

17.º ENASB, Guimarães, 14-16 setembro 2016

ACUMULAÇÃO DE POLIHIDROXIALCANOATOS POR CULTURAS MICROBIANAS MISTAS DO TRATAMENTO DO EFLUENTE URBANO

POLYHYDROXYALKANOATES ACCUMULATION BY MIXED MICROBIAL CULTURES FROM URBAN WASTEWATER TREATMENT

Andreia Ribeiro^{a,*}, Daniela P. Mesquita^b, Adriano Magalhães^a

^aÁguas do Norte, S.A., Grupo Águas de Portugal, Av. Osnabruck, 29, 5000-427 Vila Real, Portugal

^bCEB – Centre of Biological Engineering, Universidade do Minho, Campus de Gualtar, 4710-057 Braga, Portugal

RESUMO

Os microrganismos podem acumular intracelularmente inclusões de polihidroxicanoatos (PHAs) durante o tratamento de águas residuais, utilizando o efluente urbano como fonte de carbono. Estes polímeros biodegradáveis surgem como alternativa aos plásticos convencionais, permitindo reduzir a quantidade de lamas enviadas para tratamento posterior. A monitorização da acumulação de PHAs nos microrganismos das lamas ativadas da ETAR de Penices foi efetuada durante 30 dias, recorrendo ao método de Cromatografia Gasosa (CG) e à técnica de coloração de Negro Sudão B (NSB). Os resultados obtidos por CG revelaram uma acumulação máxima, em fração mássica, de PHAs igual a 5.3 % nas lamas ativadas, relativamente ao teor de biomassa liofilizada e uma concentração máxima de 127 mg L⁻¹. Os resultados obtidos por NSB corroboraram estes valores, pelo que esta técnica poderá ser uma alternativa viável para a quantificação de PHAs, sendo mais fácil de operar e menos dispendiosa. Concluiu-se ainda que a produção de PHAs com culturas mistas à escala industrial para este caso de estudo não é viável, dadas as baixas quantidades obtidas de polímero e o elevado investimento em unidades de extração e purificação do mesmo.

Palavras Chave – Lamas ativadas, PHA, PHV, PHB, análise de imagem, NSB, águas residuais.

ABSTRACT

The microorganisms can accumulate intracellularly inclusions of polyhydroxyalkanoates (PHAs) during wastewater treatment, using the urban effluent as carbon source. These biodegradable polymers appear to emerge as an alternative to conventional plastics, allowing to reduce the amount of activated sludge sent to posterior treatment. The monitoring of the PHAs accumulation in the activated sludge microorganisms of the Penices wastewater treatment facility was performed for 30 days, using gas chromatography (GC) and Sudan Black B (SBB) staining. GC results revealed a maximum accumulation of PHAs mass fraction of 5.3 % in the activated sludge, in relation to the lyophilized biomass content, and a maximum concentration of 127 mg L⁻¹. The SBB results corroborated these values, and therefore this technique can be a viable alternative to the PHAs quantification, being easier to operate and less costly. Still, it was possible to conclude that the PHAs production with mixed cultures at the industrial scale is not viable in this case, given the obtained low quantities of polymer and the high investment in extraction and purification units.

Keywords – Activated sludge, PHA, PHV, PHB, image analysis, wastewaters.

* Autor para correspondência.

E-mail: andreia.ribeiro@adp.pt (Eng.ª Andreia Ribeiro)

1 INTRODUÇÃO

O plástico convencional produzido através de fontes não renováveis, como os derivados do petróleo, constitui uma forma de poluição devido à sua incapacidade de degradação. Uma alternativa sustentável para a sua substituição seria a produção de polímeros biodegradáveis através de microrganismos. Dentro dos bioplásticos de base biológica, os polihidroxialcanoatos (PHAs) são os polímeros que possuem propriedades físico-químicas mais semelhantes ao polipropileno (PP), constituindo assim um potencial candidato à sua substituição. Quimicamente, os PHAs são constituídos na maior parte por poli- β -hidroxibutirato (PHB) e poli- β -hidroxivalerato (PHV) ou por copolímeros (poli- β -hidroxibutirato-3-hidroxivalerato) armazenados por vários tipos de bactérias (Babel *et al.* 2001). No interior do citoplasma celular, os PHAs são sintetizados sob a forma de inclusões insolúveis, funcionando como material energético de reserva. Estes bioplásticos são visíveis por microscopia ótica, com recurso a coloração Negro de Sudão B (NSB), corante utilizado na coloração seletiva de grânulos (Jenkins *et al.* 2003, Nuti *et al.* 1972).

A Estação de Tratamento de Água Residuais (ETAR) é concebida para operar com uma concentração elevada de microrganismos, onde a velocidade das reações bioquímicas é afetada pela temperatura, pH, oxigénio dissolvido e concentração de nutrientes. A utilização de culturas mistas para a obtenção de PHAs é uma alternativa vantajosa relativamente às culturas puras a nível industrial, visto não ser necessário manipular o meio de cultura, tornando o processo economicamente mais atrativo (Reis *et al.* 2003). À escala laboratorial é mais fácil controlar os parâmetros operacionais de equilíbrio e de estabilidade de produção de PHAs, o que não ocorre a nível industrial. A nível de investigação, têm sido realizados estudos em vários reatores biológicos, como o reator descontínuo sequencial (SBR) (Mesquita *et al.* 2015). No que respeita aos meios de cultura utilizados, é prática comum o enriquecimento dos meios de alimentação (efluentes reais ou sintéticos) com substratos (ácidos gordos voláteis) que favorecem a produção de PHAs, bem como a adição de inibidores da nitrificação (Johnson *et al.* 2010).

Pretendeu-se com este trabalho estudar a produção e acumulação de PHAs no processo de tratamento de efluentes urbanos na ETAR de Penices, que inclui efluentes domésticos e efluentes de origem industrial (matadouro e de tinturaria), e comparar o método de cromatografia gasosa (CG) com o método de análise de imagem com coloração de Negro Sudão B (NSB) para análise quantitativa de PHAs. As condições habituais de tratamento usadas na ETAR de Penices foram mantidas sem favorecer a produção de PHAs.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Determinação dos parâmetros físico-químicos

A amostragem foi feita à entrada do efluente na ETAR, no canal anóxico e no local de saída do efluente tratado para o meio hídrico. Os resultados apresentados são relativos ao ano de 2014 e ao primeiro semestre de 2015. O sistema de tratamento da ETAR foi monitorizado semanalmente, por quantificação da carência química de oxigénio (CQO); da carência bioquímica de oxigénio ao fim de 5 dias (CBO_5); dos sólidos suspensos totais (SST); dos sólidos suspensos voláteis (SSV); do fósforo (P) e do azoto (N). Diariamente foram monitorizados os sólidos totais (ST) e os sólidos voláteis totais (SVT) e a quantificação foi efetuada pelo método descrito no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (Clescerl *et al.* 1999). A determinação do pH, temperatura (T), potencial redox (ORP), condutividade (EC) e oxigénio dissolvido (OD), no canal anóxico e na zona de recolha de amostra para determinação de PHAs armazenados, foram efetuadas diariamente com o aparelho portátil da HACH LANGE modelo HQ30d. A determinação da pluviosidade (PI) foi medida com um pluviómetro da RAINWISE® Inc. O RainLog™ da RainWise. OS resultados das leituras foram posteriormente lidos com recurso ao software TL-Loader V2.2.2.

2.2 Monitorização da acumulação de PHA

Para a quantificação de PHAs (incluindo PHB e PHV), determinaram-se os locais de processo na ETAR onde os microrganismos acumulavam PHAs. Para tal, efetuaram-se várias recolhas de amostras de biomassa dos reatores biológicos, em dias alternados, no canal anóxico, no canal aeróbio, na recirculação e retirou-se uma amostra de lama desidratada. Numa segunda fase, foi determinado o local específico da ETAR, com maior acumulação de PHAs, o qual foi monitorizado durante 30 dias consecutivos.

2.2.1 Determinação quantitativa dos polímeros de reserva PHB e PHV pelo método de CG

As amostras de biomassa recolhidas nos vários locais de amostragem foram centrifugadas à velocidade de frequência de agitação de $4\ 000\ \text{min}^{-1}$ durante 10 min, congeladas a $-80\ ^\circ\text{C}$ e posteriormente liofilizadas durante 48 h. Destas pesou-se cerca de (4 a 15) mg e transferiu-se para tubos de digestão. Preparou-se também um padrão num tubo de digestão e um ensaio em branco de maneira análoga às amostras. O conteúdo em PHB e PHV na biomassa foi determinado por cromatografia gasosa (GC) utilizando o mesmo método de Mesquita *et al.* (2013). O método foi calibrado correlacionando a razão entre a área do pico do PHB ou do PHV e a área do pico do PI com a massa de PHB e de PHV correspondente. O padrão utilizado consistia em 70 % de PHB e 30 % de PHV. O teor de PHA foi definido como a fração da concentração de PHA a uma dada concentração de células (peso seco de células por unidade de volume) (Comeau *et al.* 1988).

2.2.2 Determinação quantitativa de PHAs pelo método de análise de imagem através da coloração com NSB

Foram retiradas amostras de 200 μL de biomassa em suspensão, as quais foram colocadas numa lâmina de vidro e expostas ao ar até secarem. Depois foram coloradas com NSB a $3\ \text{g}\ \text{L}^{-1}$ em etanol a $600\ \text{mL}\ \text{L}^{-1}$, e de seguida contrastadas com safranina a $5\ \text{g}\ \text{L}^{-1}$. As amostras coradas com NSB foram examinadas num microscópio ótico *Olympus* BX51, com a objetiva de $100\times$ e com óleo de imersão. As imagens foram adquiridas com uma câmara *Olympus* DP72. Foram adquiridas 50 imagens de cada lâmina com resolução $2\ 040 \times 1\ 536$ pixéis e formato RGB de 24 bits, usando o *software* de aquisição Cell[^]B. As imagens obtidas foram submetidas a um processamento de análise onde se baseou na identificação e quantificação de grânulos de PHAs através do *Matlab* 7.8.0. Os grânulos de PHAs identificados nas imagens recolhidas foram caracterizados de acordo com os parâmetros morfológicos demonstrados em Mesquita *et al.* 2015, Mesquita *et al.* 2013).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores resultantes da monitorização ao afluente bruto da ETAR de Penices podem ser encontrados no Quadro 1.

Quadro 1. Características do afluente bruto à ETAR de Penices em que o caudal é representado por (*Q*)

Características do afluente bruto	Variou entre:
$Q / (\text{m}^3\ \text{d}^{-1})$	1 000 – 2 000
$\text{CBO}_5 / (\text{mg}\ \text{L}^{-1})$	400 – 640
$\text{CQO} / (\text{mg}\ \text{L}^{-1})$	743 – 3 085
$\text{C}_\text{N} / (\text{mg}\ \text{L}^{-1})$	76 – 147
$\text{C}_\text{P} / (\text{mg}\ \text{L}^{-1})$	7 – 19
$\text{SST} / (\text{mg}\ \text{L}^{-1})$	296 – 2 215
pH	6.85 – 9.38

O caudal afluente à ETAR apresentou grandes variações diárias durante o intervalo de tempo analisado, as quais se deveram em parte à pluviosidade, que tende a duplicar o caudal diário, e em parte aos dias de laboração das indústrias servidas pelo tratamento de águas residuais, como se pode observar no Quadro 1. A gama de valores de pH à entrada da ETAR contribuiu para manter o pH no interior do reator biológico entre 7 e 8, privilegiando as

atividades metabólicas dos microrganismos, havendo acumulação de PHA (Chua *et al.* 2003). Como também se pode observar no Quadro 1, durante a monitorização, verificou-se que grande parte dos SST à entrada da água residual e no reator biológico é volátil. Por outro lado, a razão CBO₅/CQO assumiu valores superiores a 0.5, indicando uma boa biodegradabilidade do conteúdo da água residual e elevada taxa de sucesso no tratamento por processos biológicos. No canal anóxico efetuou-se uma carga mássica entre (0.04 a 1) g g⁻¹ d⁻¹, de forma a promover uma boa floculação no reator (Metcalf *et al.* 2003). Durante o ano 2014 foram extraídas cerca de 1 630 t de lamas.

3.1 Análise preliminar da presença de PHAs na ETAR através da CG

A CG serviu para detetar e quantificar PHAs (soma de PHB com PHV), podendo-se observar os resultados obtidos na Figura 1. Pela análise da Figura 1, verificou-se que o polímero em estudo estava presente nos vários locais de amostragem, tendo-se registado um máximo de 0.03 mg mg⁻¹. Comparando com a literatura, o valor obtido é muito inferior a 0.28 mg mg⁻¹ (Pittmann *et al.* 2014), 0.59 mg mg⁻¹ (Jia *et al.* 2014) e 0.77 mg mg⁻¹ (Jiang *et al.* 2012). Também se observou que o local com valores mais elevados de PHA é o canal anóxico e não o canal aeróbio. Isto deve-se ao facto do metabolismo microbiano das comunidades efetuar o armazenamento de PHA na fase anaeróbia. Por este motivo, no canal aeróbio, onde ocorre nitrificação, o PHB foi acumulado em quantidade residual e a acumulação de PHV foi quase nula. Assim, demonstra-se que as diferentes populações microbianas presentes em culturas mistas geram diferentes composições dos copolímeros de PHA.

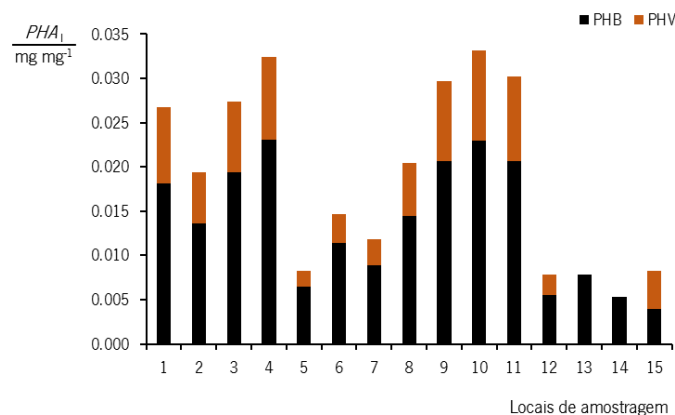


Figura 1. Fração mássica de PHA na massa liofilizada (PHA_i) nos vários locais de recolha na ETAR, em que 1 e 2 referem-se ao canal anóxico próximo do local de entrada, 3 e 4 localiza-se no canal anóxico ao final do tratamento, 5 e 6 são no canal aeróbio, o 7, 8, 11, 12 amostras retiradas da recirculação, o 9 e 10 amostras retiradas no canal anóxico junto aos descarregadores o 13 e 14 amostras retiradas no canal aeróbio antes da saída do tratamento, a 15 corresponde a lamas desidratadas.

3.2 Monitorização da concentração de PHA por CG

A Figura 2 mostra o comportamento da concentração de PHA_i durante 30 dias, no fim do tratamento no canal anóxico. Analisando a Figura 2, verificou-se que a fração mássica de PHB foi sempre superior à de PHV e que a maior acumulação de PHA_i ocorreu no 22º dia de análise, atingindo o valor de 0.053 mg mg⁻¹. As diminuições de fração mássica de PHA_i durante os 30 dias coincidiram com o aumento do *ORP*. Para além disto, os valores apresentados na Figura 2 assemelham-se aos obtidos por Krasnits *et al.* (2013) em águas residuais sintéticas enriquecidas com acetato (0.07 mg mg⁻¹), e superaram a produção em água residual real (0.04 mg mg⁻¹). Estes resultados aproximam-se também dos obtidos por Fidalgo *et al.* (2014), o qual produziu PHA pelo aproveitamento de água residual com bio óleo.

No cálculo da concentração mássica de PHAs acumulado ao longo dos 30 dias, correlacionou-se a fração mássica deste com a concentração de *SVT*, resultado apresentado na Figura 3.

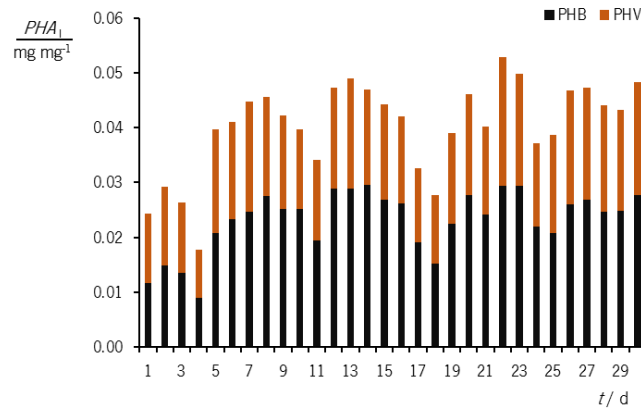


Figura 2. Fração mássica de PHA na biomassa liofilizada (PHA_i) do canal anóxico em função do tempo (t).

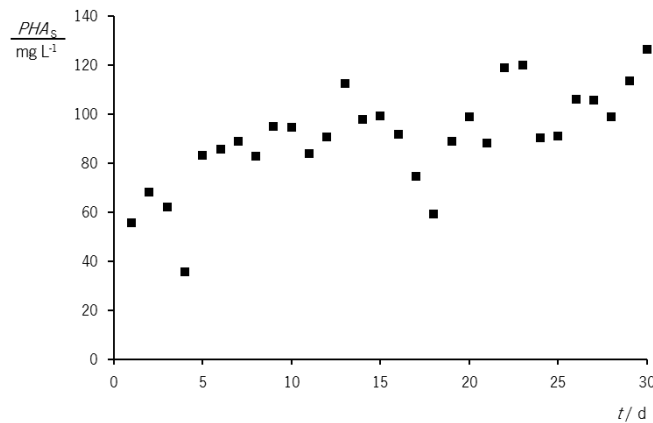


Figura 3. Gráfico relativo à concentração de PHA no volume de biomassa, no canal anóxico.

Observando a Figura 3, verificou-se que ao longo da análise, a concentração de PHAs na biomassa variou entre um mínimo de 36 mg L^{-1} e um máximo de 127 mg L^{-1} , aumentando ou diminuindo mediante a descida ou o aumento do ORP , respetivamente. Comparando com o estudo realizado por Mesquita *et al.* (2015), onde a acumulação máxima de PHA foi de 317 mg L^{-1} em SST, os valores do presente estudo estão abaixo do esperado. Assim sendo, as quantidades para o reator contínuo estudado e as condições operatórias não são propícias à acumulação de PHA acima de 127 mg L^{-1} .

3.3 PHA por análise de imagem da coloração NSB

Do uso de análise de imagem quantitativa para identificação de inclusões e quantificação de PHA foram obtidas cerca de 1500 imagens, das quais foram selecionadas as apresentadas na Figura 4 com base no conteúdo das imagens e nos resultados da CG. O tratamento das imagens foi dificultado pela presença de flocos grandes e densos na distinção dos grânulos de PHA no citoplasma. Como se pode observar na Figura 4, os grânulos de PHA foram acumulados por diferentes agregados de bactérias. Agregados de bactérias filamentosas, como os apresentados na fotografia (b), foram frequentemente detetados nas 1 500 imagens recolhidas. Nestes, os grânulos encontram-se a cor escura e constituem uma estrutura de reserva. Em relação aos parâmetros da análise das imagens obtidas pela coloração de NSB, os resultados em termos de área total de PHA (soma das áreas dos grânulos pequenos, intermédios e grandes) encontram-se na Figura 5.

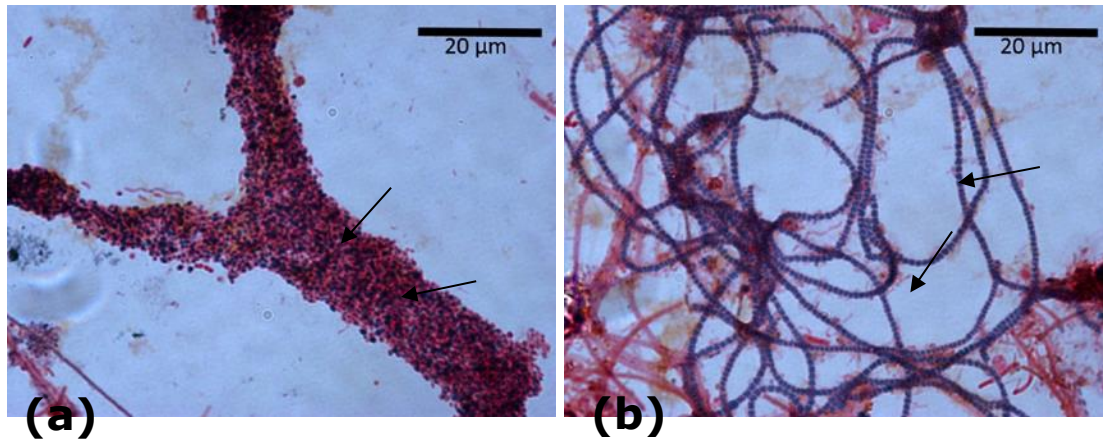


Figura 4. Imagens de visualização microscópica em imersão de óleo de grânulos de PHA em bactérias, recolhidas durante a fase anóxica, após coloração com NSB.

No que diz respeito à distribuição dos grânulos na área total, os grânulos grandes e intermediários encontram-se em maior quantidade. Isto pode ser explicado pelo facto dos microrganismos envolvidos no processo de conversão de substratos orgânicos em PHA estarem em condições anaeróbias (Mesquita *et al.* 2015). De forma geral, os resultados da análise de imagem vão de encontro aos resultados analíticos do método de CG.

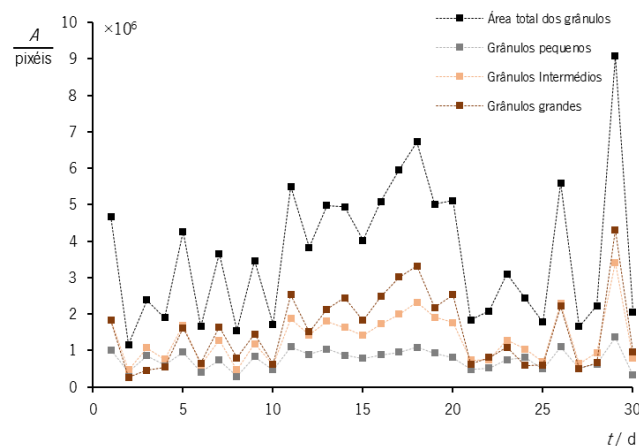


Figura 5. Área total de grânulos de PHA obtidos nas várias bactérias durante a monitorização das inclusões de PHA por análise quantitativa de imagem através da coloração com NSB.

Através da análise de imagens obtidas por microscopia de campo claro da coloração NSB das amostras de licor misto, e dos parâmetros analíticos padrão, fornecidos pela análise de CG da Figura 3, foi possível prever a concentração intracelular de PHA pelo método dos mínimos quadrados parciais (PLS), uma ferramenta de estatística multivariável. A Figura 6 apresenta a correlação entre as concentrações intracelulares de PHA previstas e observadas. Comparando o coeficiente de regressão apresentado na Figura 6 com o valor $R^2=0.90$ do estudo de Mesquita *et al.*, (2015), assegurou-se a aplicabilidade da correlação determinada para o presente estudo. A pequena diferença entre o método CG e a análise de imagem, dada pelo coeficiente de correlação, pode resultar do facto de o método da coloração de NSB também ser compatível com a coloração de lípidos. Com este estudo, foi possível obter dados reais na ETAR e validar que é possível prever adequadamente a concentração de PHA intracelular através das concentrações de PHA obtidas por análise de imagem e do coeficiente de correlação. Assim, o método de coloração NSB e processamento de imagem pode ser visto como alternativa à metodologia clássica, sendo menos laborioso para determinação em ETAR dos PHA.

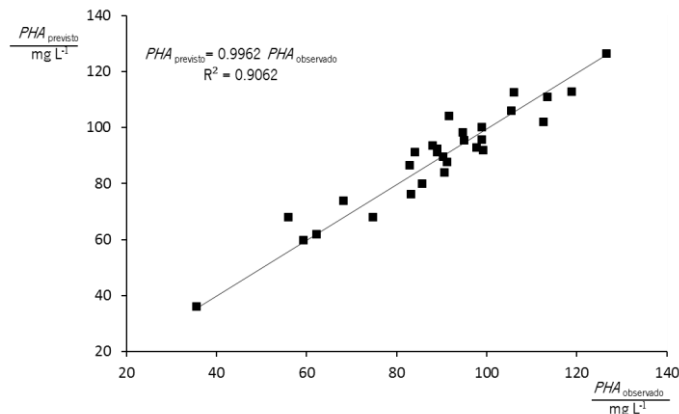


Figura 6. Representação gráfica da relação entre a concentração de PHA prevista pela análise de imagens quantitativa (PHA_{previsto}) e concentração obtida através da CG ($PHA_{\text{observado}}$).

3.4 Parâmetros operatórios, tempo de retenção (*TRH*), carga orgânica aplicada (*ORL*) para acumulação de PHAs

O Quadro 2 apresenta uma complicação dos dados operatórios. Resumidamente, a *ORL* ao canal anóxico variou entre (0.50 – 2.09) $\text{kg m}^{-3} \text{d}^{-1}$, com *TRH* médio aproximadamente igual a 1.5 d. Observando o quadro 2 foi possível verificar que a acumulação de PHA variou com a CQO do efluente, ocorrendo uma acumulação máxima de cerca de 0.12 kg de PHA por kg de CQO degradada, valor que se aproxima dos 0.11 kg de PHA por kg de CQO tratada verificados por Bengtsson *et al.* (2008), em efluente proveniente de uma indústria de transformação de papel, com CQO igual a 8 750 mg L^{-1} e *TRH* de 16 h.

Quadro 2. Dados de caudal (*Q*), a CQO resultante da monitorização da água residual de entrada, *TRH*, *ORL* e acumulação de PHA relativamente à monitorização do reator anóxico

Dia	<i>Q</i> / ($\text{m}^3 \text{d}^{-1}$)	CQO / (mg L^{-1})	<i>TRH</i> / d	<i>ORL</i> / ($\text{kg m}^{-3} \text{d}^{-1}$)	<i>PHA</i> / (mg L^{-1})	(<i>PHA/CQO</i>) / (kg kg^{-1})
5	2 030	3 085	1.48	2.09	83	0.03
12	1 950	984	1.54	0.64	91	0.10
19	2 008	743	1.49	0.50	89	0.12
26	1 777	1 980	1.69	1.17	106	0.05

Reis *et al.* (2003) produziu equivalente a 0.40 kg kg^{-1} de PHA por CQO tratada através do processo "fartura/fome". Quanto ao estudo de Chakravarty *et al.* (2010), no tratamento de águas residuais de laticínios em reator contínuo *activated sludge production reactor* (ASPR) com *TRH* de 1.81 d e 3 178 mg L^{-1} de CQO, atingiu-se 0.25 kg kg^{-1} de PHA por CQO degradada. Avaliando novamente o Quadro 2 verificou-se que a produção de PHA aumentou quando aplicada uma menor carga orgânica. Este comportamento pode dever-se ao facto de no canal anóxico ocorrer um processo "fartura/fome". Quando o sistema é submetido a uma carga orgânica elevada, a quantidade de substrato torna-se demasiada para o sistema (Reis *et al.* 2003), pelo que o *TRH* deveria ser aumentado para que ocorra a total exaustão do substrato. Assim, com a entrada de CQO mais baixa ("fome"), o substrato é rapidamente consumido, induzindo as bactérias a acumularem PHA. Perante CQO elevadas ("fartura"), a acumulação de PHA torna-se desnecessária devido à abundância em substrato.

4 CONCLUSÃO

A utilização da técnica CG para identificar os locais da ETAR onde ocorria maior acumulação de PHAs, revelou que tal acontecia onde as condições anóxicas eram mais acentuadas, com menor potencial redox. O estudo da acumulação de PHAs nas lamas ativadas demonstrou que a fração mássica de PHAs máxima atingida, em base seca, foi de 0.053, o equivalente a uma concentração de 127 mg L^{-1} . Durante o período de monitorização, concluiu-se ainda que

a acumulação de PHAs variava inversamente com o ORP. A coloração NSB acoplada à análise de imagem quantitativa permitiu detetar as inclusões de PHAs nos microrganismos. Usando PLS, concluiu-se que esta metodologia é uma alternativa viável à CG na quantificação de PHA, prevendo as concentrações de PHA obtidas por CG com um RMSEP de 5.65 mg L⁻¹. Para um processo de obtenção de PHA nesta instalação, seria necessário um elevado investimento em equipamentos de extração e purificação, o que a tornaria economicamente inviável.

REFERÊNCIAS

- Babel W., Steinbuchel A. (2001). *Advances in biochemical engineering / Biotechnology, biopolyesters*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, NewYork, vol.71. ISBN: 3-540-41141-0.
- Bengtsson S., Werker A., Christensson M., Welander T. (2008). Production of polyhydroxyalkanoates by activated sludge treating a paper mill wastewater. *Bioresource Technology* 99 509–516. doi:10.1016/j.biortech.2007.01.020.
- Chakravarty P., Mhaisalkar V., Chakrabarti T. (2010). Study on poly-hydroxyalkanoate (PHA) production in pilot scale continuous mode wastewater treatment system. *Bioresource Technology* 101, 2896–2899. doi:10.1016/j.biortech.2009.11.097.
- Chua A. S.M., Takabatake H., Satoh H., Mino T. (2003). Production of polyhydroxyalkanoates (PHA) by activated sludge treating municipal wastewater: effect of pH, sludge retention time (SRT), and acetate concentration in influent. *Water Research* 37 3602–3611. doi:10.1016/S0043-1354(03)00252-5.
- Clescerl L. S., Greenberg A. E., Eaton A. D. (1999). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 20th edition*. American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA), Water Environment Federation (WEF). ISBN: 0-87553-235-7
- Comeau Y., Hall K.J., Oldham W.K. (1988). Determination of Poly-3-Hydroxybutyrate and Poly-3-Hydroxyvalerate in Activated Sludge by Gas-Liquid Chromatography. *Applied and Environmental Microbiology* 54 2325–2327.
- Fidalgo R. M., Ortigueira J., Freches A., Pelica J., Goncalves M., Mendes B., Lemos P. C. (2014). Bio-oil upgrading strategies to improve PHA production from selected aerobic mixed cultures. *New Biotechnology* 31 (4). doi:10.1016/j.nbt.2013.10.009.
- Jenkins D., Richard M.G., Daigger G. (2003). *Manual on the causes and control of activated sludge bulking, fad and other solids separation problems*, Third edition. Lewis Publishers, Boca Roton. ISBN: 1-56670-647-5
- Jia Q., Xiong H., Wang H., Shi H., Sheng X., Sun R., Chen G. (2014). Production of polyhydroxyalkanoates (PHA) by bacterial consortium from excess sludge fermentation liquid at laboratory and pilot scales. *Bioresource Technology* 171 159–167. doi:10.1016/j.biortech.2014.08.059.
- Jiang Y., Marang L., Tamis J., Loosdrecht M. C. M., Dijkman H., Kleerebezema R., (2012). Waste to resource: Converting paper mill wastewater to bioplastic. *Water Research* 46 5517–5530. doi:10.1016/j.watres.2012.07.028.
- Johnson K., Kleerebezema R., Loosdrecht M. C. M. (2010). Influence of ammonium on the accumulation of polyhydroxybutyrate (PHB) in aerobic open mixed cultures. *Journal of Biotechnology* 147 73–79. doi:10.1016/j.jbiotec.2010.02.003.
- Krasnits E., Beliavsky M., Tarre S., Green M. (2013). PHA based denitrification: Municipal wastewater vs. Acetate. *Bioresource Technology* 132 28–37. doi:10.1016/j.biortech.2012.11.074.
- Mesquita D.P., Selvaggio G., Cunha J.R., Leal C.S., Ferreira E.C (2013). Image analysis for automatic characterization of polyhydroxyalkanoates granules. *Lecture Notes in Computer Science*. 7950 790–797. doi:10.1007/978-3-642-39094-4_91.
- Mesquita D. P., Amaral A. L., Leal C., Oehmen A., Reis M. A.M., Ferreira, E C. (2015). Polyhydroxyalkanoate granules quantification in mixed microbial cultures using image analysis: Sudan Black B versus Nile Blue A staining. *Analytica Chimica Acta* 865 8–15. doi:10.1016/j.aca.2015.01.018.

- Metcalf & Eddy (2003). *Wastewater Engineering, treatment and reuse* Fourth edition. New York, McGraw-Hill Companies. ISBN: 0-07-112250-8.
- Nuti M. P., Bertoldi M., Lepidi A. A. (1972). Influence of phenylacetic acid on poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) polymerization and cell elongation in *Azotobacter chroococcum* Beij. *Canadian Journal of Microbiology* 18 1257–1261. doi: 10.1139/m72-194.
- Pittmann T., Steinmetz H. (2014). Polyhydroxyalkanoate production as a side stream process on a municipal waste water treatment plant. *Bioresource Technology* 167 297–302. doi:10.1016/j.biortech.2014.06.037.
- Reis M.A.M., Serafim L.S., Lemos P.C., Ramos A.M., Aguiar F.R., Loosdrecht M.C.M.V. (2003). Production of polyhydroxyalkanoates by mixed microbial cultures. *Bioprocess Biosyst Eng.* 25 377–385. doi:10.1007/s00449-003-0322-4.