

Série
Manuais

maio 92

ARQUIVO TÉCNICO

5314
V479m
032491
ex. 1



26993

032491

Microbiologia de lodos ativados



Governo do Estado de São Paulo
Secretaria do Meio Ambiente

CETESB Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO

Luiz Antonio Fleury Filho

Governador

SECRETARIA DO MEIO AMBIENTE

Alaôr Caffé Alves

Secretário

CETESB

Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental

Walter Lazzarini

Diretor-Presidente

Carlos Pedro Jens

Diretor de Pesquisa e Desenvolvimento de Tecnologia

Lineu Rodrigues Alonso

Diretor de Controle da Poluição de Regiões Metropolitanas

Luiz Antonio Ercolin

Diretor de Treinamento e Transferência de Tecnologia

Carlos Pedro Jens

Diretor de Normas e Padrões Ambientais

RESPONDENDO INTERINAMENTE

Ricardo Augusto Grecco Teixeira

Diretor Administrativo e Financeiro

Walter Godoy dos Santos

Diretor de Controle da Poluição do Interior

Impresso em maio de 1992

Tiragem: 1000 exemplares

Distribuição: CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
Av. Prof. Frederico Hermann Jr., 345 – Alto de Pinheiros
Tel.: 210-1100 – CEP 05489 – São Paulo – SP – Brasil

Microbiologia de Lodos Ativados

CETESB - Companhia Ambiental
do Estado de São Paulo
BIBLIOTECA



CETESB

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL

CETESB - Companhia Ambiental
do Estado de São Paulo

Biblioteca Prof^o Dr^o Lucas Nogueira Garçon
Av. Prof^o Frederico Hermann Jr., 345 Pinheirão

05459-900 - São Paulo - Brasil

e-mail: biblioteca@cetesbnet.sp.gov.br

Microbiologia de Lodos Ativados

Rosana Filomena Vazollér

Bióloga

Maria de los Angeles Rodenas Garcia

Farmacêutica-bioquímica

Alcides Diniz Garcia Jr. (MSc)

Engenheiro Químico

José da Conceição Neto

Analista de Laboratório

SÃO PAULO

1989

Produção Editorial

Planejamento Gráfico

Roberto Poletto

Arte-Final

José Aparecido da Silva

Kazuo Sato

Composição

Alcir Rodrigues de Oliveira

Solange Medeiros Miranda

Diagramação

Joaz dos Santos Yamamoto

Revisão

Julieta Penteado

Marta C. Santos

Paula S. Tiné

Fotolitos e Impressão

Setor de Gráfica da CETESB

Sumário

INTRODUÇÃO	1
Nutrição	1
Respiração	2
Crescimento bacteriano	3
MICROORGANISMOS NO PROCESSO DE LADOS ATIVADOS	4
Principais microrganismos	6
Bactérias	6
Fungos	6
Microfauna	6
METODOLOGIA PARA ANÁLISE QUALITATIVA E QUANTITATIVA	6
Coleta e preservação de amostras	7
Calibração do microscópio	7
Técnica de contagem em câmara de S.R.	7
Aplicação da técnica de contagem em microfauna	8
Técnica de medida e contagem de filamentos e flocos	10
Interpretação das análises	10
Anexo 1 – Nomenclatura	17
Anexo 2 – Microfauna mais freqüente	17
Referências bibliográficas	23

Microbiologia de lodos ativados

INTRODUÇÃO

Os rios possuem capacidade autodepuradora, que se realiza através da estabilização biológica (biodegradação) da matéria orgânica proveniente dos despejos neles lançados. Em condições aeróbias, o mecanismo envolvido na biodegradação processada por bactérias é a respiração celular que promove a oxidação dos compostos orgânicos com quebra das moléculas complexas, transformando-as em moléculas mais simples e mais estáveis. Portanto, é o oxigênio o principal aceptor dos elétrons gerados a partir da degradação desses compostos (1). Além disso, durante o metabolismo respiratório, ocorre a liberação de energia necessária para o crescimento e para a manutenção das células bacterianas.

No caso de lançamento contínuo de despejos *in natura* num corpo receptor (rios, lagos etc.), pode ocorrer o esgotamento do oxigênio disponível em solução, como consequência da estabilização da matéria orgânica, criando condições anaeróbias. Com isso, ocorre o desaparecimento dos microrganismos aquáticos originais e a morte dos peixes e dos vegetais, deixando o corpo receptor inviável para uso como fonte de abastecimento de água potável e para recreação. Portanto, existe grande interesse, tanto de ordem econômica quanto sanitária e social, em que os despejos sejam submetidos a tratamento adequado antes de seu lançamento nos corpos d'água.

O tratamento biológico dos despejos realiza-se pela reprodução artificial do

mecanismo de biodegradação que ocorre no rio, passando a funcionar apenas como dispersor, no meio ambiente, de despejos tratados. Um dos processos mais utilizados de tratamento biológico é o de lodos ativados. Trata-se de um processo fermentativo aeróbio contínuo com reciclo de biomassa, que se constitui num inóculo permanente e aclimatado.

Com o intuito de compreender a microbiologia envolvida nesse sistema de tratamento, serão abordados aqui, sucintamente, alguns aspectos da nutrição, da respiração e do crescimento bacterianos (2 e 3).

Nutrição

De acordo com as suas necessidades nutricionais e energéticas, os seres vivos são classificados em dois grandes grupos: os autotróficos e os heterotróficos. Os seres autotróficos – por exemplo, os vegetais – são os que utilizam compostos inorgânicos (CO_2 e H_2), sintetizando, a partir destes na presença da luz (fotossíntese), substâncias orgânicas. Os seres heterotróficos – por exemplo, os animais – requerem substratos orgânicos para deles retirar a energia necessária ao seu desenvolvimento.

Contudo, essa classificação é bastante simples e insuficiente para explicar a variedade de caminhos nutricionais que os organismos utilizam. Com base em dois parâmetros importantes, isto é, na natureza da fonte energética e na fonte principal de carbono, é possível reunir os microrganismos em quatro categorias nutricionais bem distintas (4):

- *fotoautotróficos*, que se servem da luz como fonte de energia e de CO₂ como principal fonte de carbono. São exemplos dessa categoria os organismos fotossintéticos, os vegetais superiores, as algas, algumas bactérias ditas fotossintetizantes e certos protozoários;
- *fotoheterotróficos*, que têm a luz como fonte de energia e um composto orgânico como fonte principal de carbono. Aqui se incluem as *purple bacteria* (bactérias púrpuras) e as *green bacteria* (bactérias verdes);
- *químioautotróficos*, que utilizam uma fonte de energia química e o CO₂ como principais fontes de carbono. A energia é obtida pela oxidação de compostos inorgânicos reduzidos, tais como NH₃, NO₂, H₂; formas reduzidas do S (H₂S, S, S₂O₃) e compostos ferrosos. Somente bactérias pertencem a essa categoria nutricional. Devido à capacidade destas bactérias crescerem em meios minerais simples, na ausência de luz, esses organismos são também conhecidos como quimiolitotróficos;
- *químioheterotróficos*, que usam uma fonte de energia química e um composto orgânico como principal fonte de carbono. Aqui não se observa clara distinção entre fonte de energia e fonte de carbono, notada nas três categorias anteriores; nesta categoria, tanto a fonte de carbono quanto a de energia podem ser derivadas do metabolismo de uma substância orgânica simples. Incluem-se entre os químioheterotróficos todos os animais metazoários, protozoários, fungos e a grande maioria das bactérias. Os organismos desta categoria nutricional podem ser subdivididos de outras maneiras. Uma delas é a que se baseia no estado físico do nutriente orgânico que entra na célula: os osmotróficos, as bactérias e os fungos, que retiram seus nutrientes do meio sob forma dissolvida; os fagotróficos, que através da fagocitose, usam partículas sólidas como alimento. Outra subdivisão também adotada é a que se relaciona com a utilização da matéria orgâni-

ca, em putrefação ou não. Os organismos holozóicos, maioria dos animais superiores e alguns protozoários, utilizam matéria orgânica *viva*. Os sapróbicos, utilizadores de matéria orgânica morta (putrefação), são os saprozóicos (maioria dos protozoários, alguns animais superiores etc.) e os saprofíticos (bactérias, fungos etc.). Estes dois últimos são diferentes entre si apenas porque os primeiros ingerem matéria particulada e os segundos, dissolvida.

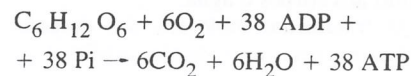
Saliente-se, contudo, que, em particular, os microrganismos possuem uma grande versatilidade nutricional para seu crescimento e manutenção. Isso faz com que a classificação de alguns grupos possa estar incluída em mais de uma categoria.

Respiração

Como já foi visto, os organismos aeróbios heterotróficos obtêm a maior parte de sua energia da respiração, a qual costuma ser definida como a oxidação de combustíveis orgânicos (substratos) pelo oxigênio molecular. Conseqüentemente, na respiração, o oxigênio serve como aceptor final de elétrons. A energia obtida com a oxidação do substrato é armazenada sob a forma de ligações químicas de alta energia, que será posteriormente usada pela própria célula. A formação dessas ligações é o processo conhecido como fosforilação oxidativa, onde a adenosina-difosfato (ADP) é convertida em adenosina-trifosfato (ATP), sendo esta última o composto que armazena a energia obtida na respiração.

O processo respiratório compreende as seguintes etapas: glicólise (degradação de uma molécula de glicose a duas de ácido pirúvico), ciclo do ácido tricarboxílico e cadeia respiratória. A quantidade de ATPs gerada em cada etapa é, respectivamente, 2 ATPs, 30 ATPs e 6 ATPs.

A equação geral da respiração bacteriana, durante a quebra da glicose, é apresentada da seguinte forma:



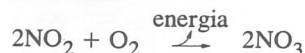
Em condições de ausência de oxigênio, o processo é dito anaeróbico e apresenta um rendimento baixo de 2 ATPs durante a glicólise.

As bactérias quimioautotróficas utilizam a energia de ligação de compostos inorgânicos para sintetizar os compostos orgânicos celulares, processo conhecido como quimiossíntese. Como exemplo dessas bactérias, existem as nitrificantes que utilizam a amônia ou o nitrito, segundo as equações a seguir:

Nitrosomonas



Nitrobáctier



Crescimento bacteriano

O crescimento dos microrganismos em culturas puras pode ser observado segundo o modelo da curva de crescimento descrita por Monod (5), reproduzida na Figura 1, e que apresenta as seguintes etapas ou fases:

- fase Lag, ou de Aclimação: não ocorre aumento do número de microrganismos, na medida em que, nesta etapa, eles elaboram o arsenal enzimático necessário ao consumo dos substratos. A velocidade de crescimento é nula;
- fase de Aceleração: inicia-se o crescimento microbiano, face ao consumo de substrato. A velocidade de crescimento aumenta com o tempo;
- fase Log, ou Exponencial: frente às condições adequadas de vida (substrato abundante, baixa concentração de metabólitos tóxicos etc.), o microrganismo cresce com velocidade máxima, que pode ser representada por uma função exponencial;
- fase de Desaceleração: a velocidade de crescimento, que era máxima na fase anterior, passa a diminuir, uma vez que o substrato disponível começa a escassear e já existe o acúmulo ponderável de excretas tóxicas;

- fase Estacionária: a velocidade de crescimento dos microrganismos volta a ser nula, devido ao esgotamento dos substratos ou ao acúmulo de substâncias tóxicas em níveis incompatíveis com o desenvolvimento microbiano;
- fase de Declínio: ocorre a diminuição do número de microrganismos (velocidade de crescimento negativa) causada pela sua morte e lise.

Nas fases estacionárias e de declínio, o microrganismo consome suas reservas protoplasmáticas (ocorre um *emagrecimento* celular), sendo este processo conhecido como metabolismo endógeno. Estas duas fases podem ser também chamadas de fase endógena. Embora a curva de crescimento tenha sido descrita para culturas puras, sua utilização é também bastante freqüente em culturas mistas, tal como no processo de lodos ativados.

Nesse processo, a depuração biológica ocorre no tanque de aeração alimentado com o despejo a ser tratado (afluente). O lodo biológico encontra-se misturado com o meio líquido. Em sua maior parte, ele é formado por uma população mista de bactérias agregadas sob a forma de flocos biologicamente ativos, de onde o nome lodos ativados. Um esquema do sistema de lodos ativados completo é mostrado na Figura 2 (6).

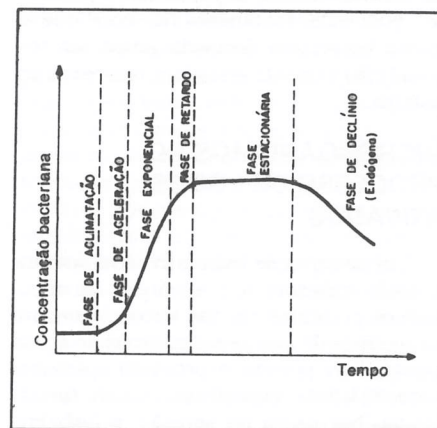


Figura 1 - Modelo de curva de crescimento de microrganismos em cultura pura.

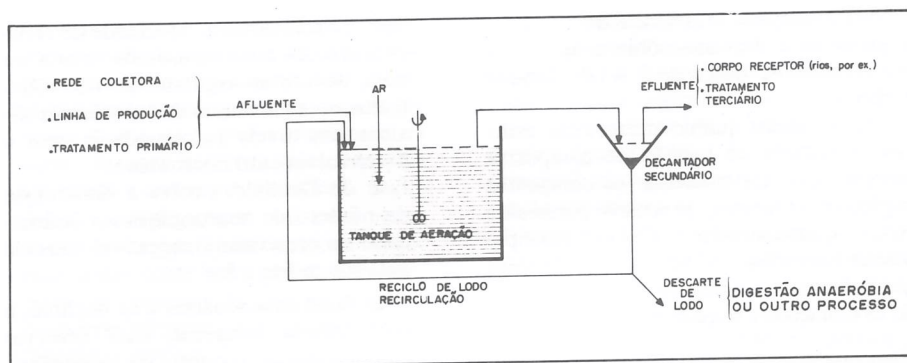


Figura 2 - Esquema do processo de lodos ativados.

Essa população mista de bactérias não está em crescimento sincronizado: enquanto uma parte delas se encontra na fase exponencial de crescimento, portanto, de renovação celular, outra parte acha-se na fase estacionária e uma terceira, ainda, na fase de declínio. Dependendo das condições de operação do sistema, é possível manter uma parcela maior de bactérias nestas duas últimas fases, ou seja, na fase endógena.

A importância da manutenção da fase endógena para o processo está na diminuição da biomassa devido à auto-oxidação (metabolismo endógeno) e também porque é nestas condições que ocorre a floculação bacteriana. A floculação do lodo é característica importante do processo, pois este fenômeno faz com que a massa bacteriana formada possa ser separada do efluente tratado e retornada ao sistema.

MICRORGANISMOS NO PROCESSO DE LODOS ATIVADOS

Em sistemas de lodos ativados, embora o meio ambiente seja aquático, os organismos presentes não são necessariamente os mesmos de ambientes naturais de águas doces. Isso porque o processo apresenta características específicas, como turbulência, por causa da aeração, e turbidez, devido ao material em suspensão.

Apenas a microfauna é encontrada

nesses processos, pois a turbulência não permite o desenvolvimento de organismos maiores. A turbidez do meio provoca a ausência de luz, evitando o desenvolvimento de algas. Entre a microbiota normalmente são encontrados vários tipos de bactérias, entre elas as filamentosas, formando a biomassa e, às vezes, fungos e leveduras. As bactérias são organismos sapróbicos, consumidores primários que degradam a matéria orgânica do despejo, promovendo sua estabilização (7).

As bactérias filamentosas, presentes tanto no floco como livres, igualmente degradam a matéria orgânica, mas seu crescimento deve ser controlado, pois pode causar problemas na decantação do lodo (8). Como representantes da microfauna, encontram-se protozoários e micrometazoários.

A presença de microfauna é um importante indício de funcionamento do processo, e, como um observador experiente pode identificá-la com certa facilidade, é utilizada como indicador biológico. A identificação de bactérias é um processo em geral mais lento e oneroso em relação à de protozoários, o que dificulta sua utilização como indicadores. Para serem utilizados nas estações de tratamento, os métodos de análise devem ser simples.

A observação qualitativa e quantitativa da microfauna vem sendo há anos realizada no controle do processo de lodos ativados. Entretanto, ainda se encontra pouco desenvolvida como instrumento de

diagnóstico, pois, na prática, aparecem problemas de amostragem, de contagem e de aproveitamento dos dados obtidos, devido à complexidade das interações. As populações de bactérias (decompositoras primárias) fixam um substrato complexo, geralmente variável em qualidade e quantidade. A partir desses organismos decompositores vive uma fauna de consumidores primários, também sujeitos à predação entre si (protozoários). As interações, tanto de competição quanto de predação, são muito diversificadas (9).

Outro fator importante a se considerar na observação ao microscópio é a avaliação da concentração de bactérias filamentosas. Elas encontram-se quase sempre presentes nos flocos bacterianos; porém, sua quantidade em relação aos flocos deve ser limitada a um certo ponto para que não ocorram problemas na decantação do lodo, intumescimento filamentosos do lodo, como já referido (8). A má decantação do lodo pode, contudo, ter outras origens, tais como o aumento de um tipo de bactéria, *Zooglea ramigera*, ou de fungos filamentosos (10).

O aspecto do lodo ao microscópio em geral pode ser descrito da seguinte forma: as bactérias se agregam formando flocos biológicos, que também congregam bactérias filamentosas. Na superfície desses flocos fixam-se os protozoários sésseis, ciliados pedunculados ou peritriquias. Há protozoários que vivem em estreita ligação com os flocos, alimentando-se destes e mantendo-se sempre em torno deles, sem estar, porém, fisicamente a eles ligados (ciliados hipotriquias). Por último, existem os ciliados livre-natantes, que se movem nos espaços entre os flocos, os flagelados e as amebas, podendo estes dois últimos estar preferencialmente tanto na superfície do floco quanto no espaço entre eles, dependendo da espécie. Os micrometazoários (rotíferos e pequenos vermes) também se locomovem, em geral, no espaço entre os flocos (11, 12).

A determinação precisa de todas as espécies presentes é difícil de ser realizada num trabalho de controle.

Assim, utilizam-se contagens simplificadas de microfauna, arranjadas em classes ou em grandes grupos. A natureza da microfauna presente é característica da idade do lodo, que é o tempo médio de permanência do lodo no reator. É também característica da saprobicidade, nível de qualidade da água refletido pelas espécies que constituem a comunidade presente, de acordo com a matéria orgânica biodegradável, expressa em DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio), que representa o resultado analítico da quantidade de oxigênio necessário para oxidar biologicamente uma determinada quantidade de matéria orgânica ao longo de cinco dias de incubação, a 20°C. Assim, uma determinada comunidade é indicadora do nível sapróbico de um determinado meio.

Nos tratamentos aerados de despejos, como é o caso do processo de lodos ativados, o meio no tanque de aeração, segundo a saprobicidade, pode variar de oligosapróbica (condições excelentes de depuração, com DBO₅ média em torno de 2,5 mg/l), a polisapróbica (condições inferiores de depuração, com DBO₅ média em torno de 50 mg/l). As condições intermediárias de nível de qualidade de efluente que podem apresentar-se são: β-mesosapróbica (DBO₅ média de 5 mg/l) e α-mesosapróbica (DBO₅ média em torno de 10 mg/l). As condições β e α-mesosapróbicas são as mais frequentes em tratamentos aerados de despejos (13).

As espécies microbianas reagem aos fatores de seleção do meio (tróficos ou físico-químicos), individualmente, segundo as suas características próprias. O fato da microfauna sofrer a ação simultânea de todos os parâmetros do processo e de subsistir em condições não ideais, torna-a um indicador extremamente sensível. A microfauna é indicadora, portanto, do conjunto de parâmetros de funcionamento do processo de lodos ativados, uma vez que sua natureza varia com o nível de depuração, com a concentração de oxigênio dissolvido, com a presença de substâncias tóxicas etc., dentro do tanque de aeração (14).

Principais microrganismos

Bactérias

As bactérias unicelulares mais frequentes nos lodos ativados, além da *Zoogloea ramigera*, considerada por muito tempo como a única responsável pela floculação, pertencem aos gêneros *Achromobacterium*, *Chromobacterium* (*Flavobacterium*) e *Pseudomonas*. São bastonetes gram-negativos, com ação proteolítica. A *Zoogloea* forma massas gelatinosas, reconhecíveis ao microscópio porque formam estruturas dendríticas.

Dentre as bactérias filamentosas, a *Sphaerotilus natans* é a mais comum em lodos ativados, caracterizando-se pela presença de bainha e ramificação falsa. São filamentos finos e, em geral, os septos celulares não são visíveis. Há outras bactérias que podem estar presentes no processo, como *Thiotrix*, *Beggiatoa* e *Nocardia*, além de outras espécies.

Um crescimento excessivo de bactérias filamentosas dificulta a decantação do lodo, causando um estado chamado intumescimento filamentoso do lodo. Por isso, é necessário um controle constante da

concentração de filamentos como prevenção de um problema que, se não cuidado a tempo, pode levar à perda de sólidos em suspensão pelo efluente.

Fungos

Os fungos não são muito comuns em lodos ativados e, quando presentes, em geral são Deuteromicetos (fungos imperfeitos). Com maior frequência são encontradas espécies do gênero *Geotrichum*. Quando se desenvolvem em excesso, também são passíveis de provocar intumescimento do lodo. Podem predominar em processos em que se verifique acentuada queda de pH.

Microfauna

São frequentemente encontrados organismos de diversos gêneros, que podem ser agrupados de acordo com a Tabela 1.

METODOLOGIA PARA ANÁLISE QUALITATIVA E QUANTITATIVA

Como não é possível contar todos os organismos de uma amostra, os métodos de contagem são estatísticos. Por isso es-

Tabela 1 - Agrupamento de organismos de diversos gêneros.

Grandes Grupos	Gêneros Frequentes
Classe Ciliata	
a) ciliados livre-natantes	<i>Paramecium</i> , <i>Colpidium</i> , <i>Litonotus</i> , <i>Trachelophyllum</i> , <i>Amphileptus</i> , <i>Chilodonella</i>
b) ciliados pedunculados	<i>Vorticella</i> , <i>Opercularia</i> , <i>Epistylis</i> , <i>Charchesium</i> e as suctórias <i>Acineta</i> e <i>Podophrya</i>
c) ciliados livres, predadores do floco	<i>Aspidisca</i> , <i>Euplotes</i> , <i>Stylonychia</i> , <i>Oxytricha</i> ,
Classe Mastigophora - flagelados	<i>Bodo</i> , <i>Cercobodo</i> , <i>Mona</i> sp, <i>Oicomonas</i> sp, <i>Euglena</i> sp, <i>Cercomonas</i> sp, <i>Peranema</i>
Classe Sarcodina - amebas	<i>Amoeba</i> , <i>Arcella</i> , <i>Actinophrys</i> , <i>Vahlkampfi</i> , <i>Astramoeba</i> , <i>Diffugia</i> , <i>Cochliopodium</i> .
Classe Rotifera - rotíferos	<i>Philodina</i> , <i>Rotaria</i> , <i>Epiphanes</i>
Classe Nematoda - nematóides	<i>Rhabditis</i>
Filo Anelida - anelídeos	<i>Aelosoma</i>

tão sujeitos a erros de grandeza variável, dependendo do número de campos ou de faixas contados ao microscópio, e do cuidado na execução da análise.

Coleta e preservação de amostras

A amostra é coletada no tanque de aeração, próximo à sua saída. Para tanto, podem ser utilizados frascos de polietileno, de polipropileno ou de vidro, que serão preenchidos apenas até a metade de seu volume de modo a manter oxigênio em sua parte superior, necessário à sobrevivência da microfauna durante o transporte das amostras. O volume de amostra necessário à análise é pequeno, não excedendo a 10 ml.

O ideal é que a análise seja feita imediatamente após a sua coleta, para se evitarem alterações na composição da microfauna. Conservantes ou preservativos químicos não podem ser utilizados, uma vez que a análise é realizada *in vivo*. Caso as amostras devam ser analisadas em locais distantes do ponto de amostragem, recomenda-se mantê-las à temperatura de 4° C durante o transporte e estocá-las em laboratório e em geladeira, o menor tempo possível, não devendo ultrapassar 48 horas.

Calibração do microscópio

A calibração correta do microscópio é fundamental para se realizar a contagem de organismos. Utiliza-se um retículo (ou ocular micrométrica) de Whipple, colocado na ocular regulável do microscópio. Esse retículo é traçado num disco de vidro e dividido precisamente em 100 quadrados iguais, sendo um dos quadrados centrais subdividido em 25 quadrados menores. Na calibração do retículo de Whipple, verifica-se quanto mede a área da imagem que ele delimita colocando-se na platina do microscópio uma lâmina em escala micrométrica de 1 mm subdividido em 10 μ m ou em 100 μ m; superpondo-se a imagem da escala ao retículo, observa-se quanto mede cada divisão do

retículo. O aumento utilizado deve ser de 100 ou 200 vezes.

Técnica de contagem em câmara de S. R.

A câmara de S. R. - Sedgwick-Rafter (9,15) é comumente usada nas contagens de protozoários e filamentos. Tem capacidade de 1 ml, com dimensões de 50 mm x 20 mm. Não pode ser utilizada com objetivas de aumento maior que 16 vezes. Para aumentos maiores, existem objetivas apropriadas.

O esquema na Figura 3 mostra o modo de completar o volume da câmara com a amostra líquida, utilizando-se uma pipeta e introduzindo-se a amostra por um lado da câmara, de forma a permitir que o ar possa sair pelo outro lado. Antes do início da contagem, deixa-se a amostra decantar por 5 min.

A contagem pode ser efetuada tanto por campos, cada um correspondendo à área do retículo de Whipple, quanto por faixas, tendo a faixa 50 mm de comprimento e a largura do retículo de Whipple. Realiza-se a contagem por campos quando a amostra tem uma densidade elevada de microrganismos (dez ou mais por campo). Os campos são escolhidos aleatoriamente, distando de 5 mm a 7 mm das bordas. Obtém-se o resultado em organismos por mililitro a partir dos campos contados, fazendo-se o cálculo de acordo com a fórmula

$$N^{\circ}/ml = \frac{C \times 1\,000 \text{ mm}^3/ml}{A \times D \times F}$$

onde:

- C = número de organismos contados
- A = área de um campo (área da imagem do retículo de Whipple), mm^2
- D = profundidade de um campo (profundidade da câmara de Sedgwick-Rafter, 1 m), mm
- F = número de campos contados

O valor resultante ainda precisa ser ajustado, multiplicando-se pelo fator de diluição ou dividindo-se pelo fator de

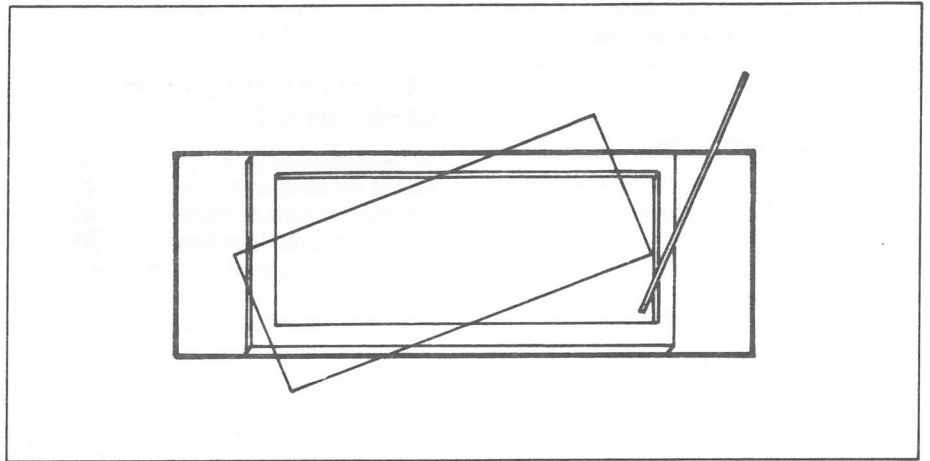


Figura 3 - Câmara de contagem de Sedgwick-Rafter, mostrando a maneira de colocar a amostra.

concentração. A contagem por faixas é efetuada quando a concentração de microrganismos é baixa. O número de organismos por mililitro é obtido a partir da seguinte fórmula:

$$N^{\circ}/ml = \frac{C \times 1\,000 \text{ mm}^3/ml}{L \times D \times W \times S}$$

onde:

C = número de organismos contados

L = comprimento de cada faixa (comprimento da câmara de Sedgwick-Rafter), mm

D = profundidade de uma faixa (profundidade da câmara de Sedgwick-Rafter), mm

W = largura de uma faixa (largura da imagem do retículo de Whipple), mm

S = número de faixas contadas

Igualmente, o resultado da fórmula será ainda multiplicado pela diluição ou dividido pela concentração da amostra. Para se obter uma melhor qualidade de resultados, é recomendável a utilização das seguintes condições:

- usar o mesmo microscópio e o mesmo aumento para todas as contagens de uma amostra de mesma origem;
- definir o mesmo número de faixas ou

campos a serem contados, para todas as contagens de amostras de mesma origem;

- definir uma faixa de diluição adequada para o tipo de amostra analisada; sugere-se também que, se necessário variar a diluição definida, isso seja feito pelo fator de dois para concentrar ou diluir; por exemplo:

diluição definida - 1:10

diluição mínima - 1:5

diluição máxima - 1:20

- a amostra deve ser bem homogeneizada antes de se retirar a alíquota para diluição e para análise.

Aplicação da técnica de contagem em microfauna

Análises quantitativas e qualitativas deverão ser realizadas diariamente, ou três vezes por semana, em câmara de S. R. (9,15). A análise inicial é qualitativa, observando-se a amostra em lâmina/lâminula, para anotar o estado dos flocos, a presença de bactérias livres e de outros elementos, para identificar os protozoários e micrometazoários etc. Somente depois é que se deve proceder à contagem dos microrganismos, em sua totalidade ou por grupos específicos.

Crítérios a serem seguidos para as análises quantitativas

- os microrganismos são contados em um número pré-determinado de campos, ao microscópio e, então, aplica-se a fórmula adequada para o cálculo do número total de microrganismos por mililitro;
- a contagem direta da amostra não diluída é preferível, pois elimina a manipulação; geralmente, porém, a concentração de sólido é tal que não permite sua realização sem diluição; mesmo os organismos não identificados precisam ser contados e seu esquema relacionado no verso da folha de anotação para posterior identificação;
- na contagem de campos aleatórios são também incluídos os organismos que tocam as linhas demarcatórias de cima ou da esquerda do retículo de Whipple; os que tocam as linhas demarcatórias de baixo ou da direita devem ser ignorados; sugere-se a contagem de dez campos aleatórios, localizados na região central da câmara, a cerca de 6 a 7 mm de suas bordas (ver Figura 4);
- quando a contagem é realizada por faixas, utiliza-se o comprimento total da câmara; a contagem será facilitada se forem marcadas linhas de referência no fundo da câmara, como mostra a Figura 5; sugere-se a contagem de duas a três faixas; aplica-se, então, a fórmula adequada para o cálculo do número de microrganismos por mililitro.

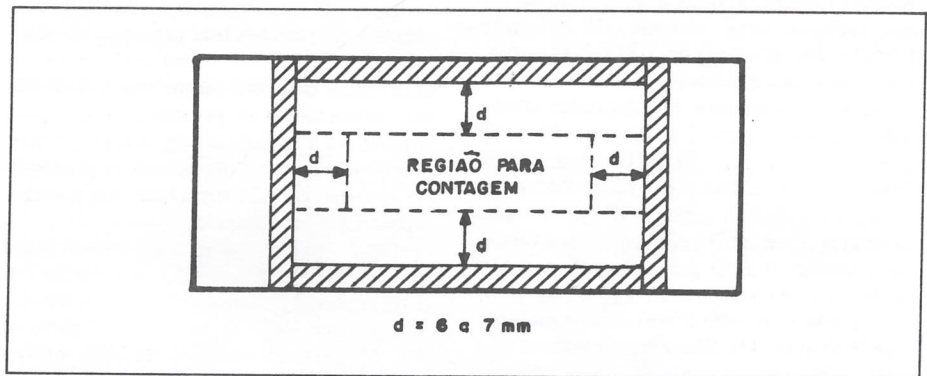


Figura 4 - Contagem na câmara de Sedgwick-Rafter, por campos.

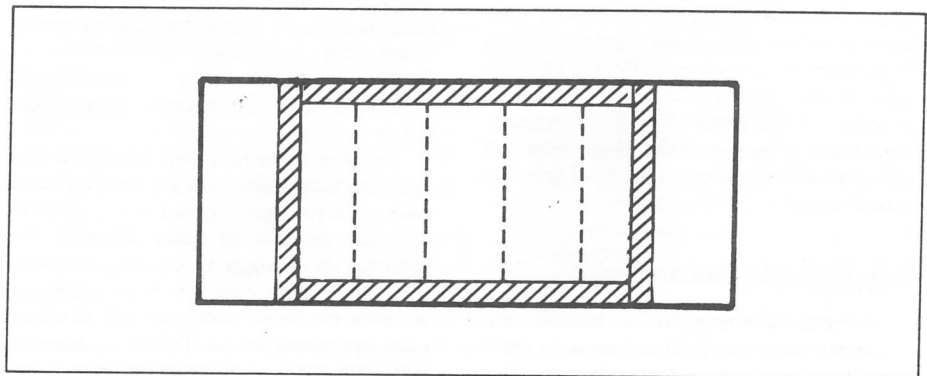


Figura 5 - Contagem na câmara de Sedgwick-Rafter, por faixas.

Técnica de medida e contagem de filamentos e flocos

A medida para a contagem de filamentos e de flocos é efetuada com a amostra do tanque de aeração diluída 1/500 a 1/2 000 em água destilada (9, 12,15). A diluição é feita num béquer de 1,5 l e homogeneizada num aparelho *jar-test* durante 1 min, a 100 rpm, reproduzindo condições similares às existentes no tanque de aeração, ou pode ser também executada por agitação manual com um bastão de vidro, durante 1 min.

Tomar uma alíquota adequada da amostra com uma pipeta de ponta larga (8 mm), devidamente calibrada, de modo a não danificar os flocos e transferi-la para a câmara de contagem de Sedgwick-Rafter. Contar de duas a quatro faixas ao microscópio, com retículo de Whipple aferido, em aumento de 100 a 200 vezes. Os flocos são medidos pelo seu diâmetro máximo e assinalados nos seguintes intervalos: 0,5 a 2 μm , 2 a 10 μm , 10 a 25 μm , 25 a 50 μm , 50 a 100 μm , 100 a 200 μm , 200 a 400 μm , 400 a 800 μm , e maiores que 800 μm . Os filamentos são contados e medidos pelas seguintes faixas de tamanho: 0 a 10 μm , 10 a 25 μm , 25 a 50 μm , 50 a 100 μm , 100 a 200 μm , 200 a 400 μm , 400 a 800 μm , e maiores que 800 μm . Os filamentos maiores que 800 μm são considerados individualmente. As medidas de filamentos e flocos são efetuadas ao mesmo tempo, de modo que o número e o comprimento de filamentos sejam assinalados para uma faixa específica de tamanho de flocos. Os filamentos não ligados a flocos são medidos e contados como livres. Filamentos ramificados são contados como dois, uma vez que exercem influência mecânica nos flocos (Figura 6).

Interpretação das análises

A realização regular de análises microscópicas de um lodo em aeração serve para indicar ao operador as diversas tendências do processo de lodos ativados:

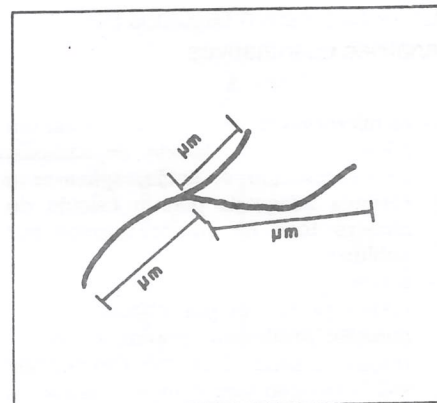


Figura 6 - Medida de filamentos ramificados.

demonstra a eficiência da remoção de matéria orgânica e da sedimentação do lodo; indica a adequação da aeração empregada e uma eventual presença de compostos tóxicos, bem como pode revelar a ocorrência de sobrecargas orgânicas. Esses indicadores se prestam, então, para sugerir ou a realização de outras medidas físico-químicas ou mudanças na operação do sistema, de tal forma que seja mantido o desempenho desejado.

Para exemplificar a metodologia apresentada, será adotado, em particular, o tratamento convencional do esgoto doméstico por lodos ativados. As Figuras de 7 a 12 ilustram aspectos de lodo encontrados ao exame microscópico sob aumento de 125 vezes. A microfauna associada ao lodo será observada de acordo com os grandes grupos anteriormente citados. Os esquemas apresentados no Anexo 2 servirão para a identificação detalhada dos organismos encontrados (11,16).

Estudos realizados pela CETESB com esgotos domésticos – cujas características estão descritas na Tabela 2 – nos quais foi utilizado sistema de lodos ativados com reatores de Mistura Completa, de quatro compartimentos e de oito compartimentos aerados em série, operando sob as condições apresentadas na Tabela 3, mostram um comportamento com relação a microfauna, descrito na Tabela 4.

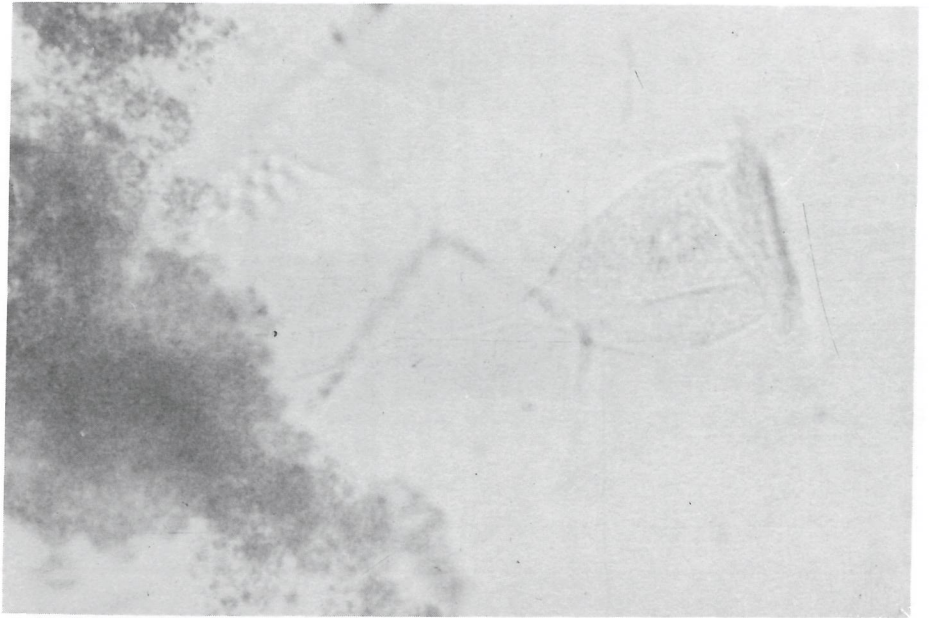


Figura 7 - Lodo com boas características, onde se observa um ciliado pedunculado.

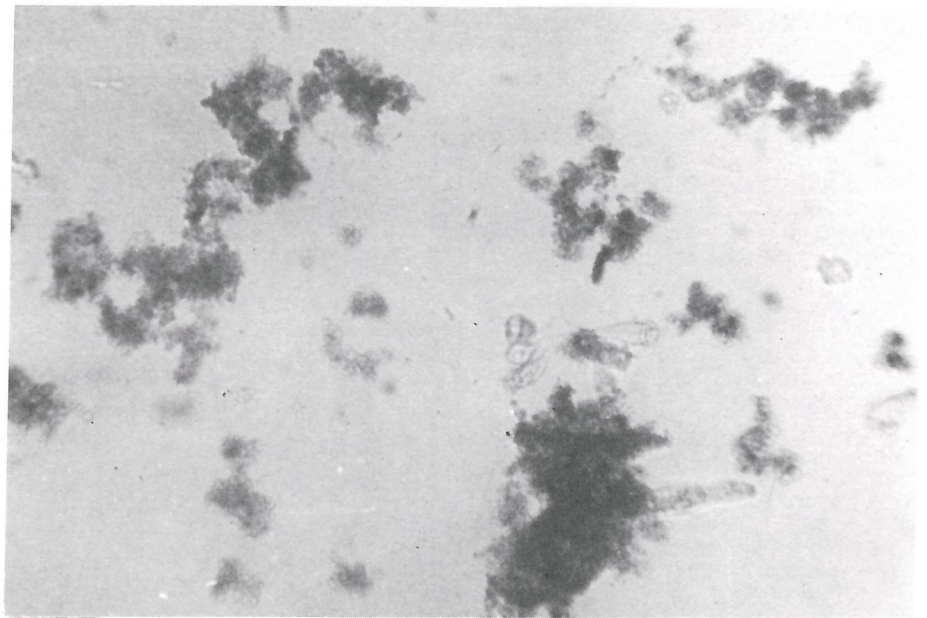


Figura 8 - Lodo com boas características, onde se observa um micrometazoário no canto direito inferior e uma colônia de pedunculados próxima ao centro do campo.

FEISB - Companhia Ambiental
do Estado de São Paulo
BIBLIOTECA

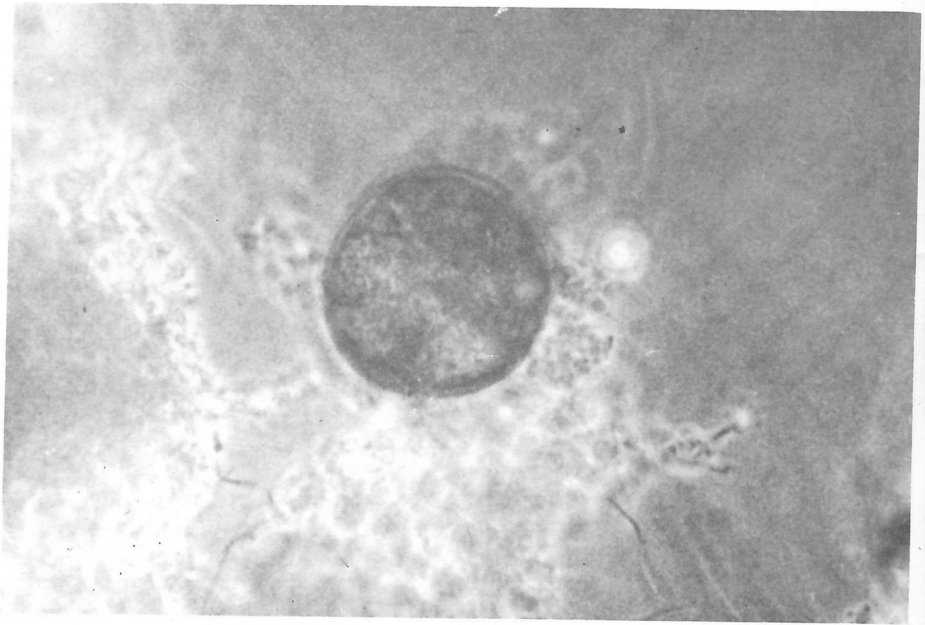


Figura 9 - Lodo com boas características, onde se observa uma carapaça de ameba (Tecameba) entre os flocos.

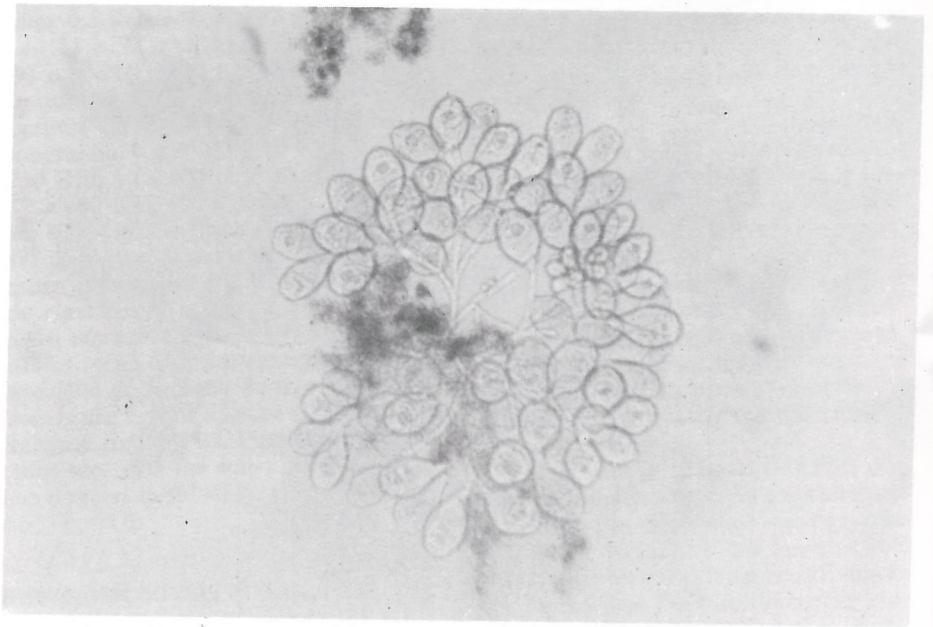


Figura 10 - Lodo com boas características, onde se observa uma colônia de ciliados pedunculados.

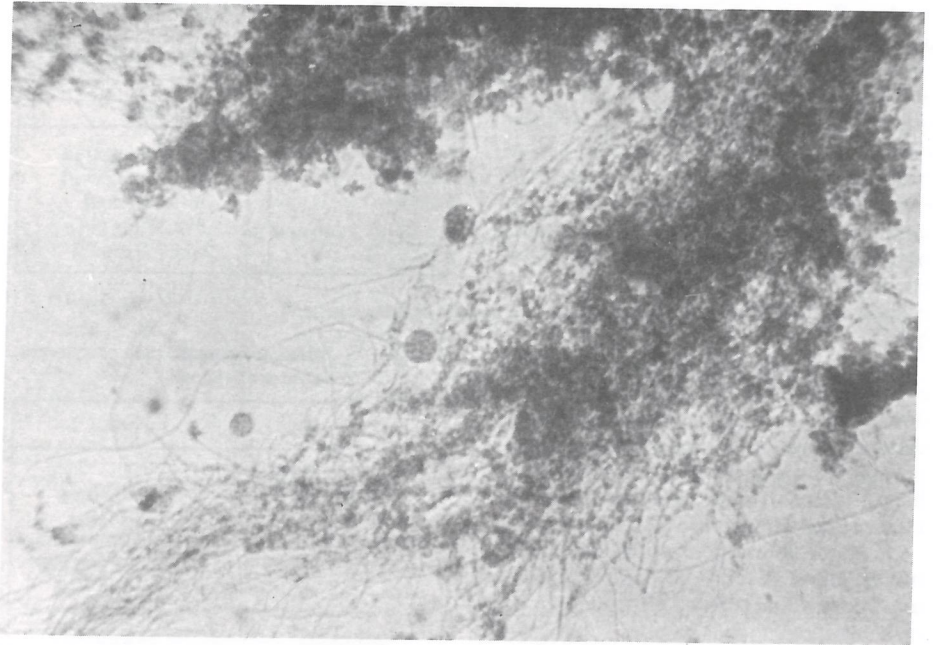


Figura 11 - Lodo com intumescimento filamentoso ($\theta_C = 1,0$ dia).

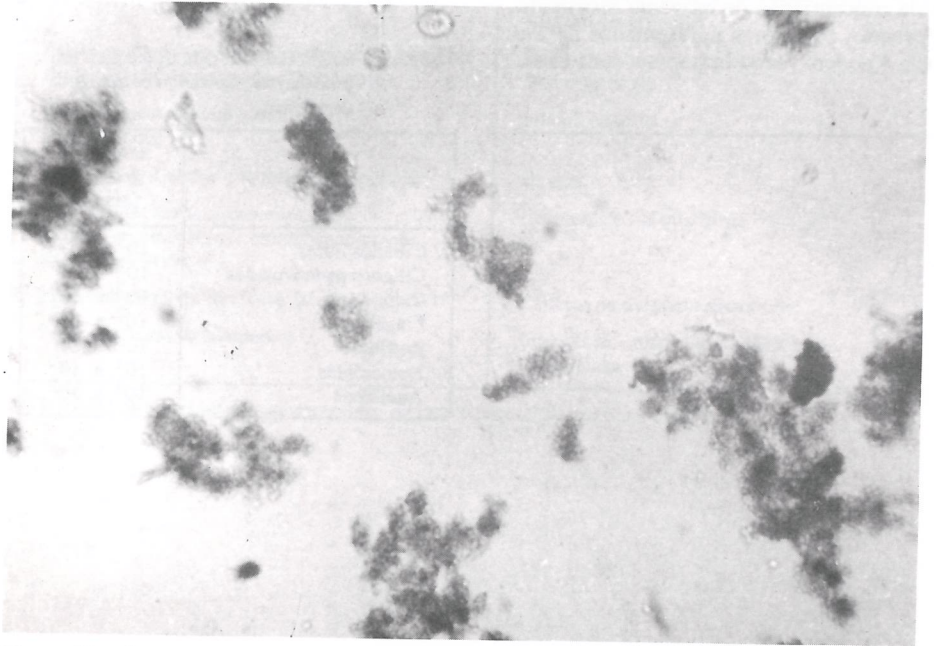


Figura 12 - Lodo disperso (*Pint-point*, $\theta_C = 28$ dias).

A análise de esgotos domésticos pode apresentar grandes variações, tanto dentro de uma mesma amostra quanto em amostras consecutivas. Assim, é razoável que o diâmetro máximo dos flocos varie entre 10 μm e 800 μm , ou que a concentração de bactérias filamentosas oscile entre 10^1 e 10^8 bac/ml. Desse modo, para uma interpretação correta dos resultados obtidos nestas medidas, recomenda-se correlacioná-las convenientemente, de acordo com os critérios expostos na Tabela 5.

Entre os microrganismos encontrados em lodos ativados operando com esgotos domésticos, algumas espécies são consideradas indicadoras das condições de depuração do sistema de tratamento. A Tabela 6 indica os microrganismos e as características de processo a eles associadas.

É importante salientar que cada sistema de lodos ativados se comporta como um ecossistema único, dependendo das características do esgoto doméstico afluente, da configuração hidráulica do sistema, da idade do lodo, da temperatura e da concentração de oxigênio dissolvido. Portanto, os valores apresentados na Tabela 4 podem variar bastante a cada caso.

Tabela 2 - Faixas de variação das características principais dos esgotos domésticos utilizados.

Parâmetros	Faixa
DQO	300 a 660 mg O ₂ /l
DBO	110 a 310 mg O ₂ /l
SS	40 a 190 mg/l
NK _T	16 a 37 mg N/l
P _T	2,5 a 7,0 mg P/l

Tabela 3 - Faixas de operação para os sistemas de lodos ativados.

Parâmetro	Faixa
Tempo de detenção hidráulico (θ h)	2 a 12 horas
Idade do lodo (θ_c)	3 a 15 dias
Remoção de DQO	80 a 95 %
SSVTA	1 000 a 2 500 mg/l
IVL	50 a 700 ml/g
pH	6 a 7,5
Temperatura	18 a 25° C
OD	3 a 6 mg/l

Tabela 4 - Análise microbiana típica para um lodo ativado operando com esgoto doméstico.

Grupo	Ordem de grandeza (org/ml)
Ciliados livres	10^3 a 10^4
Ciliados pedunculados	10^3 a 10^4
Rizópodes	10^2 a 10^4
Flagelados	10^2 a 10^3
Rotíferos	10^2 a 10^3
Nematóides	10^1 a 10^2
Anelídios	10^1 a 10^2

Tabela 5 - Relação entre os tamanhos de filamentos e flocos, e as características do lodo.

Filamento (bac/ml)	Flocos	Características
10^1 a 10^2	Pequeno diâmetro ($< 50 \mu m$)	Lodo disperso (<i>pint-point</i>)
10^2 a 10^6	Pequeno diâmetro ($< 50 \mu m$)	Provável intumescimento do lodo *
	Médio a grande diâmetro (> 100 a $300 \mu m$)	Lodo em boas condições
10^6 a 10^8	Pequeno a médio diâmetro ($< 100 \mu m$)	Muito provável intumescimento do lodo
	Grande diâmetro ($> 150 \mu m$)	Provável intumescimento do lodo
$> 10^8$	-	Intumescimento do lodo

(*) Intumescimento do lodo ou *bulking* filamentoso.

Tabela 6 - Microrganismos indicadores das condições de depuração (9,15).

Microrganismos	Características do processo
Predominância de flagelados e rizópodes	Lodo jovem, característico de início de operação ou θ_c baixa
Predominância de flagelados	Deficiência de aeração, má depuração e sobrecarga orgânica
Predominância de ciliados pedunculados e livres Presença de <i>Arcella</i> (rizópode com teca)	Boas condições de depuração Boa depuração
Presença de <i>Aspidisca costata</i> (ciliado livre)	Nitrificação
Presença de <i>Trachelophyllum</i> (ciliado livre)	θ_c alta
Presença de <i>Vorticella microstoma</i> (ciliado pedunculado) e baixa concentração de ciliados livres	Efluente de má qualidade
Predominância de anelídeos do gên. <i>Aelosoma</i>	Excesso de oxigênio dissolvido
Predominância de filamentos	Intumescimento do lodo ou <i>bulking</i> filamentoso *

(*) Para caracterizar o intumescimento do lodo é necessário avaliar os flocos.

Anexo 1

Nomenclatura

- DBO₅ – Demanda Bioquímica de Oxigênio (20° C, 5 dias) (mgO₂/l)
DQO – Demanda Química de Oxigênio (mgO₂/l)
HNO₂ – Ácido nitroso
IVL – Índice Volumétrico de Lodo(ml/g)
NH₃ – Nitrogênio amoniacal
NK_T – Nitrogênio Kjeldahl Total(mg N/l)
NO₂ – Nitritos
NO₃ – Nitratos
OD – Oxigênio Dissolvido (mg/l)
pH – Potencial hidrogeniônico
P_T – Fosfato Total (mg P/l)
S. R. – Sedgwick-Rafter
SS – Sólidos em Suspensão (mg/l)
SSVTA – Sólidos em Suspensão Voláteis no Tanque Aeração (mg/l)
θ_h – Tempo de detenção hidráulico (horas)
θ_c – Idade do lodo (dias)

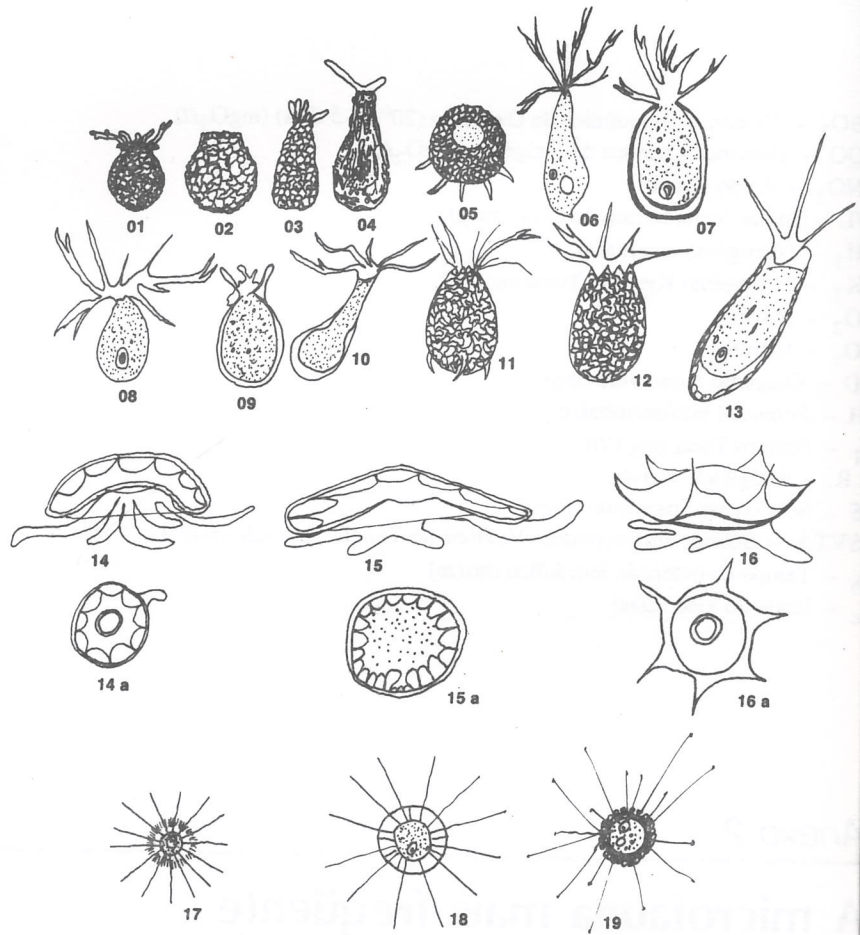
Anexo 2

A microfauna mais freqüente

As figuras que seguem são desenhos ampliados dos protozoários e micrometazoários mais freqüentes em lodos ativados (11,16). No filo Protozoa encontram-se os seguintes grupos: classe Sarcodina, que corresponde às amebas e tecamebas; classe Mastigophora, que compreende os flagelados; classe Ciliata, com os ciliados

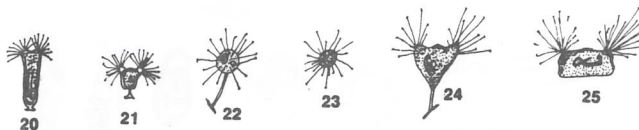
livres e ciliados pedunculados.

A classe Rotífera compreende os rotíferos, sendo os gêneros principais *Philodina*, *Rotaria* e *Epiphanes*. A classe Nematoda e o filo Anelida são geralmente representados pelos gêneros *Rhabditis* e *Aelosoma*, respectivamente. Os rotíferos nematóides e anelídeos são metazoários.



- | | |
|--|--|
| 01. <i>Diffugia urceolata</i> - (200 - 300 μ m) | 12. <i>Euglypha tuberculata</i> - (45 - 100 μ m) |
| 02. <i>Diffugia lebes</i> - (400 μ m) | 13. <i>Trinema lineare</i> - (35 μ m) |
| 03. <i>Diffugia oblonga</i> - (60 - 580 μ m) | 14. <i>Arcella vulgaris</i> - (30 - 100 μ m) |
| 04. <i>Diffugia bacillifera</i> - (145 - 160 μ m) | 14 a. Vista superior |
| 05. <i>Centropyxis aculeata</i> - (100 - 150 μ m) | 15. <i>Arcella discoides</i> - (70 - 260 μ m) |
| 06. <i>Pamphagus mutabilis</i> - (40 - 100 μ m) | 15 a. Vista superior |
| 07. <i>Chlamydephrys stercorea</i> - (18 - 20 μ m) | 16. <i>Arcella dentata</i> - (95 μ m) |
| 08. <i>Chlamydephrys minor</i> - (17 μ m) | 16 a. Vista superior |
| 09. <i>Cochlipodium bilimbosum</i> - (24 - 56 μ m) | 17. <i>Heterophrys myriopoda</i> - (65 - 80 μ m) |
| 10. <i>Cyphoderia ampulla</i> - (60 - 200 μ m) | 18. <i>Astradisculus</i> sp - (13 - 17 μ m) |
| 11. <i>Euglypha alveolata</i> - (50 - 100 μ m) | 19. <i>Pompholyxophrys punicea</i> - (25 - 30 μ m) |

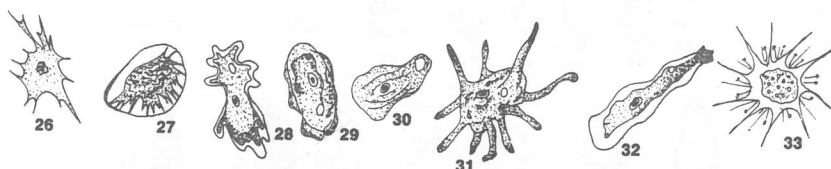
Esquemas 1 a 19 - Filo Protozoa, Classe Sarcodina



20. *Periacineta buckei* - (110 μ m)
 21. *Acineta limnetis* - (80 μ m)
 22. *Podophrya fixa* - (40 - 60 μ m)

23. *Sphaerophya magna* - (75 μ m)
 24. *Podophrya mollis* - (40 μ m)
 25. *Anarma brevis* - (125 μ m)

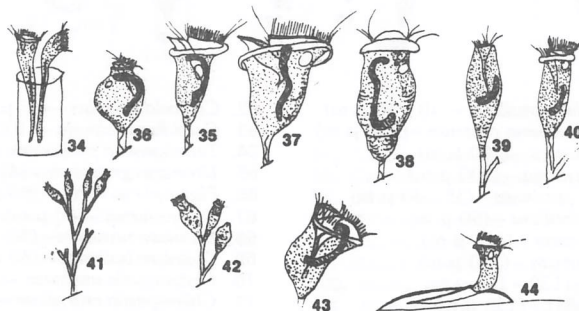
Esquemas 20 a 25 - Filo Protozoa, Classe Ciliata



26. *Nuclearia simplex* - (30 μ m)
 27. *Hyalodiscus rubicundus* - (50 - 80 μ m)
 28. *Amoeba proteus* - (100 - 600 μ m)
 29. *Amoeba verrucosa* - (100 - 200 μ m)

30. *Amoeba striata* - (25 - 45 μ m)
 31. *Amoeba radiosa* - (30 - 120 μ m)
 32. *Amoeba limax* - (50 - 80 μ m)
 33. *Vampyrella lateritia* - (30 - 40 μ m)

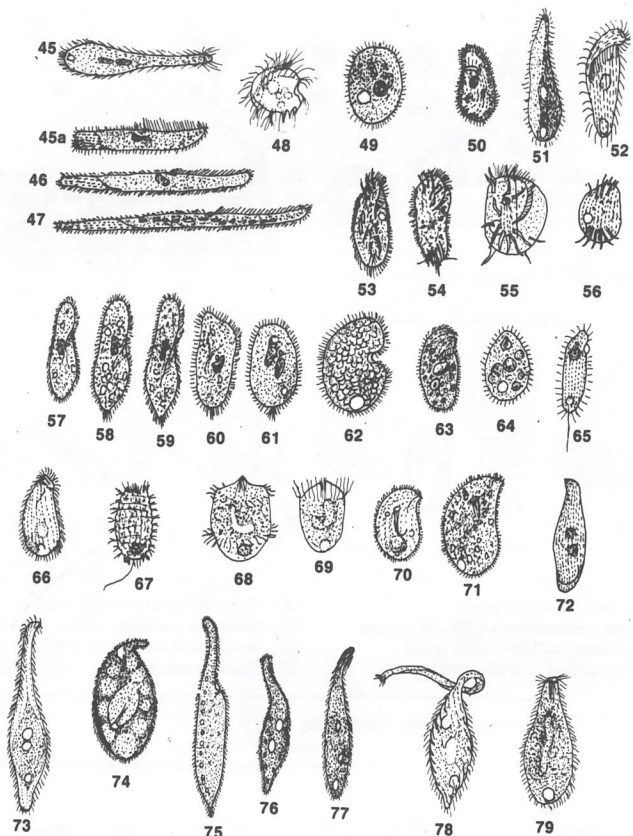
Esquemas 26 a 33 - Filo Protozoa, Classe Sarcodina



34. *Vaginicola tinctoria* - (85 μ m)
 35. *Vorticella nebulifera* (var. *Similis*) - (40 - 90 μ m)
 36. *Vorticella microstoma* - (55 μ m)
 37. *Vorticella campanula* - (100 μ m)
 38. *Vorticella aequalata* - (50 μ m)

39. *Opercularia coarctata* - (50 μ m)
 40. *Zoothamnium arbuscula* - (4 μ m)
 41. *Opercularia coarctata* - (50 μ m)
 42. *Epistylis plicatilis* - (150 μ m)
 43. *Carchesium polypinum* - (1,2 μ m)
 44. *Platycola decumbens* - (90 μ m)

Esquemas 34 a 44 - Filo Protozoa, Classe Ciliata



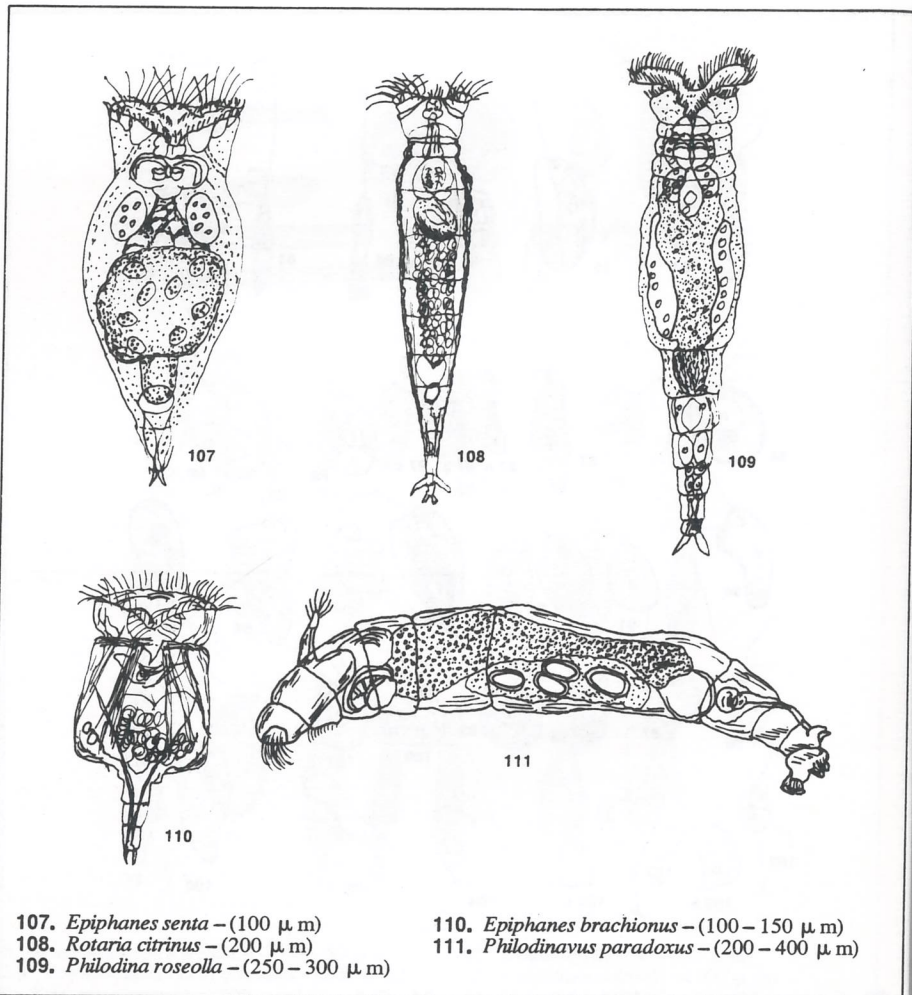
45. *Trachelophyllum pusillum* - (40 - 50 μ m)
 45 a. *Pseudoblepharisma crassum* - (200 μ m)
 46. *Spirostomum teres* - (500 μ m)
 47. *Spirostomum minus* - (900 μ m)
 48. *Saprodinium putrinum* - (35 - 40 μ m)
 49. *Glaucoma scintillans* - (50 μ m)
 50. *Plagiopyla nasuta* - (125 μ m)
 51. *Acinertia incurvata* - (120 μ m)
 52. *Metopus* sp - (120 - 160 μ m)
 53. *Oxytrichia fallax* - (150 μ m)
 54. *Stylonichia mytilus* - (150 μ m)
 55. *Euplotes patella* - (118 μ m)
 56. *Aspidisca costata* - (32 μ m)
 57. *Paramecium aurelia* - (165 μ m)
 58. *Paramecium caudatum* - (210 μ m)
 59. *Paramecium multimicronucleatum* - (275 μ m)
 60. *Paramecium bursaria* - (130 μ m)
 61. *Paramecium trichium* - (90 μ m)
 62. *Colpoda cucullus* - (87 μ m)
 63. *Colpidium colpoda* - (100 μ m)
 64. *Tetrahymena pyriformis* - (50 μ m)
 65. *Uronema griseolum* - (42 μ m)
 66. *Platyophrya vorax* - (60 μ m)
 67. *Coleps hirtus* - (60 μ m)
 68. *Didinium nasutum* - (80 - 150 μ m)
 69. *Didinium balbianii* - (80 μ m)
 70. *Chilodonella uncinata* - (42 μ m)
 71. *Chilodonella cracullata* - (125 μ m)
 72. *Blepharisma lateritum* - (150 - 300 μ m)
 73. *Litonotus fasciola* - (100 - 140 μ m)
 74. *Trachelium ovum* - (330 μ m)
 75. *Dileptus anser* - (155 μ m)
 76. *Amphileptus claparedei* - (250 μ m)
 77. *Trachelophyllum apiculatum* - (560 μ m)
 78. *Lacrymaria olor* - (120 μ m)
 79. *Enchelyodon elegans* - (180 μ m)

Esquemas 45 a 79 - Filo Protozoa, Classe Ciliata

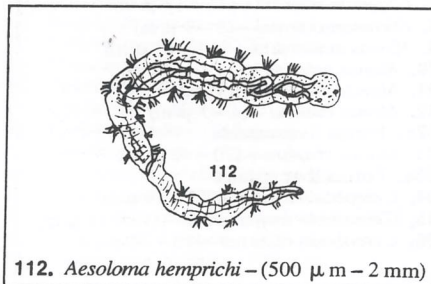


80. *Spiromonas angusta* - (10 μ m)
 81. *Spiromonas socialis* - (10 μ m)
 82. *Bodo* sp - (6 - 15 μ m)
 83. *Chlamydomonas* sp - (25 μ m)
 84. *Peranema trichophorum* - (20 - 110 μ m)
 85. *Heteronema acus* - (40 - 100 μ m)
 86. *Carteria globosa* - (18 - 28 μ m)
 87. *Distigma proteus* - (45 - 110 μ m)
 87 a b c. Mudanças de forma de acordo com o metabolismo
 88. *Polytoma uvella* - (15 - 30 μ m)
 89. *Cyathomonas truncata* - (15 - 30 μ m)
 90. *Bodo caudatus* - (11 - 22 μ m)
 91. *Bodo globosus* - (9 - 13 μ m)
 92. *Bodo lens* - (6 - 7 μ m)
 93. *Euglena viridis* - (35 - 90 μ m)
 94. *Chilomonas paramecium* - (20 - 40 μ m)
 95. *Cercobodo longicauda* - (18 - 36 μ m)
 96. *Oicomonas socialis* - (10 - 15 μ m)
 97. *Oicomonas steinii* - (16 - 17 μ m)
 98. *Oicomonas termo* - (5 - 9 μ m)
 99. *Monas amoebiana* - (12 - 15 μ m)
 100. *Monas vulgaris* - (14 - 16 μ m)
 101. *Monas obliqua* - (6 μ m)
 102. *Monas minima* - (4 - 7 μ m)
 102a. Forma livre natante
 103. *Monas vivipara* - (20 - 40 μ m)
 103a. Forma livre natante
 104. *Cercobodo ovatus* - (15 - 19 μ m)
 105. *Cercobodo craussicauda* - (12 - 16 μ m)
 106. *Cercobodo radiatus* - (10 - 14 μ m)

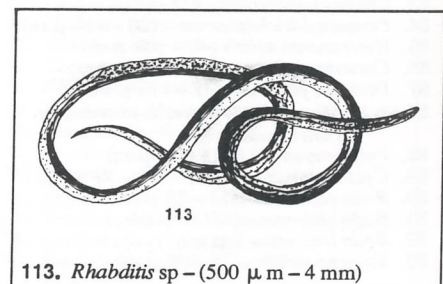
Esquemas 80 a 106 - Filo Protozoa, Classe Mastigophora



Esquemas 107 a 111 - Classe Rotifera



Esquema 112 - Filo Anelida



Esquema 113 - Classe Nematoda

Referências bibliográficas

- 1 - LEHNINGER, A. L. *Bioquímica*, 2ª ed., Edgar Blücher, 1976, vol. 2. 262 p.
- 2 - BRANCO, S. M. *Hidrologia aplicada à Engenharia Sanitária*, 2ª ed. São Paulo, CETESB, 1978, 620 p.
- 3 - HAWKES, H. A. *The ecology of waste water treatment*. Hungary, Pergamon Press Ltd. 1963, 203 p.
- 4 - STANIER, R. Y.; ADELBERG, E. A.; INGRAHAM, J. *The microbial world*, 4ª ed., Prentice Hall, Inc. Englewood Cliffs, New Jersey, 1976, 871 p.
- 5 - MONOD, J. The growth of bacterial cultures. *J. Ann. Inst. Pasteur* - 371-93, 1941.
- 6 - ALVARENGA, E. C. & ALEM SOBRINHO, P. Fundamentos teóricos dos reatores biológicos e sua aplicação ao tratamento de águas residuárias. *Revista DAE*, (113):53-61, 1977.
- 7 - PIKE, E. B.; CARRINGTON, E. G. Recent developments in the study of bacteria in the activated sludge process. *Wat. Pollut. Control*, 71(6): 583-605, 1972.
- 8 - PIPES, W. O. Bulking of activated sludge. *Adv. Appl. Microbiol.*, 9:185-234, 1967.
- 9 - DRAKIDES, C. La microfaune des boues activées. Étude d'une méthode d'observation et application en suivi d'une pilote en phase de démarrage. *Water Research*, 14:199-207, 1980.
- 10 - EIKELBOOM, D. H.; Van BUIJSEN, H. J. J. Microscopic sludge investigation manual. TNO Research Institute for Environmental Hygiene The Netherlands, 1981, 70 p.
- 11 - WARD & WHIPPLE. *Freshwater biology*, 2ª ed. USA. W. T. Edmonson, 1959, 1248 p.
- 12 - SEZGIN, M.; JENKINS, D. e PARKER, D. S. A unified theory of filamentous activated sludge bulking. *J. Wat. Pollut. Cont. Fed.*, 50: 362-81, 1978.
- 13 - SLÁDECEK, V. Saprobic secessions. *Verh. Int. Verein. Limnol.*, 18: 896-902, Stuttgart, 1972.
- 14 - BICH, H. Ciliated Protozoa - An illustrated guide to the species used as biological indicators in freshwater biology. Genebra, OMS, 1972, 198 p.
- 15 - Relatório interno: Pesquisas microbiológicas em ensaios de laboratórios de lodos ativados - Convênio DAEE-CETESB, dez/78.
- 16 - STORER, T. I. *Zoologia geral*, 3ª ed., Brasil, Ed. Nacional, 1977, 757 p.



CETESB



GOVERNO DE SÃO PAULO
CONSTRUINDO UM FUTURO MELHOR