sólidos suspensos totais (SST), sólidos suspensos voláteis (SSV), ortofosfatos (P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>), ácidos gordos voláteis (AGVs), azoto amoniacal (N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), nitrito (N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) e nitrato (N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>). A determinação dos SST e SSV foi realizada no final da fase aeróbia em conformidade com os procedimentos descritos no *Standard Methods* (APHA, 1989). As restantes análises foram realizadas a amostras recolhidas, centrifugadas e filtradas no final das fases anaeróbia e aeróbia. O ortofosfato foi determinado por colorimetria usando o método do ácido ascórbico presente no *Standard Methods* (APHA, 1989). Os AGVs foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) Jasco (*Jasco*, Tóquio, Japão), com injeção automática, detetor de UV (210 nm), uma coluna Metacarb 67H (*Varian*, Palo Alto, EUA) a 60 °C. Uma solução de 0,005 M de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) foi usada como eluente, a um caudal de 0,7 mL min<sup>-1</sup> e uma pressão entre 70 e 80 kg cm<sup>-2</sup>. Os iões N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> e N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> foram determinados através dos métodos presentes no *Standard Methods* (APHA, 1989).

Foram recolhidas também amostras de biomassa no final das fases aeróbia e anaeróbia para determinação de glicogénio, fósforo total e PHAs (incluindo poli-β-hidroxibutirato (PHB) e poli-β-hidroxivalerato (PHV)). A biomassa recolhida em cada fase do processo biológico foi liofilizada durante 48 h.

O conteúdo em PHB e PHV na biomassa foi determinado por cromatografia gasosa (GC) utilizando o método desenvolvido por Smolders *et al.* (1994). As amostras de biomassa liofilizada foram transferidas para tubos de vidro. Os polímeros foram esterificados com uma solução HCl:1-Propanol (1,5 mL) e extraídos com diclorometano (1,5 mL), incluindo um padrão interno (ácido benzóico). A mistura foi digerida a 100 °C durante 3,5 h (Vieira, 2005). A quantificação foi efetuada por cromatografia gasosa (GC) num GC VARIAN 3800 (*Varian Inc.*, Palo Alto, EUA) equipado com um detetor de ionização de chama. Os polímeros PHB e PHV foram separados utilizando uma coluna capilar TRWAX (30 m x 0.32 mm x 0.25 μm) (*Teknokroma*, Espanha), com hélio como gás de arraste. As temperaturas de injeção e do detetor foram 220 e 250 °C, respetivamente. A temperatura inicial do forno foi de 50 °C durante 2 min, com uma rampa 10 °C min<sup>-1</sup> até 225 °C. Os dados foram analisados usando o software de aquisição e integração *Star Chromatography Workstation v. 6.30* (*Varian Inc.*, Palo Alto, EUA).

Para determinação do fósforo total, foi digerida biomassa em suspensão durante 1 h a 100 °C com Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> em 0,03 M de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para converter as várias formas de fósforo para a forma de ortofosfato (Freitas *et al.*, 2009). Seguidamente usou-se o método colorimétrico presente no *Standard Methods* (APHA, 1989).

O glicogénio foi determinado através do método de Bond *et al.* (1999), modificado como descrito por Oehmen *et al.* (2005). Adicionou-se 2 ml de HCl 0,6 M às amostras liofilizadas e previamente pesadas. Posteriormente procedeu-se à sua digestão durante 2 h a 100 °C. Após arrefecimento, as amostras foram centrifugadas e 1 mL do líquido sobrenadante foi filtrado através de um filtro de membrana de 0,2 μm. As amostras foram analisadas para determinação de glucose por HPLC. A separação cromatográfica foi realizada utilizando

uma coluna Metacarb 87H (300 × 7,8 mm) (*Varian Inc.*, Palo Alto, EUA) nas seguintes condições: fase móvel 0,005 M de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, caudal de 0,6 mL min<sup>-1</sup>, e temperatura da coluna 60 °C. Assume-se que a glucose determinada é procedente do glicogénio intracelular (Filipe *et al.*, 2001; Zeng *et al.*, 2003).

### 2.3 Coloração de polímeros intracelulares

A biomassa foi retirada no final das fases anaeróbia e aeróbia e fixadas com paraformaldeído (PFA). Após fixação, as amostras foram armazenadas a -20 °C em solução salina de tampão fosfato (PBS) e etanol (Manz *et al.*, 1992; Roller *et al.*, 1994). Os polímeros intracelulares (PHA), foram observados utilizando coloração com azul de Nilo. Foram realizados dois estudos comparativos utilizando biomassa fixada em lâmina e biomassa em suspensão. Obteve-se um melhor resultado em microscopia para a análise quantitativa de polímeros intracelulares usando suspensão de biomassa. Assim, a metodologia utilizada foi adaptada a partir do método previamente desenvolvido por Ostle e Holt (1982), com biomassa em suspensão. 1 mL de suspensão de células fixadas foi incubada a 55 °C durante 10 min com 1 gota de azul de nilo. A amostra foi centrifugada a 4500 rpm durante 5 min. O depósito foi lavado com 0,9% NaCl e centrifugou-se novamente utilizando as condições anteriores. O excesso de solução de coloração foi removido utilizando 8% de ácido acético durante 1 min. Finalmente, as células foram suspensas em 0,9% NaCl. Com o objetivo de garantir imagens de qualidade para quantificação dos polímeros por análise de imagem, recorreu-se à utilização de um *tissue grinder* de forma a quebrar os grânulos formados durante o procedimento de coloração.

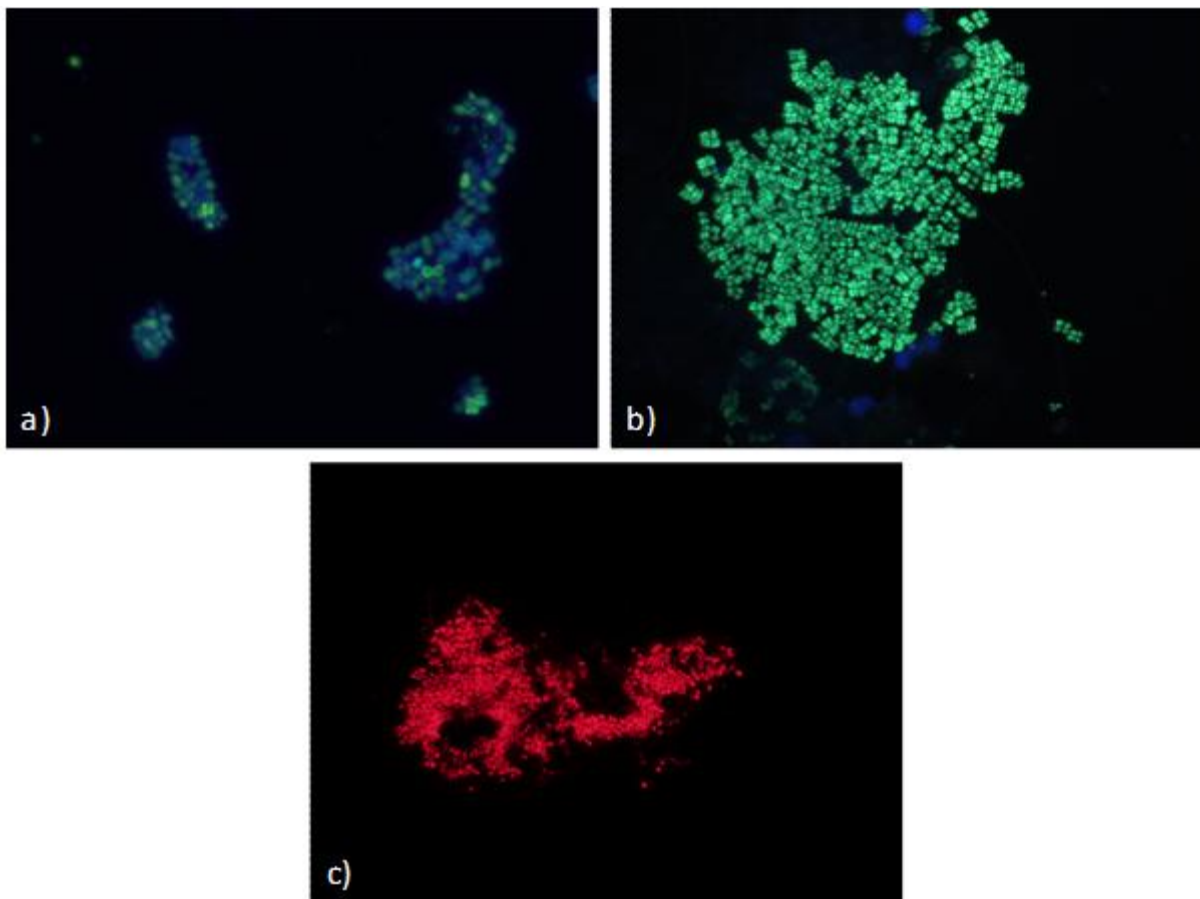
A acumulação intracelular de glicogénio foi observada usando coloração de azul de anilina em biomassa suspensa. Foram também realizados dois estudos comparativos utilizando uma solução ácida 2% e uma solução alcalina a 2% tal como descrito por Shennawy *et al.* (1984). Para este estudo, os melhores resultados foram obtidos usando a solução alcalina 2% durante 20 min de reação (Shennawy *et al.*, 1984). 1 mL de células em suspensão foi incubada durante 20 min com 1 gota de azul de anilina. A amostra foi posteriormente centrifugada a 4500 rpm durante 5 min. As células foram lavadas e suspensas em 0,9% NaCl. Tal como descrito anteriormente, os grânulos formados durante o processo de coloração foram quebrados para uma melhor quantificação por análise de imagem.

A acumulação intracelular de polifosfatos (poli-P) foi observada usando coloração com 4-,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). As bactérias que acumulam grandes quantidades de poli-P são distinguíveis através da emissão de fluorescência amarela (Aschar-Sobbi *et al.*, 2008; Kuroda *et al.*, 2002, Kawaharasaki *et al.*, 1999). Até ao momento, a concentração de DAPI encontra-se ainda indefinida, uma vez que vários autores apresentam resultados distintos. Streichan *et al.* (1990) verificou que elevadas concentrações de DAPI (50 µg mL<sup>-1</sup>) podem identificar grânulos de poli-P e inclusões lipídicas, embora com problemas na fluorescência do fundo. Por outro lado, Klauth *et al.* (2006) observou grânulos de poli-P com concentração de DAPI 5 µg mL<sup>-1</sup> com filtro de fluorescência com outras características. Neste trabalho testou-se a utilização de uma concentração final de DAPI de 5 µg mL<sup>-1</sup>. Inicialmente quebraram-se os grânulos de biomassa formados. 1 mL de suspensão de células foi incubado durante 10 min com 1 gota de DAPI. As células foram lavadas e suspensas em água estéril.

## 2.4 Microscopia de epifluorescência

A visualização dos polímeros intracelulares foi efetuada recorrendo a um microscópio ótico de fluorescência Olympus BX51 (*Olympus*, Tóquio, Japão) e a uma câmara Olympus DP25 (*Olympus*, Tóquio, Japão). Para as amostras coradas com azul de Nilo, foi usado um filtro de excitação de 530-550 nm e emissão a 591 nm, com azul de anilina excitação de 365 - 370 nm e emissão a 421 nm e com DAPI excitação de 365 - 370 nm e emissão a 421 nm. As imagens foram visualizadas a uma ampliação total de 400 vezes e adquiridas a uma escala de RGB de 24 bits e resolução de 1360 x 1024 pixéis, por intermédio do *software* de aquisição Cell<sup>^</sup>B (*Olympus*, Tóquio, Japão). A Figura 1 apresenta imagens representativas de cada um dos três tipos de grânulos estudados.

As amostras foram previamente coradas e a aquisição de imagem foi efetuada em triplicado (usando 3 lâminas) recorrendo a uma micropipeta com uma ponta seccionada para garantir a passagem dos agregados maiores. Em cada triplicado, 10  $\mu$ L de amostra foram colocados numa lâmina e cobertos com uma lamela de 20 mm x 20 mm. Em cada lâmina foram adquiridas 50 imagens (na parte superior, intermédia e inferior) de modo a obter informação representativa da comunidade microbiana existente no sistema. O programa de processamento e análise de imagem utilizado neste trabalho foi desenvolvido em Matlab<sup>™</sup> 7.3 (*The Mathworks*, Natick, EUA).



**Figura 1.** Imagem de grânulos de PP (a), glicogénio (b) e PHA (c), após coloração e visualização em microscopia de fluorescência.

## 2.5 Análise de imagem

A metodologia de análise de imagem aplicada resultou na elaboração de dois programas, em Matlab™ 7.3 (*The Mathworks*, Natick, EUA), um respeitante à determinação de PHA e outro à determinação de glicogénio. Para a determinação de PHA, a imagem RGB original foi primeiramente separada nos seus três canais (R – *red*, G – *green* e B – *blue*), sendo apenas o canal R utilizado no processamento subsequente. Foi efetuada uma correção do fundo da imagem e um pré-processamento por um filtro *Tophat* e um filtro *Wiener*, respetivamente. As inclusões de PHA foram seguidamente determinadas através de um processo duplo de identificação de regiões bem definidas e mal definidas, tendo sido combinadas posteriormente. A imagem binária resultante foi tratada posteriormente para eliminação de detritos. Finalmente foram determinados os parâmetros de interesse como intensidade total da imagem, área total de inclusões e intensidade total e média das inclusões.

Para a determinação de glicogénio, a imagem RGB original foi primeiramente convertida no espaço  $L^*a^*b^*$ . De modo a incrementar a distinção entre as cores verde (inclusões) e azul (flocos celulares) o canal  $b^*$  foi escolhido para o processamento subsequente. Foi seguidamente efetuada uma correção do fundo da imagem por um filtro de mínimos na imagem. Foram determinadas quer regiões de libertação de glicogénio quer de inclusões de glicogénio. As inclusões de glicogénio foram determinadas através de um processo duplo de identificação de regiões bem definidas e mal definidas, tendo sido combinadas posteriormente. As imagens binárias resultantes (zonas de libertação e inclusões) foram tratadas posteriormente para eliminação de detritos. Finalmente foram determinados os parâmetros de interesse como área total de libertação, área total de inclusões, área total de flocos celulares, percentagem da área de libertação, percentagem da área de inclusões, intensidade total e média das áreas de libertação e das inclusões.

## 2.6 Análise estatística multivariável

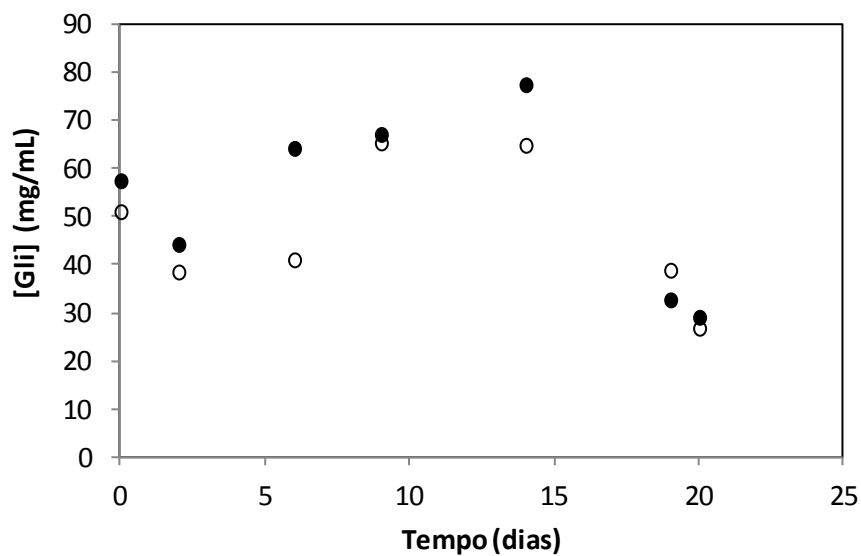
A regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) pode ser entendida como um modelo supervisionado para avaliar e monitorizar uma determinada variável predita (Rosen, 2001). Em PLS é crucial determinar o número ótimo de variáveis latentes (LVs), sendo o método de validação cruzada (CV) um modo prático e confiável para testar o significado preditivo de cada regressão. Neste método, parte do conjunto de dados de treino é mantido fora do modelo, posteriormente predito pelo modelo e finalmente comparado com os valores reais. Neste estudo, o PLS foi utilizado, em Matlab™ 7.3 (*The Mathworks*, Natick, EUA), para prever os valores da concentração intracelular do PHA e do glicogénio, a partir do conjunto de dados obtido pela metodologia de análise de imagem.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo efetuado até ao presente permitiu já obter resultados provisórios para as metodologias referentes à identificação das concentrações intracelulares de glicogénio e de PHA, que serão descritas de seguida. Em relação ao conteúdo intracelular de poli-P, o estudo ainda se encontra centrado no desenvolvimento dos protocolos de coloração e

aquisição de imagens para estas amostras. Não obstante já é possível de visualizar estes grânulos apresentando uma tonalidade verde, diferentemente dos flocos azuis, como pode ser comprovado pela Figura 1a.

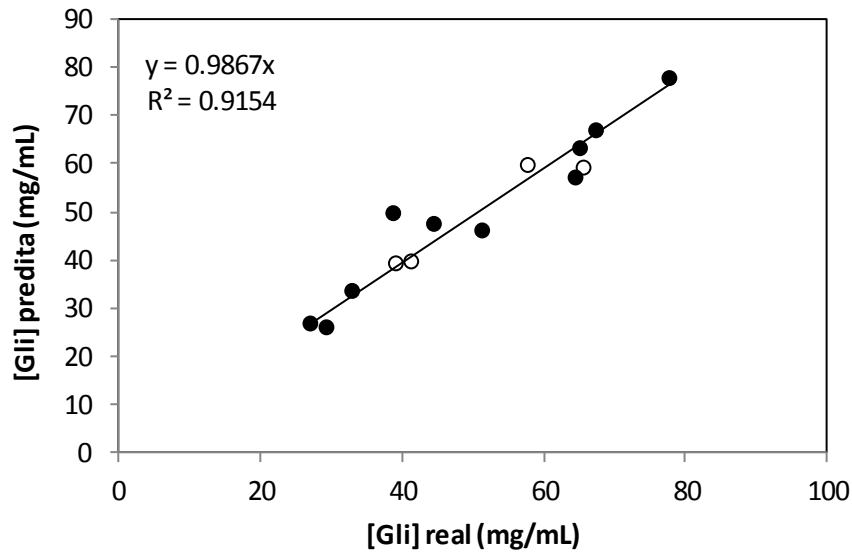
Em relação ao estudo do conteúdo intracelular em glicogénio, a evolução da sua concentração, após as fases anaeróbia e aeróbia, ao longo do decurso da experiência encontra-se representada na Figura 2. Como é possível observar, após a fase aeróbia os valores da concentração de glicogénio foram maioritariamente superiores aos da fase anaeróbia. Tal fato seria de esperar, uma vez que os *PAO* e *GAO* no decurso da fase aeróbia sintetizam glicogénio, que é subsequente utilizado durante a fase anaeróbia para obtenção de energia.



**Figura 2.** Evolução da concentração de glicogénio ([Gli]) intracelular ao longo do tempo após a fase aeróbia (●) e anaeróbia (○).

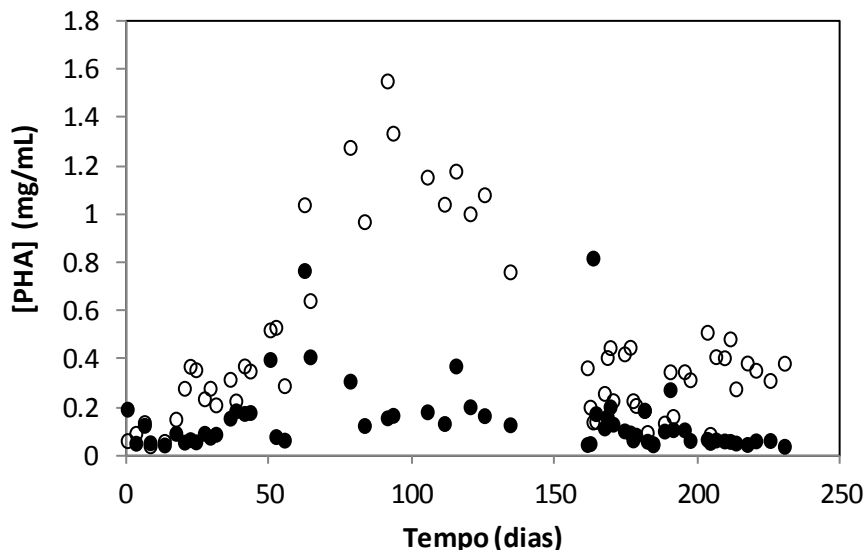
A Figura 3 representa a correlação entre as concentrações intracelulares predita e real de glicogénio, obtidas a partir da análise de PLS multivariável ao conjunto dos dados da fase aeróbia e anaeróbia. Como demonstrado na figura, cerca de 2/3 dos dados disponíveis foram utilizados para a determinação do modelo e 1/3 para a validação. Apesar do número ainda limitado de dados disponíveis, não permitir a obtenção de uma correlação definitiva, foi possível determinar uma boa correlação ( $R^2$  de 0.9154) entre os valores preditos e os valores reais. Contudo, esta equivalência necessita ainda de ser devidamente comprovada pela análise de um maior volume de dados.





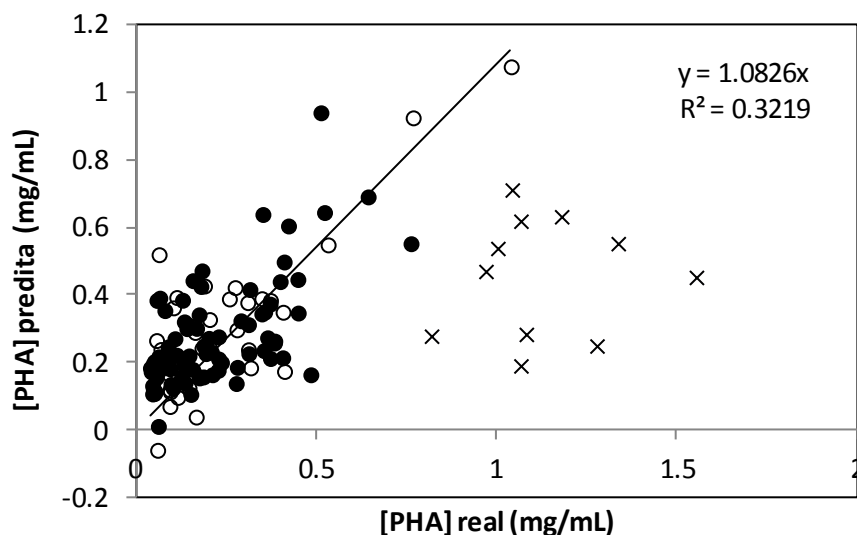
**Figura 3.** Concentração de glicogênio ([Gli]) intracelular predita em função da real. Os pontos a cheio (●) representam os dados do modelo e os pontos abertos (○) os dados da validação.

No tocante ao estudo do conteúdo intracelular em PHA, a evolução da sua concentração, após as fases anaeróbia e aeróbia, ao longo do decurso da experiência encontra-se representada na Figura 4. Como é possível observar, após a fase anaeróbia os valores da concentração de PHA foram maioritariamente superiores aos da fase aeróbia. Mais uma vez, tal fato seria de esperar, uma vez que os *PAO* e *GAO* no decurso da fase anaeróbia sintetizam PHA, a partir de AGV, e durante a fase aeróbia oxidam PHA para obtenção de energia.

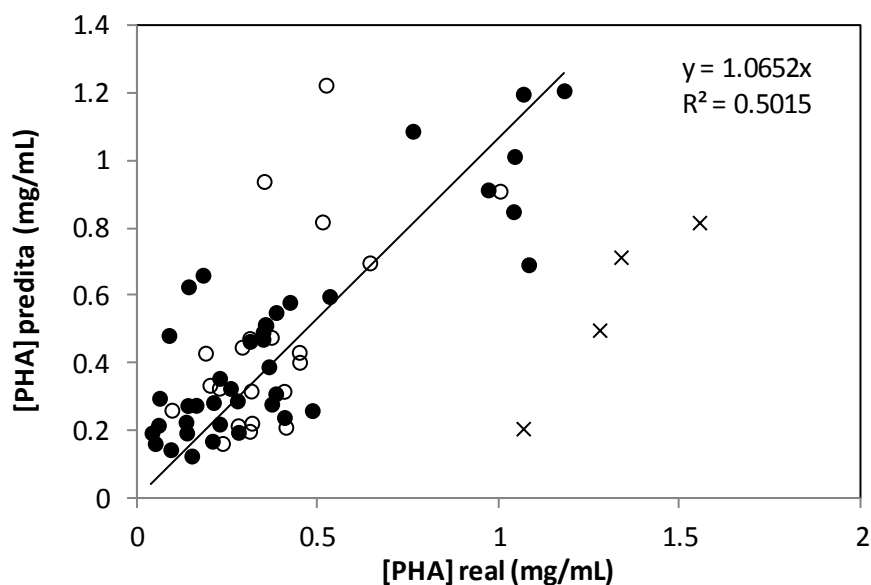


**Figura 4.** Evolução da concentração de PHA ([PHA]) intracelular ao longo do tempo após a fase aeróbia (●) e anaeróbia (○).

A Figura 5 representa a correlação entre as concentrações intracelulares predita e real de PHA, obtidas a partir da análise de PLS multivariável ao conjunto dos dados da fase aeróbia e anaeróbia. Mais uma vez, cerca de 2/3 dos dados disponíveis foram utilizados para a determinação do modelo e 1/3 para a validação. Apesar de resultados iniciais promissores, para um conjunto de dados limitado, em que foi possível de obter um valor do coeficiente de correlação ( $R^2$ ) de 0.843, este valor não foi confirmado para um conjunto mais alargado de dados. De fato, para este maior conjunto de dados foi visível que, a partir de um certo valor de concentração de PHA intracelular (aproximadamente 0.8 mg/mL), esta metodologia, no seu presente estado de desenvolvimento, não é ainda capaz de prever a concentração de PHA intracelular. Mesmo abaixo desse valor, o valor do coeficiente de correlação ( $R^2$  de 0.3219), para o conjunto dos dados aeróbios e anaeróbios, foi baixo. Se se focar a análise apenas para os dados obtidos na fase anaeróbia (Figura 6), o valor limite para detecção do PHA intracelular passa a ser de aproximadamente 1.25 mg/mL e o valor do coeficiente de correlação ( $R^2$ ) de 0.5015. Contudo, apesar de uma melhoria ao nível do valor limite para detecção do PHA intracelular e do coeficiente de correlação, não é ainda possível de se prever, adequadamente, a concentração de PHA intracelular.



**Figura 5.** Concentração de PHA ([PHA]) intracelular predita em função da real (todos os dados). Os pontos a cheio (●) representam os dados do modelo, os pontos abertos (○) os dados da validação e as cruzeiros os pontos que não foram tidos em conta para a correlação.



**Figura 6.** Concentração de PHA ([PHA]) intracelular predita em função da real (fase anaeróbia). Os pontos a cheio (●) representam os dados do modelo, os pontos abertos (○) os dados da validação e as cruces os pontos que não foram tidos em conta para a correlação.

Analisando as imagens adquiridas pela metodologia de coloração das amostras para reconhecimento dos grânulos de PHA, verificou-se que estes grânulos apresentaram o corante azul de anilina, e conseqüentemente puderam ser visualizados por microscopia de fluorescência. Contudo, a metodologia posta em prática até ao corrente implicou também que os próprios flocos apresentam um teor de azul de anilina bastante elevado, o que prejudicou a correta identificação dos grânulos em detrimento dos flocos. Assim, esta metodologia encontra-se em processo de otimização em duas vertentes distintas: melhoria do passo de descoloração dos flocos e otimização do programa de análise de imagem para identificação seletiva dos grânulos.

#### 4 CONCLUSÕES

A obtenção de metodologias de determinação da concentração intracelular de grânulos de PHA, glicogénio e PP, encontra-se em diferentes fases de desenvolvimento e otimização. No tocante à determinação da concentração intracelular de poli-P, o estudo encontra-se ainda numa fase inicial com o desenvolvimento dos protocolos de coloração e aquisição de imagens. Contudo, foi já possível de observar diferenças de tonalidade entre os grânulos de PP e os flocos. Em relação ao estudo da concentração intracelular de glicogénio, os dados disponíveis são ainda limitados e, apesar de uma boa correlação inicial esta tem de ser devidamente comprovada pela análise de um maior volume de dados. No tocante ao estudo da concentração intracelular de PHA, após a obtenção de uma correlação promissora inicial, esta não se veio a comprovar com o aumento do número de dados disponível. Deste modo, este estudo encontra-se centrado, neste momento, ao nível da melhoria do passo de descoloração dos flocos e otimização do programa de análise de imagem para identificação seletiva dos grânulos.

## AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam e agradecer à Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) pelo Projeto de Investigação PTDC/EBB-EBI/103147/2008. DP Mesquita gostaria de agradecer à FCT pela Bolsa SFRH/BPD/82558/2011.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APHA (1989). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 17th ed. American Public Health Association, Washington, DC.

Aschar-Sobbi R., Abramov A.Y., Diao C., Kargacin M.E., Kargacin G.J., French R.J., Pavlov E. (2008). High sensitivity, quantitative measurements of polyphosphate using a new DAPI-based approach. *Journal of Fluorescence* 18, 859-866.

Bond P.L., Erhart R., Wagner M., Keller J., Blackall L.L. (1999). Identification of some of the major groups of bacteria in efficient and nonefficient biological phosphorus removal activated sludge systems. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 4077-4084.

Filipe C.D.M., Daigger G.T., Grady C.P.L. (2001). A metabolic model for acetate uptake under anaerobic conditions by glycogen accumulating organisms: stoichiometry, kinetics, and the effect of pH. *Biotechnology and Bioengineering* 76 17-31.

Freitas F., Temudo M.F., Carvalho G., Oehmen A., Reis M.A.M. (2009). Robustness of sludge enriched with short SBR cycles for biological nutrient removal. *Bioresource Technology* 100, 1969-1976.

Kawaharasaki M., Tanaka H., Kanagawa T., Nakamura K. (1999). In situ identification of polyphosphate-accumulating bacteria in activated sludge by dual staining with rRNA-targeted oligonucleotide probes and 4',6-diamino-2-phenylindol (DAPI) at a polyphosphate-probing concentration. *Water Research* 33, 257-265.

Klauth P., Pallerla R.S., Vidaurre D., Ralfs C., Wendisch V.F., Schoberth S.M. (2006). Determination of soluble and granular inorganic polyphosphate in *Corynebacterium glutamicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 72, 1099-1106.

Kurada A., Takiguchi N., Gotanda T., Nomura K., Kato J., Ikeda T., Ohtake H. (2002). A simple method to release polyphosphate from activated sludge for phosphorus reuse and recycling. *Biotechnology and Bioengineering* 78, 333-338.

Manz W., Amann R.I., Ludwig W., Wagner M., Schleifer K.H. (1992). Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of Proteobacteria: problems and solutions. *Systematic and Applied Microbiology* 15, 593-600.

Oehmen A., Zeng R.J., Yuan Z., Keller J. (2005). Anaerobic metabolism of propionate by polyphosphate-accumulating organisms in enhanced biological phosphorus removal systems. *Biotechnology and Bioengineering*, 91, 43-53.

Ostle A.G., Holt J.G. (1982). Nile Blue A as a fluorescent stain for poly- $\beta$ -hydroxybutyrate. *Applied and Environmental Microbiology* 44, 238-241.

Roller C., Wagner M., Amann R., Ludwig W., Schleifer, K.H. (1994). In situ probing of Gram-positive bacteria with high G+C content using 23S rRNA-targeted oligonucleotides. *Microbiology* 140, 2849–2858.

Rosen C, (2001). A chemometric approach to process monitoring and control with applications to wastewater treatment operation, PhD Thesis, Lund Institute of Technology, Sweden.

Shennawy I.E., Gee D.J., Horobin R.W., Aparicio S.R. (1984). Novel application of aniline blue. Fluorescent staining of glycogen and some protein structures. *Histochemistry* 81, 93-98.

Smolders G.J.F., van de Meij J., van Loosdrecht M.C.M., Heijnen J.J. (1994). Model of the anaerobic metabolism of the biological phosphorus removal process: stoichiometry and pH influence. *Biotechnology and Bioengineering* 43, 461-470.

Streicher M., Golecki J.R., Schon G. (1990). Polyphosphate-accumulating bacteria from sewage plant with different processes of biological phosphorus removal. *FEMS Microbiology Ecology* 73, 113-124.

Vieira M. (2005). Estudo da cinética de acumulação e consumo de polímeros de reserva num reactor de biofilmes para a remoção do azoto. Tese de Mestrado, Universidade do Minho, Braga, Portugal.

Zeng R.J., van Loosdrecht M.C.M., Yuan Z.G., Keller J. (2003). Metabolic model for glycogen-accumulating organisms in anaerobic/aerobic activated sludge systems. *Biotechnology and Bioengineering* 81, 92-105.