

**Comparação de métodos para identificação de bactérias
filamentosas responsáveis pelo fenómeno de *bulking* numa ETAR**

Por

Margarida Maria Pereira Henriques

Dissertação apresentada na Faculdade de Ciências e
Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa para obtenção do
Grau de Mestre em Engenharia do Ambiente – Perfil Engenharia Sanitária

Orientador:

Professora Doutora Rita Maurício Rodrigues Rosa

Co-Orientador:

Professor Doutor Mário Emanuel Campos de Sousa Diniz

Lisboa

2010

AGRADECIMENTOS

Este trabalho representa a etapa final, e se cheguei até aqui foi também graças às pessoas que me rodeiam e que me acompanharam desde o primeiro dia.

Em primeiro lugar gostaria de agradecer ao meu pai por tudo, pela oportunidade, pelo apoio, força e todo o amor cedido, e em especial dedicar este trabalho à minha mãe que está sempre no meu pensamento.

À professora Doutora Rita Maurício pela orientação, disponibilidade, motivação e companheirismo.

Ao professor Doutor Mário Diniz pela ajuda incondicional no laboratório, preocupação e por todos os esclarecimentos cedidos.

À Eng.^a Eunice das águas do Oeste, pela possibilidade de utilizar o efluente da ETAR de Santa Cruz neste trabalho.

À Júlia e à Sandra pela disponibilidade, esclarecimentos e ajuda prestada.

À D. Luísa e D. Adélia pelo apoio prestado no laboratório.

Ao Pedro, meu namorado, por fazer parte da minha vida e me ajudar a tornar uma pessoa melhor. Obrigada pelo amor, compreensão e força que me dás todos os dias.

À minha amiga Ana Inês pelo apoio, companheirismo e pela força e amizade sincera.

Aos meus irmãos pela preocupação, amizade e pela força sempre presente.

Aos meus avós, pela preocupação, conselhos e pelo carinho prestado ao longo destes anos.

A todos aqueles que não tendo sido mencionados, de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

A todos, muito obrigada.

OBJECTIVO

O presente trabalho incidiu na comparação de diferentes métodos para identificação de organismos filamentosos da ETAR de Santa Cruz, com um sistema de tratamento de lamas activadas, através de uma observação microscópica clássica (amostra bruta e amostra corada) utilizando colorações de Gram, de hematoxilina e eosina e aplicação dos métodos API e MALDI-TOF.

RESUMO

No tratamento secundário de águas residuais, o processo de lamas activadas é o actualmente mais utilizado. Este tratamento assenta no crescimento de bactérias formadoras de flocos que se separam por gravidade do sobrenadante clarificado, sendo indispensável para este processo uma boa floculação consequência de um crescimento equilibrado entre estas bactérias e as bactérias filamentosas. Quando existe um crescimento excessivo destas últimas verifica-se um fenómeno indesejado designado de *bulking* filamentoso.

O presente trabalho teve como principal objectivo a comparação de diferentes métodos para identificação de bactérias filamentosas de uma ETAR com um sistema de tratamento de lamas activadas, nomeadamente através de uma observação microscópica clássica (amostra bruta e amostra corada) utilizando colorações de Gram, de hematoxilina e eosina e aplicação dos métodos API e MALDI-TOF.

Através da observação microscópica das amostras coradas com hematoxilina e eosina foi possível verificar que estavam presentes pelo menos dois tipos de microrganismos. Obtiveram-se igualmente os mesmos resultados com a aplicação da coloração de Gram, tendo os microrganismos presentes sido classificados de Gram negativos.

Relativamente à aplicação do kit API 20 E, foram identificados os géneros *Serratia* e *Enterobacter*. No entanto, não foi possível obter a identificação ao nível da espécie predominante na amostra.

Através da aplicação do método MALDI-TOF-MS, tornou-se possível a identificação de proteínas correspondentes ao género *Serratia sp.*, género *Enterobacter sp.*, espécie *Peptostreptococcus anaerobius*, género *Geobacter sp.*, espécie *Escherichia coli* e espécie *Syntrophus aciditrophicus*.

A principal razão para não ter sido possível uma identificação ao nível da espécie do microrganismo filamentoso predominante esteve relacionada com o facto de não ter sido possível obter uma amostra pura dentro do tempo da realização das experiências. Possivelmente, o meio de cultura escolhido não foi suficientemente selectivo potenciando o crescimento de outras espécies presentes.

Relativamente aos métodos testados concluiu-se que através da observação microscópica utilizando colorações de Gram e hematoxilina e eosina, são fáceis e rápidos de aplicar podendo ser utilizados na identificação rotineira dos organismos presentes numa ETAR.

Em relação ao método API 20 E, é de fácil aplicação e os resultados são obtidos num curto período de tempo, sendo admissível para aplicações de rotina numa ETAR e não sendo o

seu custo muito relevante. O método MALDI-TOF torna-se inoportável para aplicação de determinações de rotina numa ETAR, não só devido ao elevado custo que representa cada amostra (tratamento e determinação), como também o tempo consumido para o tratamento de cada amostra.

Palavras-chave: lamas activadas; microrganismos; *bulking*; identificação; Observação microscópica; API 20 E; MALDI-TOF-MS;

ABSTRACT

In the secondary treatment of wastewater, the activated sludge process is, currently, the most used treatment. This treatment is based on the growth of flake forming bacteria that separate due to the clarified gravity of the supernatant which is essential for this process to maintain a balanced flocculation growth between the bacteria and the filamentous bacteria. The overgrowth of the filamentous bacteria is called the *filamentous bulking phenomenon*.

This paper's main goal was to compare the different methods of identification of filamentous bacteria from a wastewater treatment plant with a activated sludge treatment system, mainly through a classical microscopic observation (crude sample and stain sample) using Gram staining, hematoxylin and eosin, the application of the API methods and MALDI-TOF.

Through the microscopic observation of samples stained with hematoxylin and eosin, it was possible to identify the presence of at least two types of microorganisms. The same result was obtained through the use of Gram staining, classifying the microorganisms as Gram negative.

With the application of the API 20 E kit, genus *Serratia* and genus *Enterobacter* were identified. However, it was not possible to identify the predominant species level in the sample.

By applying the method MALDI-TOF-MS, it became possible to identify proteins corresponding to the Genus *Serratia sp.*, Genus *Enterobacter sp.*, *Anaerobius Peptostreptococcus species*, Genus *Geobacter sp.*, *Escherichia coli* and *Syntrophus Aciditrophicus species*.

The main reason for not being able to identify the level of the predominant filamentous microorganism species was related to the fact that it was not possible to obtain a pure sample during the experiments. Possibly, the culture medium chosen was not sufficiently selective causing the stimulation of growth of other present species.

In relationship to the methods tested, it was found that microscopic observation with the Gram staining, hematoxylin and eosin, was easy and quick to implement and can also be used in routine identification of organisms present in wastewater treatment plants.

The method API 20 E, is easy to apply and the results are obtained in a short period of time, being admissible for routine applications in wastewater treatment plants and the cost is not very relevant.

Finally, we can conclude that the MALDI-TOF method becomes unaffordable for routine applications in a wastewater treatment plant, not only because of the high cost of each

sample (treatment and determination) but also because of the time consumed in the treatment of each sample.

Keywords: activated sludge; microorganisms; *bulking*; identification; Microscopic observation; API 20 E; MALDI-TOF-MS;

ÍNDICE DE MATÉRIAS

1. Introdução	1
2 - Princípio de um sistema de tratamento por lamas activadas	1
2.1 - Tratamento Secundário – Lamas Activadas	2
2.2 – Principais microrganismos presentes em sistemas de lamas activadas	3
2.3 – Características que influenciam o crescimento de organismos filamentosos	4
2.4 – Principais problemas na estrutura dos flocos em lamas activadas	8
2.5 – Características presentes nos organismos filamentosos	11
2.5.1 - <i>Microthrix parvicella</i>	13
2.5.2 - <i>Nocardia</i> sp.....	13
2.5.3 - <i>Haliscomenobacter hydrossis</i>	14
2.5.4 - <i>Nostocoida limicola</i> I.....	14
2.5.5 - <i>Nostocoida limicola</i> II.....	15
2.5.6 - <i>Nostocoida limicola</i> III.....	15
2.5.7 - <i>Sphaerotilus natans</i>	16
2.5.8 - <i>Thiothrix</i> I.....	16
2.5.9 - <i>Thiothrix</i> II.....	17
2.5.10 - Tipo 021N.....	17
2.5.11 - Tipo 0914	18
2.5.12 - <i>Beggiatoa</i> sp.....	18
2.5.13 - Tipo 0411	19
2.5.14 - Tipo 1863	19
2.5.15 - Tipo 0092	20
2.5.16 - Tipo 0803	20
2.5.17 - Tipo 0041	21
2.5.18 - Tipo 1701	21
2.5.19 - Tipo 0961	22
2.5.20 - Tipo 0581	22
2.5.21 - Tipo 0675	23
2.5.22 - Tipo 1851	23
2.6 – Estratégias de remediação de <i>bulking</i> Sludge	28
2.6.1 – Selectores.....	28
2.6.2 – Cloro.....	35
2.6.3 – Peróxido de hidrogénio	36
2.6.4 – Ozono.....	36
2.6.5 – Filamenticidas.....	36

2.7 – Métodos para identificar bactérias filamentosas	37
2.7.1 – Observação microscópica	37
2.7.2 – Coloração de Gram	38
2.7.3 – Coloração de Neisser	39
2.7.4 – Análise de Índice de perfil - API	39
2.7.5 – Espectrometria de Massa de MALDI-TOF	39
2.7.6 – Técnica FISH.....	43
3 – Materiais e Métodos.....	45
3.1 - Colheita e armazenamento da Amostra	45
3.1.1 – Meio de cultura	45
3.2 – Observação Microscópica e Colorações	48
3.2.1 – Coloração de Gram.....	49
3.2.2 – Coloração de hematoxilina & eosina.....	51
3.3 – Método API 20 E.....	52
3.4 – MALDI-TOF MS	57
4 – Resultados e Discussão.....	63
4.1 – Meios de cultura	63
4.2 – Coloração de hematoxilina & eosina	64
4.3 – Coloração de Gram	65
4.4 – Kits API.....	68
4.5 – MALDI-TOF	72
5 – Conclusão	79
6 – Referências Bibliográficas.....	81

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1- Processo de lamas activadas	3
Figura 2.2 - A) <i>Microthrix parvicella</i> . 1000x; B) <i>Microthrix parvicella</i> . 1000x.	13
Figura 2.3 - A) <i>Nocardia</i> sp. 1000x	14
Figura 2.4 - A) <i>Haliscomenobacter hydrossis</i> . 1000x; B) <i>Haliscomenobacter hydrossis</i> . 1000x	14
Figura 2.5 - A) <i>Nostocoida limícola</i> I. 1000x; B) <i>Nostocoida limícola</i> I. 1000x	15
Figura 2.6 - A) <i>Nostocoida limicola</i> II. 1000x; B) <i>Nostocoida limicola</i> II. 1000x.....	15
Figura 2.7 - <i>Nostocoida limicola</i> III. 1000x	16
Figura 2.8 - A) <i>Sphaerotilus natans</i> . 1000x; B) <i>Sphaerotilus natans</i> . 1000x	16
Figura 2.9 - A) <i>Thiothrix</i> I. 100x; B) <i>Thiothrix</i> I. 1000x.....	17
Figura 2.10 - A) <i>Thiothrix</i> II. 1000x; B) <i>Thiothrix</i> II. 1000x.....	17
Figura 2.11 - A) Tipo 021N. 1000x; B) Tipo 021N. 1000x	18
Figura 2.12 - Tipo 0914. 1000x.....	18
Figura 2.13 - <i>Beggiatoa</i> . 1000x.....	19
Figura 2.14 - A) Tipo 0411. 1000x; B) Tipo 0411. 1000x.	19
Figura 2.15 - A) Tipo 1863. 1000x; B) Tipo 1863. 1000x	20
Figura 2.16 - A) Tipo 0092. 1000x; B) Tipo 0092. 1000x	20
Figura 2.17 - Tipo 0803. 1000x.....	21
Figura 2.18 - A) Tipo 0041. 1000x; B) Tipo 0041. 1000x.	21
Figura 2.19 - A) Tipo 1701. 1000x; B) Tipo 1701. 1000x	22
Figura 2.20 - A) Tipo 0961. 1000x; B) Tipo 0961. 1000x.	22
Figura 2.21 - Tipo 0581. 1000x.....	23
Figura 2.22 - Tipo 0675. 1000x.....	23
Figura 2.23 - Tipo 1851. 1000x.....	24
Figura 2.24 – Identificação de organismos filamentosos usando a chave dicotómica	25
Figura 2.25 - Representação esquemática de um selector em lamas activadas.	29
Figura 2.26 - Adição de cloro/peróxido de hidrogénio no controlo do bulking.....	35
Figura 2.27 - Método MALDI-TOF.....	41
Figura 2.28 - Esquema da espectrometria de massa em proteómica baseada numa estratégia do tipo “Top-Down”.....	42
Figura 2.29 - Esquema da espectrometria de massa em proteómica baseada numa estratégia do tipo “bottom-up”	43
Figura 3.1 - A) Tanque de arejamento; B) decantador secundário da ETAR de Santa Cruz.	45
Figura 3.2 - A) Balança analítica; B) placa de aquecimento e agitação.	46
Figura 3.3 - A) Meios de cultura em Erlenmeyer e caixas de Petri; B) Autoclave.....	47

Figura 3.4 - A) Meio de cultura nas caixas de Petri; B) Agitação de uma suspensão de bactérias no vórtex; C) Inoculação em placas de agar; D) Incubadora.....	48
Figura 3.5 - Microscópio óptico.....	49
Figura 3.6 - Lâmina de vidro com camada fina de amostra.....	50
Figura 3.7 - A) Esfregaço com solução de violeta de cristal; B) Esfregaço com solução de iodo.....	50
Figura 3.8 - A) Solução de descoloração (acetona); B) Corante de contraste (safranina)....	51
Figura 3.9 - A) Corantes hematoxilina-eosina; B) Microscópio óptico.	52
Figura 3.10 - A) Fundo da Caixa de incubação com água destilada; B) Galeria na caixa de incubação.	52
Figura 3.11 - A) Ampolas com colónias isoladas em condições de assepsia; B) Vórtex para homogeneizar as bactérias.	53
Figura 3.12 - A) Suspensão nos tubos da galeria; B) Óleo de parafina; C) Caixas de incubação fechadas; D) Galerias na incubadora.....	54
Figura 3.13 - A) Galeria após a incubação; B) Quadro de leitura.....	55
Figura 3.14 - Ficha de resultados.....	56
Figura 3.15 - A) Reagentes usados em alguns testes; B) Galerias após a adição de reagentes.....	56
Figura 3.16 - A) Desnaturar as proteínas; B) Tina de electroforese.	59
Figura 3.17 - A) Correr as soluções com o auxílio da pipeta; B) Mini tanque com tampa e cabos ligados.....	59
Figura 3.18 - A) Separação dos pratos para remover o gel; B) Gel na presença de descoloração.	60
Figura 3.19 - A) Banho de ultra-sons; B) Sonda de ultra-sons.....	61
Figura 3.20 - Placa de MALDI.....	62
Figura 4.1 - A) Placas com bactérias na 1ª repicagem; B) Placas com bactérias na 2ª repicagem.....	63
Figura 4.2 - A) e B) Aspecto geral da lama (sem corante) ampliação 400x.....	64
Figura 4.3 - A) e B) Aspecto geral da lama com corante hematoxilina-eosina ampliação 400x; C) e D) Presença de organismos filamentosos com corante hematoxilina-eosina ampliação 1000x.....	65
Figura 4.4 - A) e B) Lamas activadas após coloração de Gram.	66
Figura 4.5 - A) Filamentos após coloração de Gram na 1ª repicagem; B), C) e D) Filamentos após coloração de Gram na 2ª repicagem.	67
Figura 4.6 - Galeria após incubação.	68
Figura 4.7 - A) Ficha de resultados 1; B) Ficha de resultados 2; C) Ficha de resultados 3. .	70

Figura 4.8 - P3 (100 Kda) (Gel#1: Lane 1 – padrão LMW, Lane 2 – fracção proteínas solúveis M1; Lane 3 – fracção proteínas insolúveis M1; Lane 4 – fracção proteínas solúveis M1 (diluído 1:10); Lane 5 – fracção proteínas insolúveis M1; Lane 6 – fracção proteínas solúveis I1 (diluído 1:10); Lane 7 – fracção proteínas insolúveis I1 (diluído 1:10); Lane 8 – fracção proteínas solúveis I1; Lane 9 – fracção proteínas insolúveis I1).	72
Figura 4.9 - P5 (66 Kda), P6 (60 Kda) (Gel#2: Lane 1 - padrão LMW, Lane 2 - fracção proteínas solúveis M2 (diluído 1:10); Lane 3 - fracção proteínas insolúveis M2 (diluído 1:10); Lane 4 - fracção proteínas solúveis M2 (diluído 1:10); Lane 5 - fracção proteínas solúveis M2; Lane 6 - fracção proteínas insolúveis M2; Lane 7 - fracção proteínas solúveis I2; Lane 8- fracção proteínas insolúveis I2).	73
Figura 4.10 - A), B) e C) Espectro MALDI-TOF-TOF MS.....	75

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 2.1- Causas associadas ao crescimento de organismos filamentosos em lamas activadas.....	5
Quadro 2. 2 - Organismos filamentosos que causam <i>bulking</i> e <i>foaming</i> nas lamas activadas.	11
Quadro 2.3 - Sumário das características morfológicas e de colorações dos organismos filamentosos comuns em lamas activadas.....	26
Quadro 2.4 - Eficácia dos selectores no controlo de organismos filamentosos.....	30
Quadro 2.5 - Sumário das causas do <i>bulking</i> filamentoso e sugestões de métodos de tratamento.....	30
Quadro 2.6 - Características típicas dos selectores aeróbios, anóxicos e anaeróbios em sistemas de tratamento de águas residuais domésticas	31
Quadro 2.7 - Características do método MALDI-TOF	42
Quadro 4.1 - Diferentes programas para identificar as bactérias predominantes através do kit API 20 E.....	70
Quadro 4.2 - Correspondência e cobertura da sequência de péptidos da digestão em gel...76	

SIMBOLOGIA E NOTAÇÕES

AGVs	Ácidos gordos voláteis
CBO ₅	Carência bioquímica de oxigénio - 5 dias
Cl	Cloro
CQO	Carência química de oxigénio
DNA	Ácido desoxirribonucleico
F/M	Relação alimento - microrganismos
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogénio
IL	Idade de lamas
MALDI-TOF	Ionização/Dessorção da Matriz Assistida por Laser – tempo de voo
MLSS	Sólidos em suspensão no licor misto
MLVSS	Sólidos voláteis em suspensão no licor misto
MS	Espectrometria de massa
MS/MS	Espectrometria de massa em tandem
N	Azoto
NO ₃	Nitrato
NO ₂	Nitrito
O ₃	Ozono
OD	Oxigénio dissolvido
P	Fósforo
PHA	Poli-hidroxicarboxilato
rbCQO	Carência química de oxigénio facilmente assimilável
RNA	Ácido ribonucleico
SDS-PAGE	Sulfato dodecil de Sódio - eletroforese em gel de poliacrilamida
SVI	Índice de volume de lamas

1. Introdução

Todas as comunidades produzem resíduos líquidos e sólidos diariamente sendo imprescindível a existência de um processo de tratamento dos mesmos. Um dos resíduos líquidos, conhecido por água residual possui na maior parte dos casos, propriedades tóxicas, cancerígenas e, ou mutagénicas, que podem contaminar o ar e a água, provocando um impacto indesejável nos ecossistemas e nos humanos. É extremamente importante ter a noção dos impactos destes compostos no ambiente e, desse modo, desenvolver métodos de remoção destes contaminantes de forma eficaz ao nível da eficiência de tratamento (MetCalf e Eddy, 2003).

O processo biológico de lamas activadas é um dos processos mais usados no tratamento de águas residuais. Este processo foi inicialmente desenvolvido em 1914 por Arden e Lockett em Inglaterra (1914) (Vesilind, 2003).

Para que o processo de lamas activadas funcione adequadamente, as lamas que saem do tanque de arejamento devem ser facilmente separadas da fase líquida, normalmente num órgão designado de decantador secundário. Uma boa separação (decantação e sedimentação) e compactação (espessamento) das lamas activadas é condição necessária para garantir uma boa qualidade do efluente no processo de lamas activadas (Flores-Alsina *et. al.*, 2009). Quando esse facto não se materializa, isto é, quando a lama é leve ou floculenta mas de difícil decantação, poderá estar a ocorrer um fenómeno de *bulking*, normalmente resultado da propagação de organismos filamentosos (Oliveira, 1982). Nestas condições, as lamas saem do processo juntamente com o efluente tratado, o qual passa a apresentar uma CBO (ou CQO) elevada (Raimundo, 2009).

O *bulking sludge* é um termo usado para descrever o excessivo crescimento das bactérias filamentosas sendo um problema comum no processo de lamas activadas.

2 - Princípio de um sistema de tratamento por lamas activadas

O tratamento de águas residuais através de lamas activadas é um processo de tratamento biológico no qual os compostos orgânicos solúveis são convertidos em dióxido de carbono, água e células bacterianas. O principal objectivo do tratamento de uma água residual através de sistemas por lamas activadas é a remoção de substâncias orgânicas biodegradáveis e produção de um efluente com reduzidos compostos orgânicos biodegradáveis e sólidos em suspensão (Eckenfelder *et al.*, 1986).

O processo de lamas activadas é constituído por duas etapas de tratamento básicas: a primeira num tanque de arejamento e a segunda num decantador secundário. O tanque de

arejamento (fase bioquímica) permite criar um ambiente onde as bactérias crescem e onde existe uma mistura quase completa com compostos orgânicos presentes na água residual, na presença de oxigênio dissolvido. Os microrganismos, através da oxidação biológica e adsorção física, removem os materiais orgânicos presentes na água residual (Eckenfelder *et al.*, 1986).

No decantador secundário materializa-se uma separação de fases, líquida e sólida. Uma parte dos sólidos (lamas) são recirculados para o tanque de arejamento e outra parte extraída do sistema (lamas em excesso). A recirculação de lamas permite níveis adequados de sólidos suspensos no tanque de arejamento de forma a garantir que a carga mássica se mantenha constante. O sistema de lamas activadas é um processo de tratamento que poderá permitir uma elevada eficiência de remoção de nutrientes e CBO_5 , contudo, apresenta alguns inconvenientes como um consumo energético, custos de implantação e manutenção relativamente elevados (Eckenfelder *et al.*, 1986).

2.1 - Tratamento Secundário – Lamas Activadas

O processo de tratamento por lamas activadas tem vindo a ser utilizado para águas residuais domésticas e industriais desde há cerca de meio século. (Grijpspeerdt e Verstraete, 1996). Os efluentes domésticos são constituídos fundamentalmente por matéria orgânica que se encontra na forma solúvel ou na forma coloidal, sendo a composição química bastante variável dependendo de variações sazonais, variações diárias e até mesmo do nível de vida das populações (Oliveira, 1982). Estima-se que, em cerca 70% das ETAR que incluem no seu sistema de tratamento processos de lamas activadas, ocorrem problemas de sedimentabilidade de lamas, pelo menos, uma vez por ano. Para que ocorra uma boa sedimentabilidade dos sólidos suspensos é fundamental a presença de uma lama com flocos firmes, densos e redondos, de forma a que se materializa uma boa compactação (Grijpspeerdt e Verstraete, 1996).

Como já foi referido, o processo de lamas activadas baseia-se no crescimento da biomassa em suspensão, na presença de oxigênio e na sua posterior separação por gravidade. O teor de oxigênio mínimo no tanque de arejamento deverá situar-se entre 1 - 2 mg/l e o tempo de retenção varia em função das características do efluente e o grau de depuração desejado. O efluente resultante da etapa de arejamento contém baixo teor em substâncias orgânicas dissolvidas, no entanto, tem grandes quantidades de sólidos suspensos totais que deverão ser separados e conseqüentemente removidos num decantador secundário. Para manter a eficiência do processo, parte das lamas decantadas no decantador secundário (ricas em microrganismos) são recirculadas para o tanque de arejamento, como já foi referido (Santana, *et. al.*, 2009).

O floco biológico (lamas activadas) são massas biologicamente activas resultantes de processos de floculação de partículas coloidais orgânicas e inorgânicas e de células vivas (Santana, *et. al.*, 2009) e conseqüentemente necessitam de tratamento e, ou destino final adequado.

O tratamento de lamas tem como objectivos a redução do seu volume, ou seja, a diminuição do teor em água e a redução da sua capacidade de fermentação, contribuindo para minimizar a ocorrência de maus cheiros e para diminuir do número de microrganismos patogénicos presentes na lama

A escolha das etapas que constituem o processo de tratamento e conseqüentemente a configuração do tanque de arejamento relacionam-se directamente com a qualidade do efluente final pretendido. Na figura 2.1 mostra-se o esquema clássico de tratamento associado aos sistemas de lamas activadas (MetCalf e Eddy, 2003).

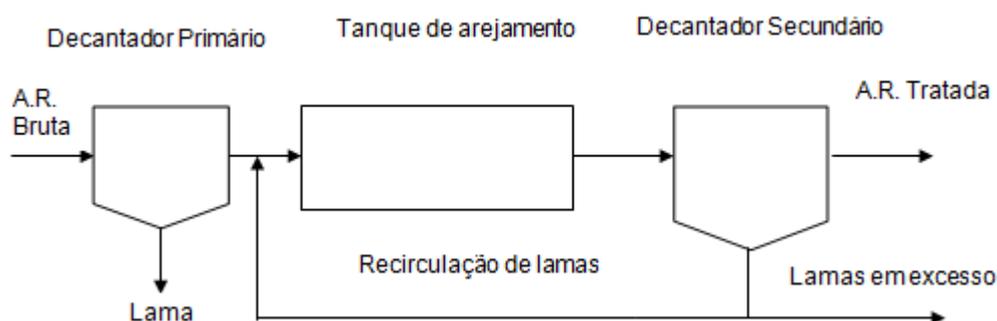


Figura 2.1- Processo de lamas activadas (adaptado de MetCalf e Eddy, 2003).

2.2 – Principais microrganismos presentes em sistemas de lamas activadas

Os microrganismos que se encontram nas águas residuais e nos processos de tratamento incluem: bactérias, leveduras, fungos, algas, protozoários, rotíferos, larvas e insectos (Oliveira, 1982). Contudo, as bactérias são o grupo microbiano mais comum nos sistemas de lamas activadas, correspondendo a 95% do total da população microbiana (Martins,*et. al.*, 2004).

O floco biológico das lamas activadas é formado por uma componente orgânica e outra inorgânica, sendo constituído por diversas espécies de bactérias representadas pelos géneros *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Citromonas*, *Arthrobacter* e *Zoogloea* (Jenkins, *et. al.*, 2004). As bactérias são organismos unicelulares procarióticos e podem apresentar diferentes tipos de morfologia: esfera (cocos), cilindros (bacilos ou bastonetes), hélices rígidas (vibriões, espirilos) e hélices flexíveis (espiroquetas)

(Lopes & Fonseca, 1996). O interior da célula contém proteínas coloidais em suspensão, hidratos de carbono e outros compostos orgânicos complexos que, por sua vez, contém ácido ribonucleico (RNA) responsável pela síntese de proteínas. Dentro do citoplasma existe também o ácido desoxirribonucleico (DNA) que contém toda a informação necessária para a reprodução de todos os componentes celulares (MetCalf e Eddy, 2003).

As características bioquímicas das bactérias apresentam tal diversidade que possibilitam metabolizar a maior parte das substâncias orgânicas das águas residuais (Silva & Mara, 1979). Quando se dá a evolução normal das populações em condições naturais, passasse simultaneamente da fase dispersa à fase floculada, aumentando progressivamente a dimensão e o peso dos organismos e, conseqüentemente, diminuindo a quantidade de substâncias orgânicas presentes na fase solúvel (Oliveira, 1982).

Normalmente, existem nas lamas activadas cerca de seis grupos de protozoários: flagelados, amebas, ciliados móveis e sésseis, rotíferos e invertebrados. A disponibilidade de alimento, principalmente de bactérias dispersas, ou a presença de turvação em lamas activadas, é determinante para a existência destes organismos (Jenkins, *et. al.*, 2004). Os protozoários presentes no tanque de arejamento participam na eliminação das bactérias dispersas no meio, ou seja, que dificilmente floculam, facilitando a clarificação dos efluentes. O seu desaparecimento do sistema deve-se, normalmente, a uma deficiência de oxigénio dissolvido ou à presença de substâncias tóxicas (MetCalf e Eddy, 2003).

Assim, o equilíbrio ecológico nas populações que se encontram nas lamas activadas é praticamente dominado por dois grupos fundamentais de microrganismos: bactérias e protozoários (Oliveira, 1982).

2.3 – Características que influenciam o crescimento de organismos filamentosos

Os diversos microrganismos filamentosos diferem entre si quanto às necessidades de substrato e nutrientes, capacidade metabólica e resistência aos diversos factores ambientais. Por isso, a identificação das causas de determinado desequilíbrio do crescimento filamentoso apela, também, ao conhecimento das características ecológicas de cada espécie ou tipo. Segundo Dabert *et al.*, (2001) existem falhas nos sistemas de lamas activadas devido a uma falta de compreensão da composição da comunidade microbiana nesses sistemas. No Quadro 2.1 mostram-se alguns destes microrganismos e as causas que lhe estão associadas.

Quadro 2.1 - Causas associadas ao crescimento de organismos filamentosos em lamas activadas (adaptado de MetCalf e Eddy, 2003).

Causa	Organismos Filamentosos
Baixo teor de oxigénio dissolvido	<i>Sphaerotilus natans</i>
	<i>Haliscomenobacter hydrossis</i>
	Tipo 1701
	<i>Microthrix parvicella</i>
Baixo F/M	Tipo 0041
	Tipo 0675
	Tipo 0092
	Tipo 1851
	<i>Microthrix parvicella</i>
Elevada concentração de ácidos orgânicos de baixo peso molecular	<i>Thiothrix</i> I e II
	<i>Nostocoida limicola</i> I, II e III
	Tipo 0914
	Tipo 0411
	Tipo 0961
	Tipo 0581
	Tipo 021N
	Tipo 0092
Presença de ácido sulfídrico	<i>Thiothrix</i> I e II
	Tipo 021N
	<i>Beggiatoa</i> sp.
	Tipo 0914
Carência em nutrientes (azoto e fósforo)	Tipo 021N
	Tipo 0041
	Tipo 0675
	<i>Thiothrix</i> I e II
	<i>Nostocoida limicola</i> III
	<i>Haliscomenobacter hydrossis</i>
pH baixo	<i>Sphaerotilus natans</i>
	Fungos

A partir da observação do Quadro 2.1, verifica-se que para baixos teores de oxigénio, promove o aparecimento de organismos do Tipo 1701 e *S. natans*.

De um modo geral, o crescimento excessivo das formas filamentosas pode ser atribuído a um conjunto de factores, nomeadamente, (MetCalf e Eddy, 2003; Tsang, 2008):

- baixo teor em oxigénio dissolvido;
- carência em nutrientes;
- presença de águas sépticas;
- baixa razão alimento/microrganismos (F/M);
- elevada idade de lamas;
- configuração do próprio reactor biológico;
- temperatura;
- pH;

Oxigénio Dissolvido

Na presença de baixas concentrações de oxigénio dissolvido no licor misto, há uma reduzida penetração de oxigénio no floco biológico e apenas uma pequena fracção da massa bacteriana exhibe crescimento aeróbio. Por outro lado, quando existem elevados teores em oxigénio no reactor, a formação de bactérias floculantes (*Floc-formers*) é favorecida. A maioria dos organismos presentes nas estações de tratamento de águas residuais por processos biológicos são do tipo facultativo, isto é, podem funcionar de forma aeróbia, na presença de oxigénio, ou de forma anaeróbia, na ausência deste elemento (Oliveira, 1982).

Nutrientes

Os organismos aeróbios necessitam, embora em reduzidas quantidades, de nutrientes, nomeadamente, de azoto, fósforo e outros elementos para uma óptima actividade metabólica (Oliveira, 1982). Um tratamento biológico correcto de uma água residual deve apresentar uma relação de $CBO_5 / N / P$ em conformidade com os valores 100 / 5 / 1 (Sardinha, 2009; Eckenfelder *et al.*, 1986). Nas águas residuais domésticas existe normalmente um excesso destes nutrientes (Oliveira, 1982), sendo relativamente fácil atingir esta relação. Contudo, nas águas residuais industriais, existe, por vezes, uma deficiência de azoto e fósforo que deverão ser fornecidos como nutrientes suplementares para garantir um tratamento eficiente deste tipo de água residual. As quantidades de azoto e fósforo a adicionar em excesso podem estar relacionadas com a composição da biomassa, sendo que a biomassa activa contém aproximadamente 12,3% de azoto e 2,6% de fósforo (Oliveira, 1982). A deficiência de qualquer um destes nutrientes pode provocar dispersão ou crescimento de organismos filamentosos e/ou limitar a remoção de CBO. Esta ocorrência provocará um aumento dos sólidos biológicos no efluente final e uma diminuição na eficiência de remoção de CBO dos sistemas (Eckenfelder *et al.*, 1986).

Kampfer *et. al.* (1995), estudaram as carências nutricionais de 68 estirpes de bactérias filamentosas dos géneros *Sphaerotilus* e *Haliscomenobacter*, tipo 021N e 1701 e alguns nocardioformes, isolados das lamas activadas de diversas instalações. Estes autores verificaram que todas as estirpes isoladas não cresciam em meios com concentrações de amónia inferiores a 1 mg NH₄-N /L, de fósforo inferiores as 2,5 mg P/L e que o cálcio e o magnésio eram nutrientes essenciais para o crescimento de todas as estirpes, sendo que para concentrações de 20 mg Ca/L e 0,1 mg Mg/L apenas algumas estirpes apresentavam um crescimento significativo. Foi concluído neste estudo também que, em geral, os nocardioformes e os organismos filamentosos do género *Sphaerotilus* toleravam uma vasta gama de diferentes condições nutricionais e que os tipos 021N e 1701 e o género *Haliscomenobacter* eram aqueles que apresentavam maior sensibilidade a variações de condições do meio, com o género *Haliscomenobacter* a apresentar a maior sensibilidade.

Águas Sépticas

Os filamentos do tipo 0961, 0581 e 0092 têm origem, normalmente, devido à presença de fenómenos de septicidade de águas residuais e presença de ácidos orgânicos. Existe alguma selecção destes filamentos de acordo com o tipo de ácidos orgânicos presentes; por exemplo, os organismos *Thiothrix* I e II têm maior apetência para os ácidos orgânicos simples, nomeadamente os ácidos acético, propiónico e butírico e os organismos dos tipos 0581 e 0092 preferem um maior número de carbonos e ácidos orgânicos complexos (Jenkins, *et.al.*, 2004).

Carga Mássica (F/M)

O desempenho do processo das lamas activadas e as características da lama estão relacionados com a carga mássica (F/M), que indica, a relação entre a quantidade de substrato (F) e a quantidade de microrganismos (M), e também com a idade de lamas (IL), que se define como o tempo médio que a biomassa está dentro do sistema (Oliveira, 1982; Eckenfelder *et. al.*, 1986).

Em alguns casos, quando existem elevadas cargas mássicas (F/M) e a idade de lamas (IL) é baixa poderá ocorrer a dispersão de organismos filamentosos com propriedades de fraca sedimentabilidade. Normalmente, e por outro lado, quando a carga mássica (F/M) é baixa e a idade de lamas (IL) alta, verifica-se um crescimento acentuado de flocos (Eckenfelder *et al.*, 1986; Oliveira, 1982).

A taxa de sedimentação no decantador pode ser relacionada com a carga mássica. Em sistemas com elevada carga mássica (F/M elevado, por exemplo > 0,6 g CBO/ g MLVSS dia), a lama pode tornar-se clara e macia e pode potenciar o desenvolvimento de organismos filamentosos surgindo fenómenos de *bulking*. Por outro lado, quando o F/M é

baixo ($< 0,3$ g CBO/ g MLVSS dia), o défice nutricional não permite o crescimento destes microrganismos que não flocculam, isto é, poderá ocorrer uma dispersão de flocos, provocando um aumento de sólidos suspensos no efluente (Eckenfelder *et al.*, 1986) (Oliveira, 1982). Nestes casos o efluente poderá apresentar, em consequência, um valor de CBO₅ anormalmente elevado. Os valores óptimos de F/M variam para cada sistema de tratamento (Oliveira, 1982).

Configuração do Reactor Biológico

Num reactor de fluxo pistão, as partículas passam ao longo do reactor com uma mistura longitudinal mínima ou mesmo nula e saem do reactor na mesma sequência. A presença de elevada carga orgânica afluenta vai diminuir ao longo do reactor conforme a matéria orgânica vai sendo assimilada. Este tipo de reactor não estimula, geralmente, o crescimento de bactérias filamentosas (MetCalf e Eddy, 2003).

Num reactor de mistura completa, as baixas razões F/M e de oxigénio dissolvido (OD) podem estimular o crescimento de bactérias filamentosas causando problemas de *bulking* (MetCalf e Eddy, 2003).

Temperatura

A temperatura é uma das variáveis com maior importância no processo de lamas activadas, proporcionando diversos efeitos na sedimentabilidade e na taxa da actividade biológica. Normalmente e até determinados valores, se a temperatura aumenta, a actividade biológica também aumentará. Por esse motivo, dependendo das temperaturas presentes no tanque de arejamento, podem ter-se presentes diferentes tipos de espécies microbiológicas. A temperatura poderá estar dependente do material de construção do tanque e das suas dimensões físicas, das condições ambientais envolventes, da temperatura do afluenta e da perda de calor nos arejadores (Eckenfelder *et al.*, 1986).

pH

No sistema de lamas activadas, as condições de funcionamento deverão ser óptimas para um eficiente tratamento da água residual, nomeadamente para que os microrganismos actuem de forma eficiente no tratamento. Assim, o valor de pH deverá estar entre 6,5 e 8,5. A eficiência do processo diminui quando estamos perante uma gama superior ou inferior aos valores referidos (Eckenfelder *et al.*, 1986).

2.4 – Principais problemas na estrutura dos flocos em lamas activadas

Existem vários tipos de problemas que afectam o processo de separação de sólidos em lamas activadas, nomeadamente, a presença de determinados microrganismos, que

proporcionam efeitos como o crescimento disperso, *pin floc*, *bulking* filamentoso e *bulking* viscoso, escumas (*foam/scum*). Estes problemas fazem com que o floco não compacte correctamente, provocando obstruções e problemas nas operações seguintes (MetCalf e Eddy, 2003; Wanner, 1994).

Crescimento disperso

O crescimento disperso é causado pela ausência de pontes de exopolímeros, em que os microrganismos não se ligam uns aos outros, encontram-se livremente dispersos no meio como células individuais e com um diâmetro de 10-20 μm (Wanner, 1994).

Existem diversas causas para o crescimento disperso, como a não agregação de células bacterianas, ou, segundo outros autores, as causas para a desfloculação estão relacionados com uma alta relação de catiões monovalentes/catiões bivalentes (Higgins & Novak, 1997) e a presença de tensoactivos (substâncias que diminuem a tensão entre dois líquidos) dificilmente biodegradáveis (Bott & Love, 2002).

“Pin-point floc” – Formação de microflocos

O *Pin-point floc* ocorre quando estão presentes bactérias em forma de flocos, muito pequenos (50-100 μm), que dificilmente sedimentam, embora sendo esféricos e compactos (Wanner, 1994). Se a formação do floco não for bem desenvolvida, poderá ocorrer no tanque de arejamento a destruição destes através da turbulência provocada pelos difusores de ar ou mecanismos de arejamento (Gray, 2004; Wanner, 1994).

Wanner (1994), relaciona este fenómeno com sistemas operados com idades de lamas muito elevadas, onde os flocos são continuamente expostos a baixas concentrações de substrato exógeno (metabolismo endógeno), e nestas circunstâncias os polissacáridos extra celulares servem como fonte de carbono e energia o que leva à destruição das matrizes poliméricas dos flocos das lamas activadas.

***Bulking* filamentoso**

O *bulking* filamentoso é causado por um crescimento excessivo de organismos filamentosos ou organismos que podem crescer sob condições adversas. Estes organismos interferem com a sedimentação e compactação das lamas, produzindo uma estrutura difusa do floco, a redução da velocidade de sedimentação e, simultaneamente, uma menor compactação das lamas no decantador secundário, levando conseqüentemente a uma diminuição da qualidade do efluente final (Jenkins *et. al.*, 2004).

Bulking Viscoso

O *bulking* viscoso, ou *bulking zoogloea*, é caracterizado por um excesso de material exocelular, que poderá estar relacionado, na maior parte dos casos, com o crescimento *zoogloea*, que origina uma lama viscosa. Este problema expressa uma lama pouco densa, sedimenta lentamente e apresenta fraca compactação, uma vez que os biopolímeros (constituídos por proteínas e carboidratos) são hidrofílicos, o que confere uma grande afinidade entre a água e a lama activada (MetCalf e Eddy, 2003; Wanner, 1994).

Escumas (Foaming)

No sistema de lamas activadas, os problemas de escumas estão relacionados com a presença de bactérias do género *Nocardia* e *Microthrix parvicella*. Estes organismos têm células hidrofóbicas e, deste modo, formam bolhas à superfície e, por serem menos densas que a água, vão-se agregando e flutuando à superfície causando escumas (MetCalf e Eddy, 2003).

Segundo Tsang, (2008), a principal bactéria responsável pela formação de escumas é a *Nocardia amarae*, que, além de ser fortemente hidrófoba, produz substâncias tensioactivas a partir da metabolização dos hidratos de carbono. Esta bactéria consegue degradar uma grande variedade de hidratos de carbono, incluindo os de elevado peso molecular e, por isso, é comum em estações de tratamento de efluentes urbanos ricos em óleos e gorduras.

O *Microthrix parvicella* é outra das bactérias filamentosas comuns nestes sistemas, produzindo igualmente escumas. Segundo Xie *et. al.* (2007), a *Microthrix parvicella* foi uma das bactérias filamentosas causadoras de *foaming* mais frequentes no tratamento de lamas activadas em todos os países europeus, Austrália e África do Sul. No Quadro 2.2 mostra-se os organismos filamentosos causadores de *bulking* e *foaming* em lamas activadas.

Quadro 2.2 - Organismos filamentosos que causam *bulking* e *foaming* nas lamas activadas (adaptado de Richard, 2003).

Organismos filamentosos
<i>Spaerotilus natans</i>
<i>Haliscomenobacter hydrossis</i>
<i>Thiothrix</i> I e II
<i>Beggiatoa</i> spp.
<i>Microthrix parvicella</i>
<i>Nocardia</i> spp.
<i>Nostocoida limicola</i> I, II e III
fungos
actinomicetos
Tipo 1701
Tipo 021N
Tipo 0914
Tipo 0041
Tipo 0675
Tipo 1851
Tipo 1851
Tipo 0803
Tipo 0961
Tipo 0581
Tipo 0092
Tipo 0411
Tipo 1863

2.5 – Características presentes nos organismos filamentosos

As bactérias filamentosas são organismos unicelulares que se multiplicam por cissiparidade, mas cujas células-filhas se mantêm vizinhas, resultando na formação de uma cadeia ou filamento.

Na observação microscópica das bactérias filamentosas, é importante analisar os pormenores morfológicos e, através de colorações, observar as diferenças de filamento para filamento. Existem muitas espécies de bactérias filamentosas diferentes, embora nem todas intervenham na sedimentabilidade da lama de igual forma. A maior parte das bactérias ainda não é cultivada em culturas puras para permitir um estudo detalhado da sua fisiologia e

cinética. A identificação de organismos filamentosos ainda se baseia principalmente em características morfológicas e em respostas a testes de coloração.

As características que fornecem informação específica sobre os diferentes tipos de organismos filamentosos segundo (Wanner, 1994; Jenkins *et. al.*, 2004) são:

Ramificação – a ramificação dos organismos filamentosos pode ser verdadeira ou falsa; a ramificação verdadeira mostra continuidade citoplasmática entre os filamentos ramificados, nomeadamente, os fungos e os nocardioformes. A falsa ramificação refere-se aos tricomas ramificados quando a bainha, mas não a célula é ramificada. É comum observar-se no *Sphaerotilus natans*.

Mobilidade – existem alguns microrganismos filamentosos que exibem um movimento activo (ex. *Beggiatoa*, *Flexibacter* e algumas bactérias *Cyanophyceae*). Os filamentos *Thiothrix* e o Tipo 021N apresentam movimentos limitados de contracção ou movimentos oscilantes.

Forma do filamento – determina se o organismo apresenta forma direita, ligeiramente curva e se as células apresentam forma irregular, enrolada ou micelial.

Localização – determina se os filamentos estão livres no líquido entre os flocos, ou se por outro lado, se estendem da superfície do floco ou se crescem dentro deste.

Bactérias sésseis – determinam a presença ou ausência de bactérias sésseis. Se estiverem presentes, o seu crescimento poderá indicar que o organismo filamentoso tem bainha.

Bainha – a presença de bainha pode estar presente ou ausente. Se estiver presente é difícil de identificar, uma vez que é uma estrutura clara, externa à parede celular. A bainha pode ser indicada pela presença de um crescimento sésseil ou pode servir como um substrato para o crescimento de bactérias associadas ao tricoma.

Septo celular – o septo é a parede celular no ponto de contacto entre duas células contíguas. Pode estar ausente ou presente, sendo variável para certos organismos.

Largura do filamento – determina-se utilizando um micrómetro ocular para detectar se a largura média do filamento é grosso ($> 1 \mu\text{m}$) ou fino ($< 1 \mu\text{m}$).

Comprimento do filamento – determina o comprimento dos diferentes organismos em μm .

Forma da célula – determina se a célula é quadrada, rectangular, oval, em forma de barril, discóide, em forma de salsicha ou irregular. É, também, de notar se estão presentes indentações no septo das células, isto é, quando as células têm extremidades arredondadas, a junção entre duas células adjacentes denomina-se por indentação.

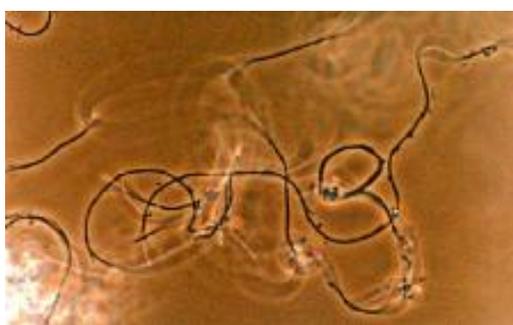
Inclusões de enxofre – pode observar-se a presença ou ausência de grânulos de enxofre através da aplicação do teste S, isto é, pode observar-se em contraste de fase, inclusões de cor amarela e também, inclusões esféricas nos casos *Thiothrix*, *Beggiatoa* e o Tipo 021N. Na presença de grânulos muito pequenos, pode observar-se, na fase de contraste, o aparecimento de cor preta em vez de amarela.

Outras inclusões – normalmente, podem observar-se grânulos de polifosfato e de poli-hidroxialcanoatos (PHA).

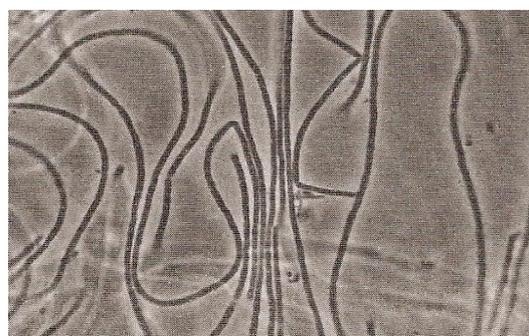
Reacções às colorações – as colorações são técnicas para avaliar cada organismo filamentosos. As colorações mais aplicadas são de Gram e Neisser, baseando-se no uso de corantes. A maior parte dos organismos filamentosos em lamas activadas são Gram negativos. É de notar que ocorrem alterações em certos organismos filamentosos quando sujeitos a colorações, como exemplo, o Tipo 0092 apresenta um tamanho maior depois da coloração de Neisser.

2.5.1 - *Microthrix parvicella*

Trata-se de um filamento estreito e irregular que se desenvolve no interior do floco. O comprimento do filamento (tricoma) varia entre (50 - 200 μm), apresenta largura de 0,8 μm , não apresentando bainha nem ramificações. Apresenta coloração Gram positivo e Neisser negativo.



A)



B)

Figura 2.2 - **A)** *Microthrix parvicella*. 1000 \times (adaptado de Santa Cruz Produções); **B)** *Microthrix parvicella*. 1000 \times (adaptado de Jenkins *et. al.*, 2004).

2.5.2 - *Nocardia* sp.

É um filamento com forma irregular que se desenvolve no interior do floco ou disperso na solução. O comprimento do filamento (tricoma) varia entre (5 - 30 μm) e apresenta uma largura de 1,0 μm , não apresentando bainha. Apresenta coloração Gram positivo e Neisser negativo.

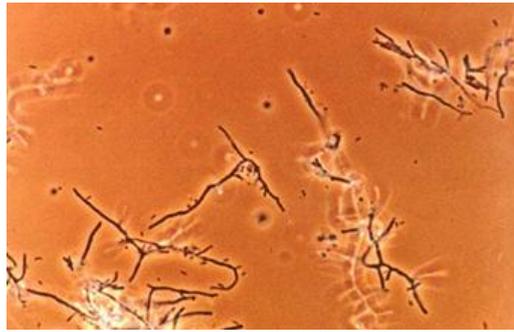
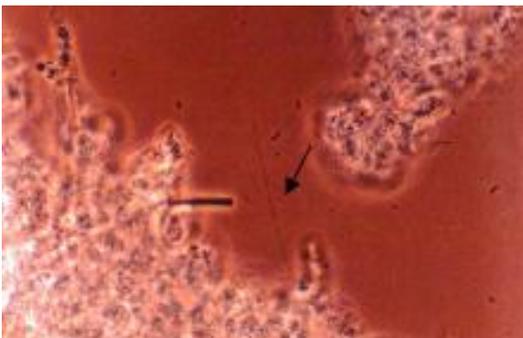


Figura 2.3 - *Nocardia* sp. 1000x (adaptado de Santa Cruz Produções).

2.5.3 - *Haliscomenobacter hydrossis*

É um filamento rígido direito ou filamento curvo que se estende pela superfície do floco, pode ser encontrado dentro do floco ou disperso em suspensão. O comprimento do filamento (tricoma) varia entre (10 - 100 μm) e apresenta um diâmetro de 0,5 μm . As suas células não apresentam septo celular, mas apresentam bainha e as reacções às colorações de Gram e Neisser são negativas.



A)



B)

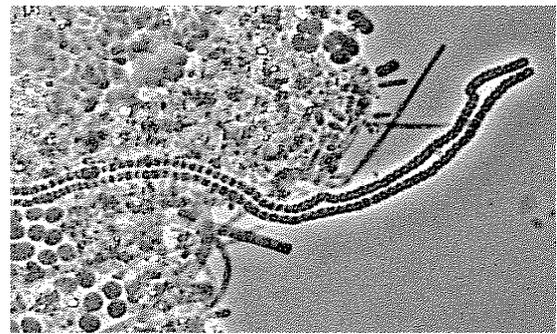
Figura 2.4 - **A)** *Haliscomenobacter hydrossis*. 1000x (adaptado de Santa Cruz Produções); **B)** *Haliscomenobacter hydrossis*. 1000x (adaptado de Jenkins *et. al.*, 2004).

2.5.4 - *Nostocoida limicola* I

É um filamento curvo irregular entrelaçado dentro dos flocos, apresenta um comprimento de (40 – 100 μm) e um diâmetro de (0,8 – 1,0 μm). A forma das células é oval, com dimensões de (0,8 – 1,0 μm \times 0,8 μm). Ocorrem indentações nos septos das células. Neste tipo de filamento, não existe bainha nem ramificações e apresentam coloração Gram e Neisser positiva.



A)

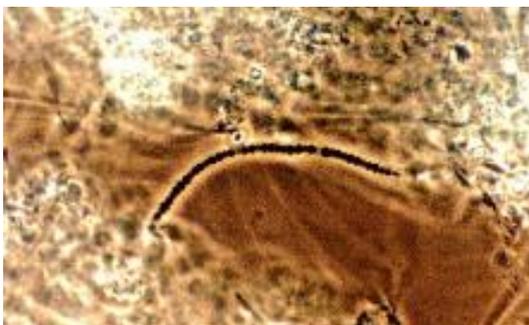


B)

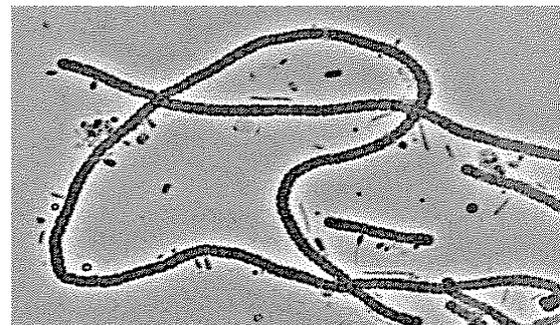
Figura 2.5 - **A)** *Nostocoida limicola* I. 1000x (adaptado de Santa Cruz Produções); **B)** *Nostocoida limicola* I. 1000x (adaptado de Jenkins *et. al.*, 2004).

2.5.5 - *Nostocoida limicola* II

Trata-se de um filamento curvo irregular que se estende à superfície do floco e está presente dentro do floco, apresenta um comprimento de (50 – 200 µm) e um diâmetro de (1,4 µm). A forma das células é oval, com dimensões de (1,4 – 1,0 µm × 1,5 µm). Ocorre indentações nos septos das células. Neste tipo de filamento, não existe bainha nem ramificações, apresenta coloração Gram variável devido à composição do meio, ou seja, a *Nostocoida limicola* II encontra-se frequentemente nos sistemas de tratamento de águas residuais, com elevadas quantidades de resíduos industriais no qual, alguns componentes podem alterar as propriedades das paredes da célula. Em relação à coloração de Neisser, é positiva.



A)



B)

Figura 2.6 - **A)** *Nostocoida limicola* II. 1000x (adaptado de Santa Cruz Produções); **B)** *Nostocoida limicola* II. 1000x (adaptado de Jenkins *et. al.*, 2004).

2.5.6 - *Nostocoida limicola* III

É um filamento curvo irregular que se estende à superfície do floco, apresenta um comprimento de (100 – 300 µm) e um diâmetro de (2,0 µm). A forma das células é oval com dimensões de (2,0 – 1,5 µm). Ocorre indentações nos septos das células. Neste tipo de

filamento, não existe bainha, ramificações, coloração Gram positiva (águas residuais urbanas) ou negativa (águas residuais industriais) e Neisser positiva.

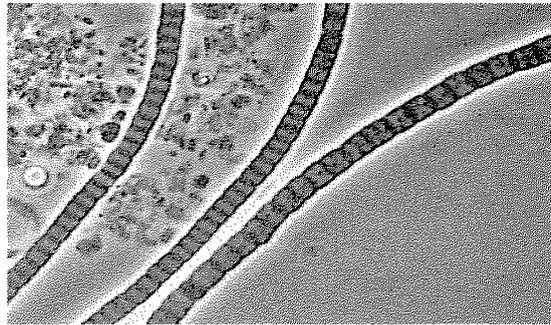


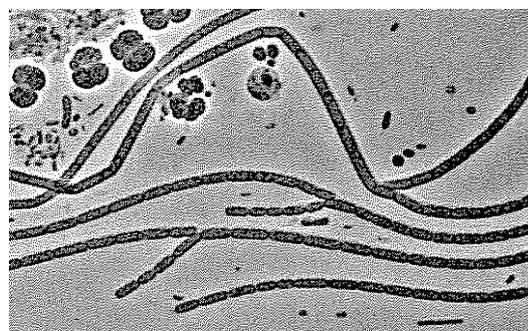
Figura 2.7 - *Nostocoida limicola* III. 1000x (adaptado de Jenkins *et. al.*, 2004).

2.5.7 - *Sphaerotilus natans*

É um filamento direito ou ligeiramente curvo que surge da superfície do floco. O comprimento dos filamentos (tricoma) é variável entre (100 - 500 μm) e são constituídos por células com dimensões (1,6 \times 2,5 μm) em forma de salsicha. As células podem apresentar forma rectangular quando se encontram empacotadas dentro da bainha. Geralmente são observadas falsas ramificações e o crescimento de bactérias sésseis é ausente, mas pode estar presente se o filamento não crescer. As reacções às colorações Gram e Neisser são negativas.



A)



B)

Figura 2.8 - **A)** *Sphaerotilus natans*. 1000x (adaptado de Santa Cruz Produções); **B)** *Sphaerotilus natans*. 1000x (adaptado de Jenkins *et. al.*, 2004).

2.5.8 - *Thiothrix* I

São filamentos direitos ou ligeiramente curvos que se estendem da superfície do floco, apresentam dimensões entre (100 - 500 μm) e um diâmetro de (1,6 - 2,5 μm). A forma das células é rectangular com dimensões (1,6 - 2,5 μm \times 2,0 - 4,0 μm), com septo sem indentações. Poderá ocorrer formação de rosetas e a presença de gonídias. Apresentam bainha, mas é difícil de detectar. A reacção às colorações de Gram e Neisser é negativa. O

filamento pode apresentar coloração Gram positiva quando estão presentes grânulos de enxofre.

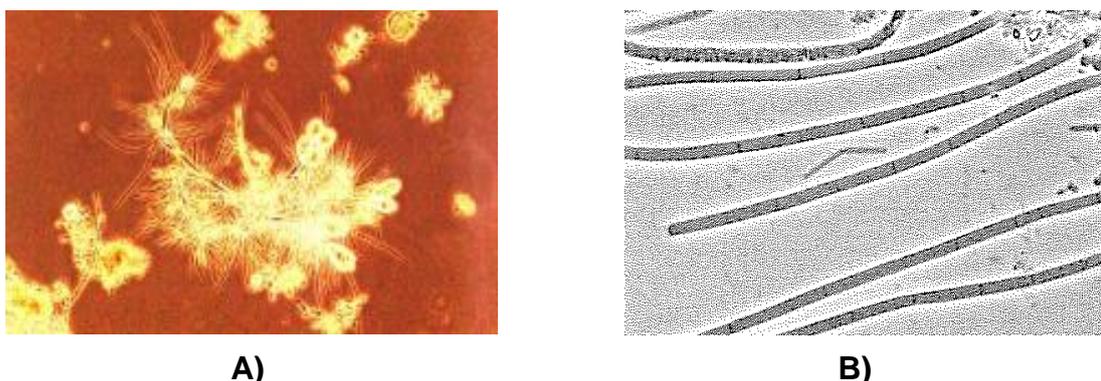


Figura 2.9 - **A)** *Thiothrix* I. 100x (adaptado de Santa Cruz Produções); **B)** *Thiothrix* I. 1000x (adaptado de Jenkins *et. al.*, 2004).

2.5.9 - *Thiothrix* II

Os filamentos são idênticos à *Thiothrix* I, apresentam filamentos diretos ou ligeiramente curvos que se estendem da superfície do floco. Os filamentos apresentam dimensões entre (50 - 200 μm) e um diâmetro de (0,8 - 1,4 μm). A forma das células é rectangular com dimensões (0,8 - 1,4 μm x 1,5 - 3,0 μm), com septo sem indentações. Poderá ocorrer formação de rosetas e a presença de gonídias. Apresentam bainha, mas é difícil de detectar. A reacção às colorações de Gram e Neisser é negativa. O filamento pode apresentar coloração Gram positiva quando estão presentes grânulos de enxofre.



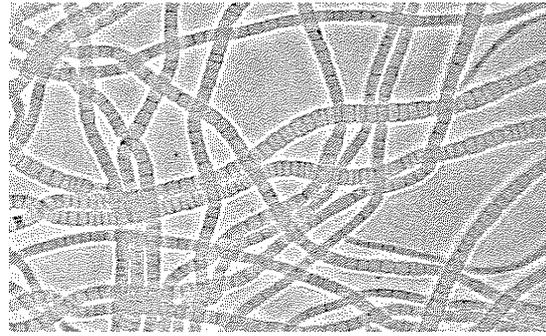
Figura 2.10 - **A)** *Thiothrix* II. 1000x (adaptado de Santa Cruz Produções); **B)** *Thiothrix* II. 1000x (adaptado de Jenkins *et. al.*, 2004).

2.5.10 - Tipo 021N

O filamento é ligeiramente curvo e estende-se da superfície do floco. Apresentam um comprimento variável, de 50 a 500 μm , e um diâmetro de 1,6 a 2,5 μm . As células apresentam septos com indentações. As células apresentam formas variadas, rectangulares, ovais ou em forma de barril. Em relação às colorações é Gram e Neisser negativa.



A)



B)

Figura 2.11 - **A)** Tipo 021N. 1000x (adaptado de Santa Cruz Produções); **B)** Tipo 021N. 1000x (adaptado de Jenkins *et. al.*, 2004).

2.5.11 - Tipo 0914

É um filamento direito ou ligeiramente curvo que se estende da superfície do floco, que está dentro do floco, ou que está disperso em suspensão. Os filamentos apresentam dimensões entre (50 - 200 μm) e um diâmetro de (1,0 – 1,2 μm). A forma das células é quadrada com dimensões (0,8 – 1,2 μm x 1,0 μm), com septo sem indentações. Apresentam bainha, mas é difícil de detectar. A reacção às colorações de Gram e Neisser é negativa. O filamento pode apresentar coloração Gram positiva quando estão presentes grânulos de enxofre.

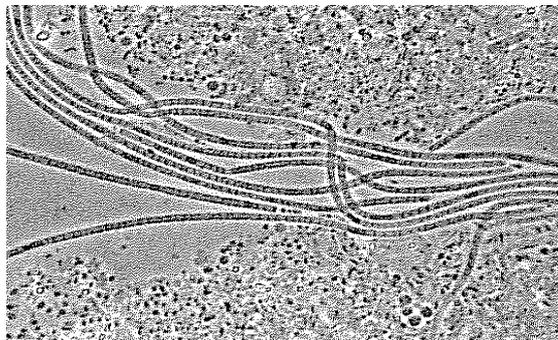


Figura 2.12 - Tipo 0914. 1000x (adaptado de Jenkins *et. al.*, 2004).

2.5.12 - Beggiatoa sp.

Trata-se de um filamento direito ou ligeiramente curvo que se estende da superfície do floco ou que está disperso em suspensão. Os filamentos apresentam dimensões entre (100 - 500 μm) e um diâmetro de (2,0 – 4,0 μm). A forma das células é rectangular com dimensões (2,0 – 4,0 μm x 6,0 – 8,0 μm), com septo sem indentações, não apresentam bainha nem ramificações. As *Beggiatoa sp.* são geralmente móveis. A reacção às colorações de Gram e Neisser é negativa. O filamento pode apresentar coloração Gram positiva quando estão presentes grânulos de enxofre.

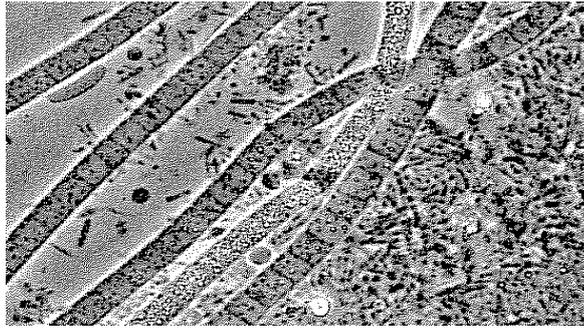
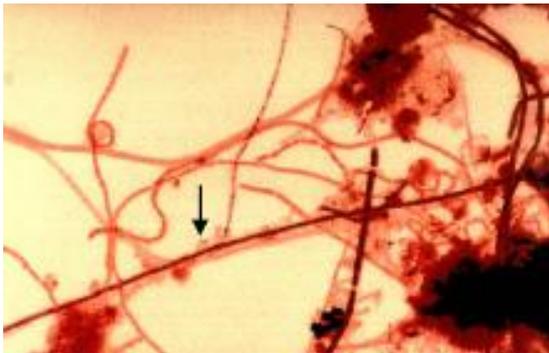


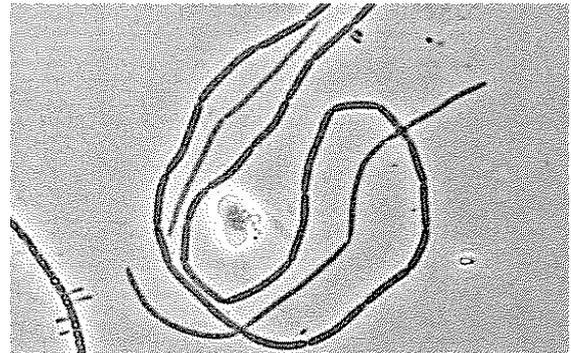
Figura 2.13 - *Beggiatoa*. 1000x (adaptado de Jenkins *et. al.*, 2004).

2.5.13 - Tipo 0411

É um filamento curvo irregular que se estende à superfície do floco, apresenta um comprimento de (50 – 150 μm) e um diâmetro de (1,0 μm), é constituído por células alongadas com dimensões de (0,8 – 1,2 μm x 2,0 – 5,0 μm), ocorrem indentações nos septos das células. Neste tipo de filamento, não existe bainha nem ramificações. Apresentam coloração Gram e Neisser negativa.



A)



B)

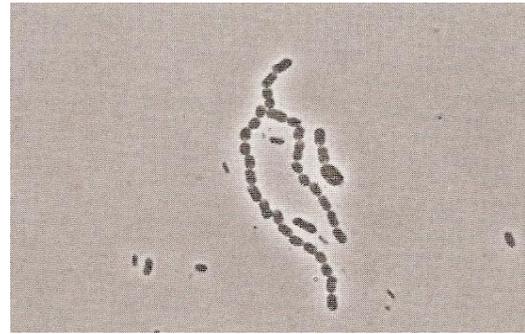
Figura 2.14 - **A)** Tipo 0411. 1000x (adaptado de Santa Cruz Produções); **B)** Tipo 0411. 1000x (adaptado de Jenkins *et. al.*, 2004).

2.5.14 - Tipo 1863

Filamento com forma irregular, apresenta um comprimento entre (10 - 50 μm) e largura entre (0,8 – 1,0 μm). É constituído por células ovais com dimensões entre (0,8 – 1,0 μm x 1,0 – 1,5 μm), não apresentam bainha nem ramificações. A reacção às colorações de Gram é negativo e Neisser negativo com grânulos intracelulares Neisser positivos.



A)

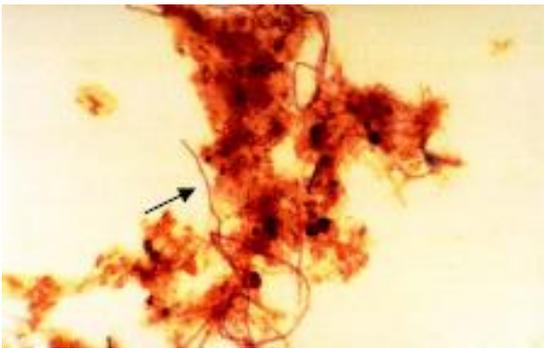


B)

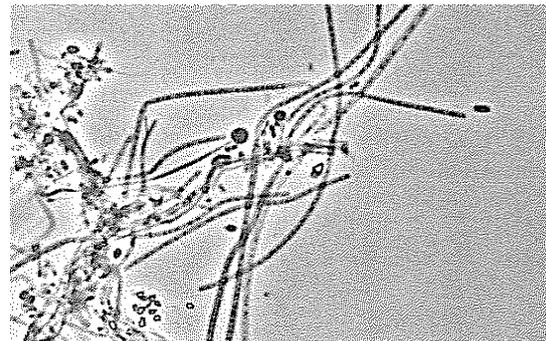
Figura 2.15 - **A)** Tipo 1863. 1000x (adaptado de Santa Cruz Produções); **B)** Tipo 1863. 1000x (adaptado de Jenkins *et. al.*, 2004).

2.5.15 - Tipo 0092

É um filamento direito ou dobrado que se desenvolve no interior do floco. Os filamentos apresentam comprimentos entre (10 - 80 μm) e um diâmetro entre (0,8 - 1,0 μm), não apresentam bainha nem ramificações. A reacção às colorações de Gram é negativo e Neisser positivo.



A)



B)

Figura 2.16 - **A)** Tipo 0092. 1000x (adaptado de Santa Cruz Produções); **B)** Tipo 0092. 1000x (adaptado de Jenkins *et. al.*, 2004).

2.5.16 - Tipo 0803

Trata-se de um filamento direito que se pode estender da superfície do floco ou encontrar-se disperso na solução. Os filamentos apresentam comprimentos entre (50 - 150 μm) e largura de (0,8 μm). As células apresentam formas quadradas com dimensões entre (0,8 \times 1,0 μm). Não apresentam bainha nem ramificações. A reacção às colorações de Gram e Neisser é negativa.

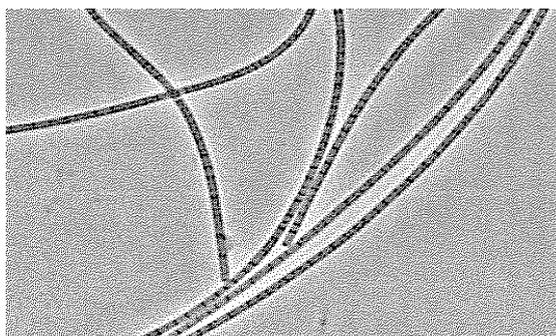


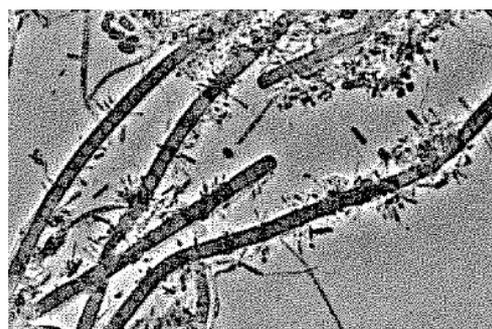
Figura 2.17 - Tipo 0803. 1000x (adaptado de Jenkins *et. al.*, 2004).

2.5.17 - Tipo 0041

É um filamento direito, normalmente no interior do floco. Os filamentos apresentam comprimento entre (100 - 500 μm) e uma largura de (1,8 - 2,0 μm). As células apresentam formas quadradas com dimensões típicas entre (1,8 - 2,0 \times 2,0 - 3,0 μm). Estes filamentos têm presença de bainha mas ausência de ramificações. A reacção às colorações são variáveis, geralmente apresentam Gram positivo e Neisser negativo.



A)

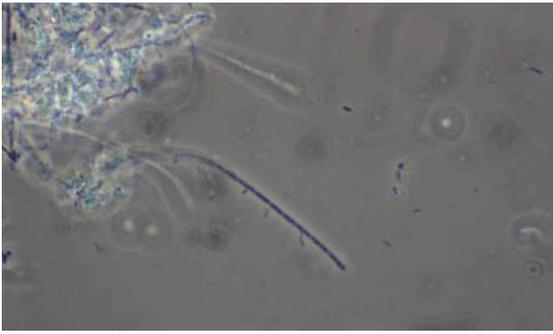


B)

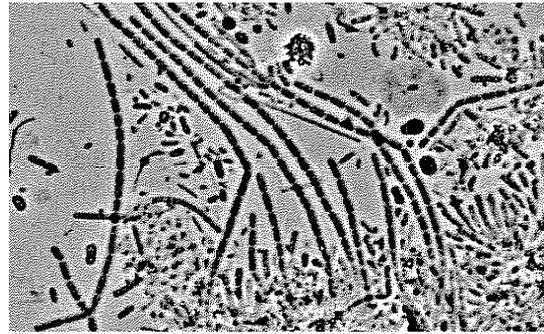
Figura 2.18 - **A)** Tipo 0041. 1000x (adaptado de Santa Cruz Produções); **B)** Tipo 0041. 1000x (adaptado de Jenkins *et. al.*, 2004).

2.5.18 - Tipo 1701

É um filamento direito ou ligeiramente curvo, podendo também crescer no interior do floco ou estender-se para fora dos flocos. O comprimento dos filamentos (tricoma) é geralmente entre (10 - 150 μm). As células apresentam forma de bastonetes com dimensões típicas entre (0,8 - 1,0 \times 1,5 μm) e apresenta septos com indentações. Em relação às colorações de Gram e Neisser é negativo.



A)

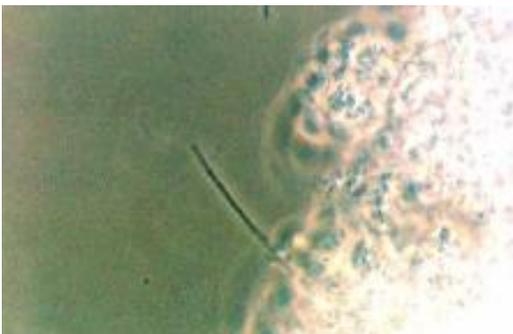


B)

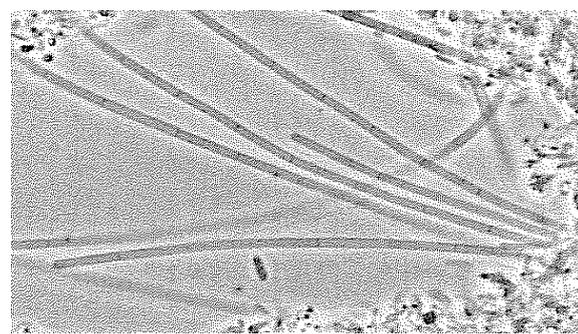
Figura 2.19 - **A)** Tipo 1701. 1000x (adaptado de Santa Cruz Produções); **B)** Tipo 1701. 1000x (adaptado de Jenkins *et. al.*, 2004).

2.5.19 - Tipo 0961

Trata-se de um filamento direito ou ligeiramente curvo que se estende da superfície do floco ou que está disperso em suspensão. Os filamentos apresentam dimensões entre (40 - 150 μm) e um diâmetro de (1,0 – 1,4 μm). A forma das células é rectangular com dimensões (1,0 – 1,4 μm \times 2,0 – 4,0 μm), com septo sem indentações, não apresentam bainha nem ramificações. A reacção às colorações de Gram e Neisser é negativa.



A)



B)

Figura 2.20 - **A)** Tipo 0961. 1000x (adaptado de Santa Cruz Produções); **B)** Tipo 0961. 1000x (adaptado de Jenkins *et. al.*, 2004).

2.5.20 - Tipo 0581

É um filamento curvo ou enrolado dentro do floco. Os filamentos apresentam dimensões entre (100 - 200 μm) e largura de (0,5 – 0,8 μm). Não apresentam bainha nem ramificações. A reacção às colorações de Gram e Neisser é negativa.

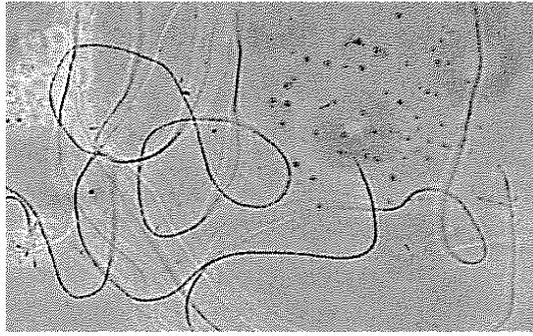


Figura 2.21 - Tipo 0581. 1000x (adaptado de Jenkins *et. al.*, 2004).

2.5.21 - Tipo 0675

Trata-se de um filamento direito, normalmente no interior do floco. Os filamentos apresentam comprimento entre (50 - 150 μm) e uma largura de (1,0 μm). As células apresentam formas quadradas com dimensões típicas entre (1,0 \times 1,0 μm). Estes filamentos têm presença de bainha, mas ausência de ramificações. A reacção às colorações são variáveis, geralmente apresentam Gram positivo e Neisser negativo.

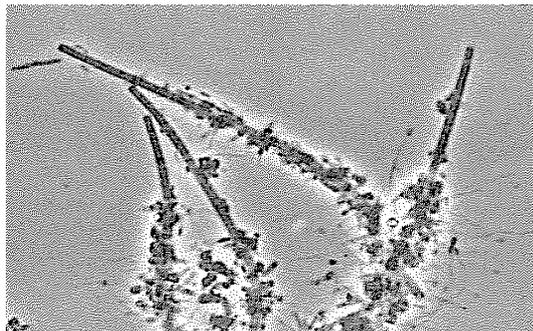


Figura 2.22 - Tipo 0675. 1000x (adaptado de Jenkins *et. al.*, 2004).

2.5.22 - Tipo 1851

É um filamento direito ou ligeiramente curvo, normalmente no interior do floco. Os filamentos apresentam comprimento entre (50 - 200 μm) e uma largura de (0,8 μm). As células apresentam formas rectangulares com dimensões típicas entre (0,8 \times 1,5 - 2,0 μm). Estes filamentos têm presença de bainha, mas ausência de ramificações. A reacção às colorações são variáveis, geralmente apresentam Gram positivo e Neisser negativo.

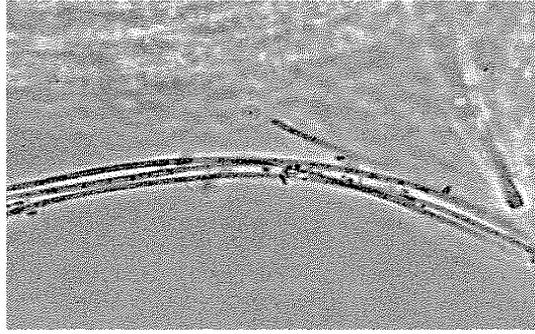


Figura 2.23 - Tipo 1851. 1000x (adaptado de Jenkins *et. al.*, 2004).

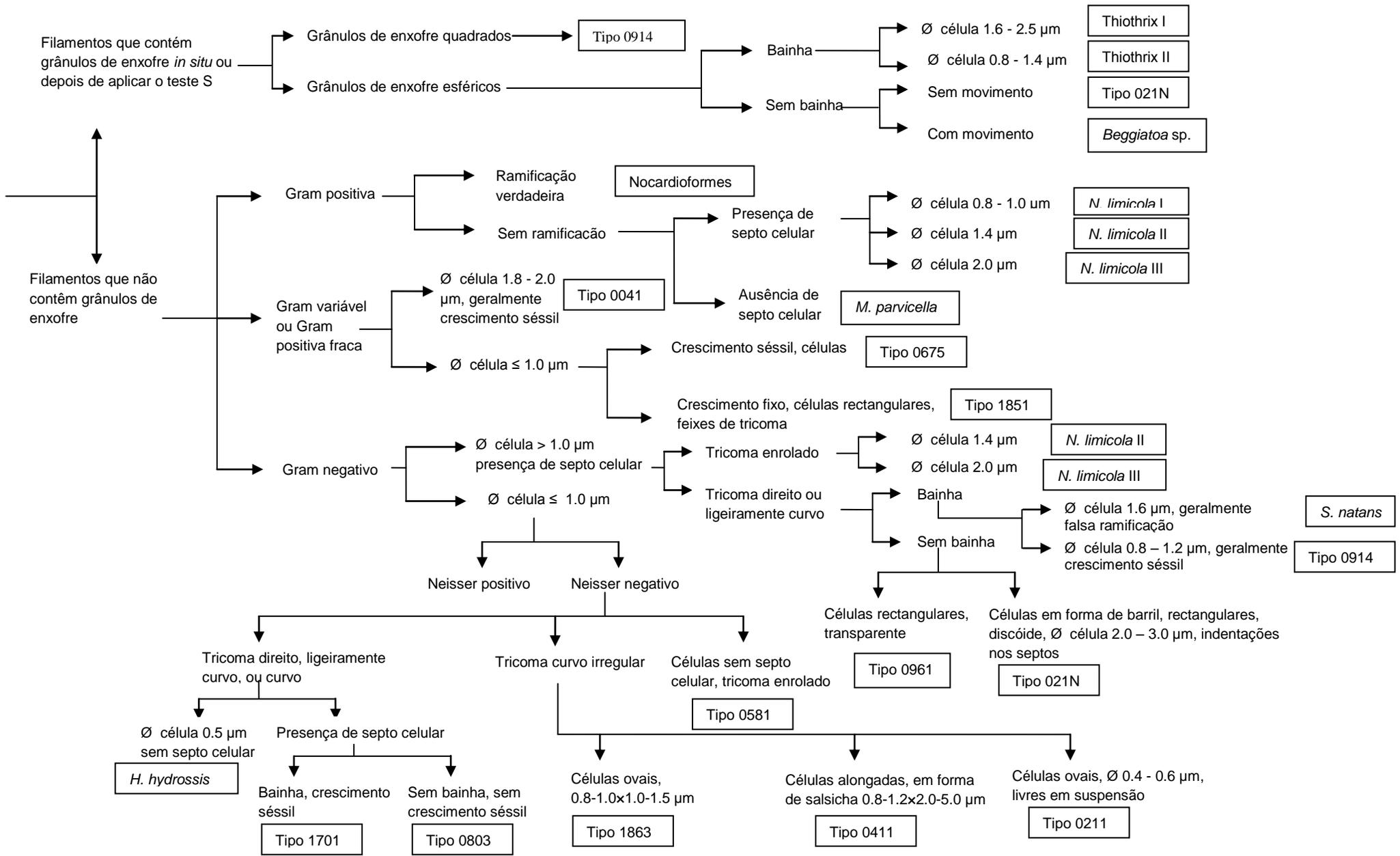


Figura 2.24 – Identificação de organismos filamentosos usando a chave dicotômica (adaptado de Gray, 2004).

Quadro 2.3 - Sumário das características morfológicas e de colorações dos organismos filamentosos comuns em lamas activadas (adaptado de Jenkins *et. al.*, 2004).

Observação iluminação directa 1000x				Observação fase de contraste 1000x											
Tipo de filamento	Coloração Gram	Coloração de Neisser		Grânulos de enxofre		Outras inclusões celulares	Diâmetro filamento (µm)	Comprimento filamento (µm)	Forma filamento	Localização filamento	Observação de septos	Indentações no septo	Bainha	Crescimento (mm)	Forma/tamanho
		Filamento	Grânulos	In situ	Testes										
<i>S. natans</i>	-	-	-	-	-	PHA	1.4-1.6	100->500	Rt	E	+	+	+	-	Salsicha 1.6x2.5
Tipo 1701	-	-	-	-	-	PHA	0.8-1.0	20-80	Rt, Cx	I, E	+	+	+	+, +	Salsicha 1.0x1.5
<i>H. hydroxilis</i>	-	-	-	-	-	-	0.5	10-100	Rt, Cx	E, F	-	-	+	-, +	
Tipo 021N	-	-	-, +	-, +	+	PHA	1.6-2.5	50-1000	Rt, Lc	E	+	+	-	-	Barril, rectangular, diâmetro 1.6-2.5x2.0
<i>Tolothrix I</i>	-, +	-	-, +	+, -	+	PHA	1.6-2.5	100->500	Rt, Lc	E	+	-	+	-	Rectangular 0.8-1.4x1.5-3.0
<i>Tolothrix II</i>	-, +	-	-, +	+, -	+	PHA	0.8-1.4	50-200	Rt, Lc	E	+	-	+	-	Rectangular 0.8-1.2x1.0
Tipo 0914	-, +	-	-, +	-, +	-	PHA	1.0-1.2	50-200	Rt	E, F	+	-	+	-, +	Quadrado 1.0x1.0
<i>Beuveria sp.</i>	-, +	-	-, +	+, -	+	PHA	3.0-4.0	100->500	Rt	F	-, +	-	-	-	Rectangular 2.0-4.0x6.0-8.0
<i>N. limicola I</i>	+	+	-	-	-	PHA	0.8-1.0	40-100	Rt	I, E	+	+	-	-	Ovais 0.8-1.0x0.8
<i>N. limicola II</i>	-, +	+, -	-	-	-	PHA	1.4	50-200	Rt	I, E	+	+	-	-	Discos, ovais 1.4x1.0-1.5
<i>N. limicola III</i>	-, +	+	-	-	-	PHA	2.0	100-300	Rt	I, E	+	+	-	-	Discos, ovais 2.0x1.5

Observação iluminação directa 1000x				Observação fase de contraste 1000x											
Tipo de filamento	Coloração Gram	Coloração de Neisser		Grânulos de enxofre		Outras inclusões celulares	Diâmetro filamento (µm)	Comprimento filamento (µm)	Forma filamento	Localização filamento	Observação de septos	Indentações no septo	Balha	Crescimento aóseo	Forma/tamanho
		Filamento	Grânulos	In. S/DU	Teste S										
Tipo 0411	-	-	-	-	-	-	0.8-1.2	50-150	Cx, lrr	E	+	+	-	-	Células alongadas 0.8-1.2x2.0-5.0
Tipo 0961	-	-	-	-	-	-	1.0-1.4	40-150	Rt	E	+	-	-	-	Rectangular 1.0-1.4x2.0-4.0
Tipo 0092	-	+	-	-	-	+	0.8-1.0	10-80	Rt, Cx	I	-, +	-	-	-	Rectangular 0.8-1.0x1.0
Tipo 0581	-	-	-	-	-	-	0.5-0.8	100-200	Enr	I	-	-	-	-	
Tipo 0041	+, V	-	-, +	-	-	-	1.8-2.0	100-500	Rt, Lc	I, E	+	-	+	++, -	Quadrado 1.8-2.0x2.0-3.0
Tipo 0675	+, V	-	-, +	-	-	-	1.0	50-150	Rt, Lc	I	+	-	+	++, -	Quadrado 1.0x1.0
Tipo 1851	+ fraco	-	-	-	-	-	0.8	50-200	Rt, Lc	E	+, -	-	+	-, +	Rectangular 0.8x1.5-2.0
Tipo 0803	-	-	-	-	-	-	0.8-1.0	50-150	Rt	E, F	+	-	-	-	Quadrado 0.8x1.0
<i>M. parvicella</i>	+	-	+	-	-	PHA	0.8	50-200	Enr	I	-	-	-	-	
<i>Nocardiformes</i>	+	-	+	-	-	PHA	1.0	5-30	lrr	I	+	-	-	-	Variável 1.0x1.0-2.0
Tipo 1863	-	-	-, +	-	-	PHA	0.8-1.0	10-50	Cx, lrr	E, F	+	+	-	-	Células ovais 0.8-1.0x1.0-1.5

Legenda:

+	Positivo	Forma do filamento		Localização filamento	
-	Negativo	Rt	Recto	E	Estende-se da superfície do floco
V	Variável	Cx	Curvo	I	Encontra-se dentro do floco
+, - ou -, +	Variável, o primeiro é mais observado	Lc	Ligeiramente curvo	F	Livres no líquido entre os flocos
		Enr	Enrolado		
		lrr	Irregular		

2.6 – Estratégias de remediação de *bulking* Sludge

Actualmente, nos sistemas de tratamento de águas residuais de forma a prevenir e controlar o aparecimento de fenómenos do *bulking* filamentoso são incluídos na linha de tratamento, reactores com características especiais, designados por selectores (Martins *et. al.*, 2004).

2.6.1 – Selectores

Antes de 1970, o *bulking* filamentoso era considerado uma consequência inevitável no tratamento de lamas activadas, no entanto, o trabalho realizado por Chudoba *et. al.*(1973) e Rensink (1974), citado por Metcalf & Eddy (2003), demonstrou que o fenómeno poderia ser controlado através da alteração da linha de tratamento, nomeadamente com uma alteração na configuração do reactor e o controlo do *bulking* através de um sistema denominado de selectores.

Segundo Martins *et. al.*, (2004), um selector é definido como sendo a parte inicial de um reactor biológico, caracterizado por possuir um número de dispersão baixo e um adequado macro-gradiente de concentração de substrato, essencialmente, glicogénio, lípidos, polihidroxialcanoatos (PHA). Pode, também, ser designado por uma pequena zona inicial separada do reactor biológico que recebe a água residual afluyente e a lama recirculada possuindo uma elevada taxa de assimilação de rbCQO (carência química de oxigénio facilmente assimilável), com uma virtual remoção total da rbCQO.

Uma forma de minimizar problemas nos sistemas de lamas activadas passa pela construção de um selector (tanque de contacto) anóxico ou anaeróbio, a montante do tanque de arejamento. Desta forma, coloca-se uma fracção controlável das lamas em recirculação em contacto com a totalidade de água residual afluyente, aumentando assim, a carga mássica (F/M) no tanque de contacto e permitindo a selecção das bactérias floculantes (não filamentosas) (Eckenfelder & Musterman, 1995). A restante fracção das lamas em recirculação irá directamente para o tanque de arejamento. A incorporação de um selector num sistema de lamas activadas convencional parece ser vantajosa no que diz respeito à eficiente sedimentação da lama, reduzindo os problemas inerentes aos fenómenos de *bulking* e reduzindo a toxicidade das lamas (Alkan *et. al.*, 2008).

Segundo Alkan *et. al.*, (2008) foram realizados ensaios para determinar o efeito tóxico dos metais pesados (Cr(VI) e Zn(II)) em efluentes industriais no sistema de lamas activadas. Nestes estudos verificou-se que na presença de um sistema de lamas activadas com selector aeróbio em comparação com o sistema de lamas activadas convencional, o efeito de toxicidade para a biomassa era menor. Para além disso, verificou-se ainda, que a

presença de um selector cria uma capacidade de biossorção dos metais superior, melhorando as características de sedimentabilidade da lama.

Princípio de funcionamento dos selectores

Um selector é um reactor relativamente pequeno (20 a 60 minutos de tempo de contacto) ou uma série de tanques em que a entrada de água residual é misturada com a recirculação de lamas nas condições: aeróbia, anóxica e anaeróbia (Metcalf & Eddy, 2003; Su *et. al.*, 1995).

O selector ideal deve ser composto pelo menos por três compartimentos, o que estabelece um gradiente de substrato (aumenta a selecção cinética), reduz a mistura longitudinal e se adapta às variações do fluxo das águas residuais (Jenkins *et. al.*, 2004).

Em sistemas com selector, os microrganismos são expostos a períodos de abundância (designados de festa) e de carência (fome ou regeneração) de substrato externo. No selector, os microrganismos são sujeitos a ambientes de elevadas taxas de crescimento e são capazes de acumular substratos no interior das suas células como produtos de armazenamento interno. É necessário um período suficientemente longo, sem substratos externos disponíveis (ambiente de fome ou de baixa taxa de crescimento) para que a capacidade de armazenamento das células seja restabelecida (Martins *et. al.*, 2004). Na figura 2.25, mostra-se um sistema selector num processo de lamas activadas.

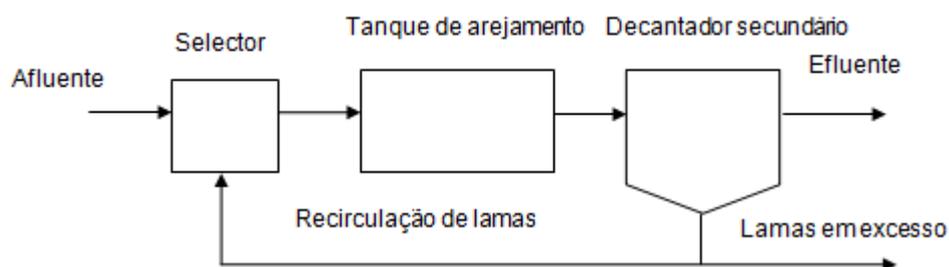


Figura 2.25 - Representação esquemática de um selector em lamas activadas adaptado (Eckenfelder & Musterman, 1995).

É importante compreender que os selectores não seleccionam apenas alguns tipos de organismos filamentosos, mas também seleccionam certos tipos de organismos (essencialmente não filamentosos) que conseguem assimilar substrato e armazená-lo. Para sobreviver a um selector (e conseqüentemente ser seleccionado), um organismo tem que possuir uma elevada taxa de assimilação de substrato e uma grande capacidade de armazenamento de substrato. Estas características não são evidentes em microrganismos formadores de floco que crescem em sistemas contínuos de mistura completa, pelo que, deve ser assumido que os selectores alteram o metabolismo (e possivelmente o tipo) de microrganismos formadores de flocos (Jenkins *et. al.*, 2004).

O crescimento dos organismos filamentosos é difícil quando o tanque de arejamento inclui uma zona inicial com elevado F/M (selector) e especialmente, quando o selector e o tanque de arejamento são compartimentados e o selector é anóxico ou anaeróbio (Jenkins *et. al.*, 2004). No Quadro 2.4, mostra-se a eficácia dos selectores no controlo de organismos filamentosos. Segundo alguns autores, os selectores podem não ser muito eficazes no tratamento de alguns filamentosos, como a *Michrotrix parvicella*.

Quadro 2.4 - Eficácia dos selectores no controlo de organismos filamentosos adaptado de (Cha, D. K. *et. al.*, 1992)

Eficaz	Nem sempre eficaz
<i>S. natans</i>	Tipo 0041
Tipo 1701	Tipo 0675
Tipo 021N	Tipo 0092
<i>Thiothrix sp.*</i>	<i>M. parvicella</i>
<i>N. limicola</i>	
<i>H. hydrossis</i>	
Tipo 1851	
Nocardioformes**	
*não quando causada por deficiência de nutrientes	
**selectores aeróbios nem sempre são eficazes; selectores anóxicos eficazes	

O design dos selectores é baseado na selecção cinética e na selecção metabólica. A selecção cinética consiste em criar condições sob as quais as taxas de utilização de substrato e crescimento são consideravelmente mais elevadas para os microrganismos formadores de floco do que para os organismos filamentosos. A selecção metabólica consiste em bloquear as vias metabólicas para a utilização de substrato por parte dos indesejados microrganismos filamentosos. Este sistema é cada vez mais comum em lamas activadas porque apresenta vantagens em relação ao pequeno volume do reactor, sendo relativamente mínimo o investimento neste órgão quando comparado com os consequentes benefícios na operação da ETAR (Metcalf & Eddy, 2003). No Quadro 2.5, mostra-se as causas do *bulking* filamentosos e respectivos métodos de tratamento.

Quadro 2.5 - Sumário das causas do *bulking* filamentosos e sugestões de métodos de tratamento adaptado de (Jenkins *et. al.*, 2004)

Causas do bulking filamentosos	Filamentosos mais comuns	Método de tratamento sugerido
Baixo F/M	<i>H. hydrossys</i> , <i>Nocardia sp.</i> , <i>Thiotrix sp.</i> , Tipos 0041,0675,0092,0803,0914,1851	Instalações com gradiente de substrato (SBR, sistema Plug-flow, selectores)
Baixo OD	Tipo 1701, <i>S. natans</i> , <i>H. hydrossys</i>	Aumentar o nível de OD na instalação
Deficiência em nutrientes	<i>Thiotrix sp.</i> , Tipo 021N, <i>Nostocoida limicola II</i>	Adicionar os nutrientes em falta
Ácidos gordos na AR, baixo F/M, baixa temperatura	<i>Michrotrix parvicella</i>	Uso de selectores anóxicos ou anaeróbios

Características típicas dos selectores

São vários os parâmetros de interesse para o dimensionamento dos selectores. No Quadro 2.6, mostram-se as características típicas dos selectores aeróbios, anóxicos e anaeróbios segundo Martins *et. al.*, 2004.

Quadro 2.6 - Características típicas dos selectores aeróbios, anóxicos e anaeróbios em sistemas de tratamento de águas residuais domésticas segundo (Martins *et. al.*, 2004).

Parâmetro	Valor
Selector aeróbio	
Número compartimentos	≥ 3
Tempo de contacto	10-15 minutos, mas depende da carga, temperatura e composição da água residual
Sludge loading rate	12 (1º compartimento), 6 (2º compartimento), 3 (3º compartimento) kg CQO/ kg MLVSSdia
Floc loading	50-150 g CQO/kg SST
Concentração OD	≥ 2 mg O ₂ /L
Selector anóxico	
Número compartimentos	≥ 3
Sludge loading rate	6 (1º compartimento), 3 (2º compartimento), 1.5 (3º compartimento) kg CQO/ kg MLVSSdia
Tempo de contacto	45-60 minutos
rbCQO/NO ₃ -N consumido	Por vezes superior a 79 mg rbCQO/ NO ₃ -N mg devido ao armazenamento
Selector anaeróbio	
Número compartimentos	≥ 3 (razão comprimento largura é de 10:1)
Tempo de contacto	1-2 h
(CQO _{VFA + fermentável} - PO ₄ -P) inf	9-20 g CQO g P ⁻¹

Selector aeróbio

Os selectores aeróbios são pequenas zonas de mistura (aeróbio ou anóxico) ou zona de contacto (sem arejamento) que foram implementadas para o controlo de *bulking sludge*, atribuída ao crescimento excessivo do Tipo 021N, *Thiothrix spp.*, *S. natans*, mas nem sempre com sucesso, no caso da *Microthrix parvicella*. (Martins *et. al.*, 2004).

Segundo Su *et. al.* (1995), um selector aeróbio é arejado, contendo oxigénio dissolvido, e é constituído por uma pequena zona inicial de alta concentração de substrato para os microrganismos presentes. Esta zona inicial situa-se a montante do tanque de arejamento. A principal diferença nos selectores em lamas activadas é a presença de grandes colónias amorfas de *zoogloeal*. Esta forma de crescimento está relacionada com a presença de polímeros extracelulares que produzem a bactéria *Zoogloea ramigera*.

Nestes selectores, o oxigénio está presente e é fornecido em quantidades suficientes para dar resposta às carências metabólicas. Os principais mecanismos de remoção de substrato solúvel são o armazenamento e respiração aeróbia (Jenkins *et. al.*, 2004).

Em selectores aeróbios, as zonas de contacto iniciais devem ser dimensionadas de modo a que o primeiro compartimento tenha uma relação F/M de 10 a 12 kgCQO/kgMLSS.d e no global do selector de 3 a 4 kgCQO/kgMLSS.d. Deverá haver um compromisso entre estas relações de carga e um selector de três compartimentos, em que os dois primeiros compartimentos tenham igual tamanho e o terceiro o dobro do tamanho dos dois primeiros. Devem ser evitadas zonas de contacto iniciais com valores de carga muito superiores a estes valores (especialmente em águas residuais que contenham quantidades significativas de matéria orgânica facilmente assimilável), pois pode produzir-se uma lama activada com características gelatinosa (Jenkins *et. al.*, 2004).

As taxas de assimilação de oxigénio em selectores aeróbios são de cerca de 50 a 60 mgO₂/gMLVSS.h e a concentração de OD deve situar-se entre 1 a 2 mgO₂/L (Jenkins *et. al.*, 2004).

Segundo Al-Mutairi (2009), a aplicação de selectores aeróbios em efluentes de matadouros deve ser assegurada no selector com uma concentração mínima de OD de 2 mg O₂/L e, aquando da presença de AGVs, este valor deve ser aumentado para cerca de 4 mg O₂/L.

Selector anaeróbio

Com a introdução dos processos de remoção biológica de nutrientes, as características de sedimentação das lamas melhoraram e o crescimento de bactérias filamentosas foi mínimo. As condições metabólicas anaeróbias ou anóxicas favorecem o crescimento das bactérias

formadoras de flocos. As bactérias filamentosas não conseguem utilizar facilmente o nitrato ou nitrito como receptor de electrões, sendo este facto vantajoso para as bactérias desnitrificantes formadoras de flocos. As mesmas bactérias não armazenam, também, polifosfato e portanto, não podem consumir acetato na zona de contacto anaeróbia em processos de remoção de fósforo, sendo favorável apenas às bactérias que armazenam fósforo (MetCalf e Eddy, 2003).

Num sistema anaeróbio, o substrato solúvel, principalmente AGVs e outros substratos simples são recuperados e principalmente, armazenados (Martins *et. al.*, 2004). Para que um selector seja completamente anaeróbio, o OD e os nitratos deverão estar ausentes, no entanto, a energia para assimilação e armazenamento do substrato dissolvido pode ser obtida através da hidrólise de polifosfato inorgânico altamente energético que se encontra armazenado no interior das células microbianas e que resulta na libertação de ortofosfato ou pode, por outro lado, ser obtida energia através da fermentação do glicogénio internamente armazenado (Jenkins *et. al.*, 2004).

As lamas ricas em bactérias que armazenam polifosfato são, por vezes, melhores na medida em que sedimentam mais facilmente devido à formação de aglomerados densos. Um selector anaeróbio nem sempre pode ser aplicado numa ETAR, por exemplo, não é recomendado para afluentes ricos em compostos de enxofre, pois podem ser utilizados na fase aeróbia por bactérias filamentosas oxidantes de enxofre (Martins *et. al.*, 2004).

Tracy *et. al.*, (1986) mostraram que em condições iniciais anaeróbias houve uma melhoria significativa nas propriedades de sedimentabilidade das lamas para além do que é assegurado no tanque de arejamento compartimentado (selector aeróbio).

Selector anóxico

Num selector anóxico não existe OD e encontra-se presente nitrato que é fornecido em quantidades suficientes para garantir as necessidades metabólicas. Os principais mecanismos de remoção de substrato dissolvido são o armazenamento e a desnitrificação (Jenkins *et. al.*, 2004).

Os valores de F/M para os selectores anóxicos podem ser reduzidos porque o selector utiliza a selecção cinética com a selecção metabólica (capacidade para desnitrificar) para minimizar a presença de organismos filamentosos. Para otimizar a desnitrificação e consequentemente a selecção, um selector deve apresentar no primeiro compartimento o valor F/M de 6 kg CQO/kgMLSS.d e a F/M global do selector deve ser de 1,5 kg CQO/kgMLSSd. Deve ser encontrada uma relação de compromisso que assegure estas cargas e um selector de três compartimentos, em que os dois primeiros compartimentos

tenham igual tamanho e o terceiro tenha o dobro do tamanho dos dois primeiros (Jenkins *et. al.*, 2004).

No caso de estar disponível um único tanque para ser utilizado como selector anóxico, o F/M deve ser ≤ 1 kg CBO₅/kg MLSS.d para casos em que a temperatura da água residual $\leq 18^{\circ}\text{C}$ e um valor de F/M $\leq 1,5$ kg CBO₅/kg MLSS.d em casos em que a temperatura da água residual $>18^{\circ}\text{C}$. Para selectores anóxicos de apenas um compartimento, a idade de lamas anóxicas devem situar-se na gama de 1 a 2 dias (Jenkins *et. al.*, 2004 citando Marten & Daigger, 1997).

Como um selector anóxico remove CQO solúvel através de processos de desnitrificação, a sua concentração de OD deverá ser baixa. O conteúdo do selector deve ser agitado através de agitadores e serem materializadas taxas de arejamento muito reduzidas. O sistema de lamas activadas deve nitrificar e devem ser introduzidas no selector quantidades suficientes de nitrato através da linha de recirculação de lama ou através de recirculação interna do licor misto. Se não for possível introduzir nitrato suficiente no selector para remover a quantidade necessária de CQO solúvel, o efeito de selector pode ser alcançado fazendo com que apenas parte do selector seja anóxico. Normalmente, a parte inicial do selector é anóxica e utiliza o nitrato fornecido, a restante parte do selector será anaeróbia devido à depleção do nitrato fornecido; em alternativa, caso a primeira parte do selector seja anóxica, a segunda pode ser aeróbia. Outra opção será se a primeira parte do selector for anaeróbia (contém apenas lama recirculada com níveis baixos de nitrato e água residual afluyente), a segunda parte pode ser anóxica com a recirculação do licor misto a ser introduzida no compartimento anóxico (Jenkins *et. al.*, 2004).

O dimensionamento global de um selector anóxico deve garantir um tempo suficiente para que a desnitrificação decorra numa extensão tal que reduza a CQO solúvel do efluente do selector para valores de cerca de 60 mg O₂/L. A taxa de desnitrificação típica para a componente facilmente assimilável de uma água residual doméstica situa-se entre 5 a 10 mg NO₃-N/g MLSS.h, a 20°C.

O objectivo principal de um selector anóxico não é a remoção completa de nitrato, mas a remoção de CQO solúvel até que esta fique próxima de 60 mg O₂/L (Jenkins *et. al.*, 2004).

Os problemas inerentes à presença de fenómenos de *bulking* podem também ser controlados através da adição de produtos químicos, como o cloro ou peróxido de hidrogénio, no tanque de arejamento ou na linha de recirculação de lamas, como se pode observar na figura 2.26 (Tsang, 2008).

2.6.2 – Cloro

O cloro é um agente muito poderoso na inactivação de microrganismos filamentosos, não é selectivo, afectando a formação dos organismos *floc-forming*.

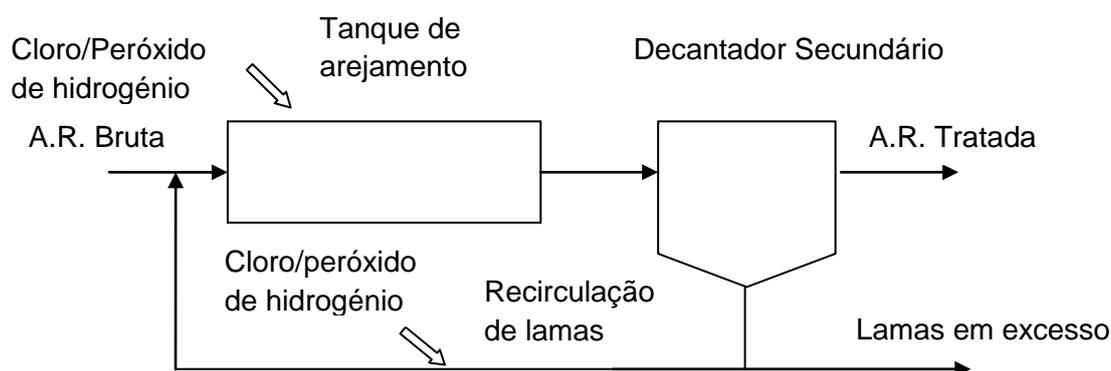


Figura 2.26 - Adição de cloro/peróxido de hidrogénio no controlo do bulking (adaptado Jenkins *et. al.*, 2004).

Basicamente, existem duas estratégias que podem ser seguidas no controlo do *bulking sludge*, como os métodos não específicos e os métodos específicos. Nos métodos não específicos são incluídas técnicas como a cloração, ozonização e aplicação de peróxido de hidrogénio (Martins *et. al.*, 2004). O princípio de aplicação desses métodos é bastante simples, uma vez que as bactérias filamentosas que causam *bulking* são arrastadas para fora do floco, ficando mais susceptíveis a oxidantes em relação às bactérias formadoras de flocos (Eckenfelder & Musterman, 1995; Wanner, 1994). Os organismos filamentosos variam na sensibilidade ao cloro, por exemplo, *Thiothrix sp.* e o Tipo 021N são bastante sensíveis ao cloro, enquanto que *Microthrix parvicella* e *Nostocoida sp.* são mais resistentes ao cloro.

Segundo Eckenfelder & Musterman (1995), com uma dosagem controlada de cloro ($10-12 \text{ KgCl}_2/10^3 \text{ kgMLSS/d}$) os filamentosos que apresentam uma elevada área superficial e exposição ao licor misto, serão destruídos.

Segundo Wanner (1994), a cloração é amplamente utilizada nos EUA, uma vez que o cloro é um produto de fácil aquisição, contudo, em vários países da Europa a sua aplicação é limitada devido a preocupações ambientais, como a formação de potenciais subprodutos indesejáveis, como por exemplo os compostos orgânicos halogenados, que possuem

propriedades cancerígenas. Outro aspecto negativo é o crescimento lento de bactérias nitrificantes que, uma vez afectadas por oxidantes, podem conduzir à deterioração da qualidade de efluentes.

Os métodos específicos caracterizam-se por ser preventivos que têm como objectivo favorecer o crescimento das bactérias formadoras de flocos através de condições ambientais propícias ao tratamento de águas residuais. O desafio passa por encontrar as condições ambientais perfeitas no tratamento de lamas activadas (Martins *et. al.*, 2004).

2.6.3 – Peróxido de hidrogénio

O peróxido de hidrogénio (H_2O_2) tem sido usado para o controlo do *bulking* de forma semelhante ao cloro. Keller e Cole, citados por Jenkins *et. al.* (2004), concluem que o mínimo de dose de (H_2O_2) para o controlo do *bulking* é, aproximadamente, 0,1 kg H_2O_2 /kg MLSS/d.

Caropreso *et. al.* (1974), citado por Jenkins *et. al.* (2004), afirmam que o (H_2O_2), para além de matar os organismos filamentosos atacando as suas bainhas, também produz oxigénio que pode melhorar o oxigénio dissolvido (OD) presente nas lamas activadas. Inversamente, se as bactérias das lamas activadas desenvolverem a capacidade de degradar rapidamente o (H_2O_2), antes deste se tornar disponível para inibir os organismos filamentosos, a sua eficácia no controlo do *bulking* pode ser comprometida.

2.6.4 – Ozono

O ozono é um agente oxidante mais poderoso que cloro e que o peróxido de hidrogénio (Wanner, 1994). Van Leeuwen e Pretorius (1988), citado por Jenkins *et. al.* (2004), desenvolveram experiências à escala piloto na adição de ozono (O_3) na fase aeróbia para o controlo do SVI de uma instalação de lamas activadas na remoção biológica de nutrientes com três estágios (anaeróbio, anóxico e aeróbio). As experiências de sedimentabilidade das lamas não foram afectadas com doses de cerca de $2kgO_3/10^3kgMLSS/d$ (200 mL/g), no entanto, quando as doses de ozono aumentaram, para valores de cerca de 6 e 9 $kgO_3/10^3kgMLSS/d$ o SVI baixou para valores aproximadamente de 125 mL/g. Foi ainda verificado que controlando o SVI, através de dosagens de ozono de cerca de $6kgO_3/10^3kgMLSS/d$ haveria uma diminuição da cor, da turvação e da concentração de sólidos suspensos totais no efluente.

2.6.5 – Filamenticidas

Recentemente, têm sido aplicados no mercado produtos designados de filamenticidas. Experiências realizadas por Jenkins *et. al.* (2004) concluíram que estes materiais

aparentemente matam os organismos filamentosos, mas as propriedades tóxicas persistem no processo de lamas activadas produzindo toxicidade no efluente final.

2.7 – Métodos para identificar bactérias filamentosas

As primeiras abordagens credíveis para a classificação sistemática de bactérias surgiram apenas no final do século XIX e os primeiros estudos basearam-se na separação de grupos de bactérias principalmente com base na sua morfologia, tamanho e mobilidade. Actualmente, os métodos convencionais para identificação de bactérias e outros microrganismos baseiam-se no isolamento de culturas mistas e recorrendo a testes de coloração (Martins *et. al.*, 2004; Wanner, 1994). A correcta identificação de microrganismos filamentosos é crucial, de modo a permitir encontrar métodos adequados para o controlo do crescimento destes.

As colorações são uma etapa fundamental para a identificação da maior parte das bactérias. As colorações de Gram e de Neisser evidenciam características importantes dos organismos filamentosos que crescem nas lamas activadas, contribuindo para uma correcta identificação. Estes métodos convencionais complementam as técnicas modernas de análises químicas e técnicas moleculares.

2.7.1 – Observação microscópica

A observação microscópica em lamas activadas é valorizada, uma vez que transmite informações das características dos flocos, da abundância, dos tipos de filamentos, das condições e do crescimento das formas dos organismos, na identificação de partículas não biológicas que nos fornecem uma vasta informação da natureza e das causas que provocam problemas na separação de sólidos em suspensão.

Preparação de meios de cultura

Os meios de cultura (sólidos, líquidos ou semi-sólidos), segundo Abelho (2010), contêm todos os nutrientes necessários para o crescimento de microrganismos e são utilizados para cultivar e manter os microrganismos viáveis no laboratório, sob a forma de culturas puras. Os meios de cultura dividem-se em meios sólidos, aqueles que contêm agar e em meios líquidos, sem aquele produto. Ambos os meios são preparados com água destilada, aquecidos até que se dissolvam completamente e posteriormente esterilizados por autoclavagem a 121°C que corresponde 1 atmosfera.

Os meios podem classificar-se em:

Selectivos – meios sólidos, para selecção de determinados grupos de bactérias, os quais contêm substâncias que inibem o crescimento de outras bactérias distintas daquelas que nos interessam.

Diferenciais – meios sólidos, para identificação de microrganismos com a composição química adequada para evidenciar uma característica bioquímica.

Indicadores – meios líquidos, com a mesma função dos diferenciais, servem para evidenciar uma característica bioquímica, mas não para separar as colónias positivas e as negativas. O pH do meio é ajustado antes de autoclavar.

Preparação da cultura pura

A cultura de bactérias é iniciada num meio estéril por transferência de inóculo para o meio estéril através de uma ansa. Essa ansa é esterilizada à chama antes e depois desta operação. A cultura de bactérias em meio sólido faz-se por sementeira por “streak plate” (esgotamento) ou por “pour plate” (incorporação) (Abelho, 2010).

A cultura por “streak plate” utiliza placas de Petri com meio sólido e faz-se a sementeira com uma ansa esterilizada arrastando a ansa levemente sobre o meio. O objectivo é a obtenção de colónias isoladas para se poderem posteriormente identificar. Após a incubação e havendo crescimento deve-se observar a forma da colónia e a sua cor (Abelho, 2010).

Na técnica de “pour plate”, a inoculação do agar é feita antes da sua solidificação (no entanto após retirada do meio do autoclave é necessário deixá-lo arrefecer até 45°C). Nesta técnica o meio de cultura arrefecido mas ainda líquido é misturado com inóculo de bactérias, posteriormente vertido em caixas de Petri e incubado. Assim as colónias podem desenvolver-se por todo o meio (Abelho, 2010).

2.7.2 – Coloração de Gram

A coloração de Gram já existe há cerca de um século, podendo ser classificada em dois grupos: Gram positivas e Gram negativas, com base na composição da parede celular bacteriana (Beveridge, 1990), (Saida *et al.*, 2000). A parede celular de bactérias Gram positivas é formada por uma camada espessa de peptidoglicano, enquanto que a parede celular de bactérias Gram negativas é formada por uma camada fina de peptidoglicano, rodeada por uma camada externa de lipopolissacarídeo e proteína. Algumas células mostram reacções variáveis às colorações de Gram, devido às variações ambientais, ao pH, à temperatura ou aos nutrientes impróprios (Saida *et al.*, 2000). Se se apresentar azul-violeta o organismo é Gram positivo e se por outro lado for vermelho é classificado de Gram negativo.

2.7.3 – Coloração de Neisser

A coloração de Neisser fornece informação sobre a coloração do tricoma e dos grânulos intracelulares. Esta coloração pode ser classificada em dois grupos: Neisser negativo e Neisser positivo. O corante principal neste tipo de tratamento é o azul-de-metilo (catiônico) e liga-se aos aniônicos das cadeias poliméricas de polifosfato. Na presença deste corante, uma coloração azul-violeta significa que o organismo é Neisser positivo e uma coloração amarelo-castanho é classificado de Neisser negativo (Eikelboom, 2000).

2.7.4 – Análise de Índice de perfil - API

Em 1970, os API revolucionaram completamente o campo da bacteriologia. Baseada no conceito da identificação numérica, os API tornaram a identificação microbiana fácil, rápida e fiável. Os sistemas API 20 E e API Rapid NFT são produtos comerciais, fabricados pelo API Analytab Products, Division of Sherwood Medical, New York, USA (Juang & Morgan, 2001). O API 20 E (BioMérieux) é um método de identificação das *Enterobacteriaceae* e outras bactérias Gram negativas, que utilizam *strips* miniaturizados com 20 compartimentos que produzem reacções bioquímicas (Juang & Morgan, 2001).

Os vinte compartimentos são inoculados com uma suspensão bacteriana de uma cultura idealmente pura. Após incubação a $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ durante 18-24 horas, as reacções traduzem-se em mudanças de cor que são espontâneas ou manifestadas pela adição de reagentes. As reacções são lidas de acordo com uma tabela ou quadro de leitura. Actualmente a identificação é feita usando um programa informático de identificação (ex. *apiweb*, no caso da bioMérieux) ou catálogo analítico, onde se obtém a identificação do perfil numérico com sete algarismos, que é denominada de análise de índice de perfil (API). O programa interpreta um grande número de perfis que permite a identificação de cerca de 600 espécies de bactérias e leveduras.

O kit de teste API consiste em testes de assimilação de elementos enzimáticos e compostos de carbono, cujo número varia dependendo do tipo de kit API de ensaio utilizado (Truu, 1999). A presença de enzimas específicas é um recurso importante para caracterizar as bactérias e discriminar os organismos relacionados (Busse *et. al.*, 1996).

2.7.5 – Espectrometria de Massa de MALDI-TOF

A espectrometria de massa é uma tecnologia que se aplica na identificação de proteínas, modificação, quantificação e localização de imagem.

Os espectrómetros de massa (MS) são constituídos por três partes principais: uma fonte iónica, um analisador de massa e um detector de iões (Guerrera & Kleiner, 2005). Na fonte de iões, os analitos são ionizados e levados para a fase gasosa.

O acrónimo MALDI significa em língua Inglesa Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization ou Ionização/Dessorção da Matriz Assistida por Laser em Português embora a designação em língua Portuguesa seja pouco utilizada. Introduzido pela primeira vez em 1988 por Hillenkamp e Karas, é um método utilizado para a detecção e caracterização de biomoléculas, como proteínas, péptidos, oligossacarídeos e oligonucleótidos (Lewis et. al., 2000; Lay, 2001).

Em análises de proteómica, existem quatro tipos básicos de analisadores de massa que são utilizados: “time-of-flight” (TOF), “ion trap”, “quadrupole”, e “Fourier transform ion cyclotron resonance” (FTICR). Todos estes métodos diferem notavelmente na sensibilidade, resolução, precisão de massa e possibilidade de fragmentar iões de péptidos (Guerrera & Kleiner, 2005).

No MALDI, uma amostra é co-cristalizada com uma matriz e, posteriormente, pulsada com laser, no qual ioniza e vaporiza os analitos (Lewis et. al., 2000). Uma característica importante, é a maneira como a matriz e o analito (parte da amostra que é o foco da análise química) interagem no MALDI. Neste método, o pó da matriz e do analito são misturados e de seguida aplica-se a mistura numa placa de MALDI (Hillenkamp & Peter-Katalinic, 2007).

Os lasers são caracterizados pela sua emissão (comprimento, largura de pulso e energia de pulso) e parâmetros de feixe (diâmetro e divergência) (Hillenkamp & Peter-Katalinic, 2007). A maior parte da energia do laser é absorvida pela matriz, que impede a fragmentação indesejável da biomolécula. A matriz desempenha uma função importante, absorvendo a luz do laser e causa indirectamente a vaporização da substância. A matriz, constituída por moléculas cristalizadas, dos quais os mais utilizados na análise de proteínas intactas são: ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinâmico (ácido sinpínico), ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (ácido alfa-ciano ou alfa-matriz) e o ácido 2,5-dihidroxibenzóico (DHB) (Hillenkamp & Peter-Katalinic, 2007). Estes meios, através dos quais a substância será transportada para a fase gasosa, servem como doadores e receptores de prótons e fornecem as condições de ionização. As biomoléculas ionizadas sofrem uma aceleração para um detector onde todos os iões recebem a mesma quantidade de energia cinética. Apesar de terem a mesma energia, a massa é diferente e podem alcançar o detector em diferentes tempos. Os detectores convertem o sinal para um espectro de massa com o m/z no eixo do xx (horizontal) e o número de iões/intensidade no eixo do yy (vertical). Os iões com menores dimensões alcançam o detector primeiro porque a sua velocidade é maior, enquanto que os iões maiores (massa superior) levam mais tempo, daí o nome TOF (time-of-flight), que se deve ao facto da massa ser determinada a partir do tempo de voo dos iões no espectro (Lewis et. al., 2000; Mann et. al., 2001; Guerrera & Kleiner, 2005).

Na figura 2.27 pode-se observar o método MALDI-TOF que realiza em (A) a amostra co-cristalizada com a matriz irradiada por um feixe de laser, levando à sublimação e ionização de péptidos e em (B) após o laser, um campo de forte aceleração confere uma energia cinética fixa para os íons produzidos pelo processo de MALDI.

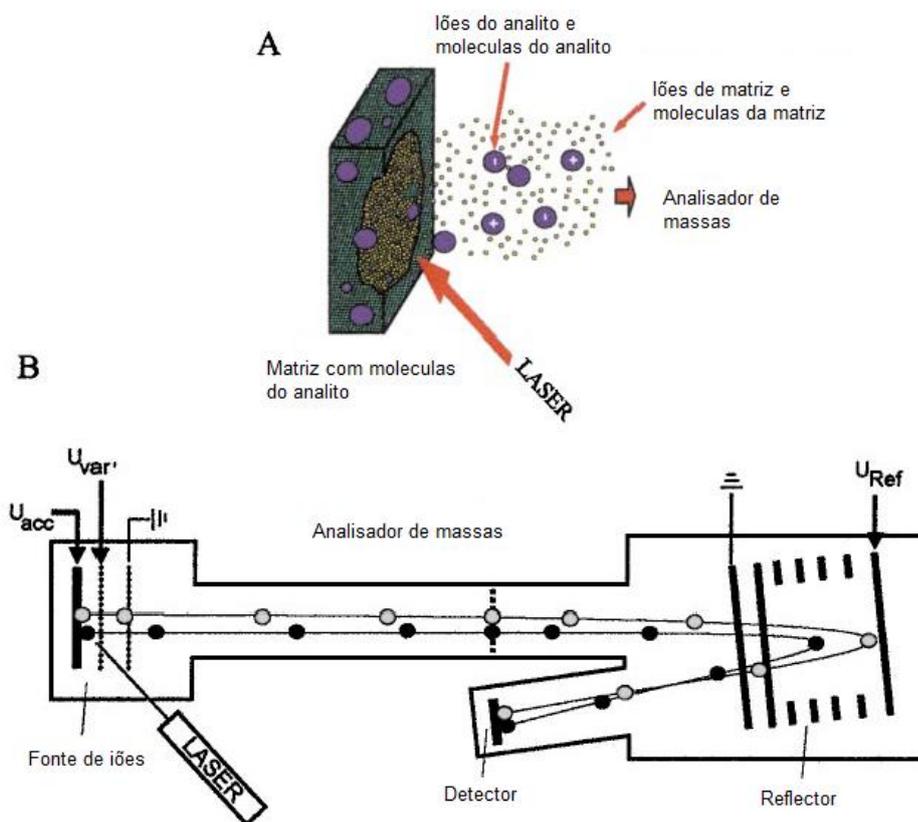


Figura 2.27- Método MALDI-TOF (adaptado de Mann *et. al.*, 2001).

Características do MALDI-TOF

O MALDI-TOF/MS tem a vantagem de apresentar um curto tempo de análise (minutos), o consumo de amostra é insignificante e apresenta uma alta resolução, fornecendo uma análise mais rápida, precisa e altamente sensível às misturas complexas de péptidos (Lewis *et. al.*, 2000; Trauger *et. al.*, 2002). No Quadro 2.7, pode-se observar as características do método.

Quadro 2.7 - Características do método MALDI-TOF (adaptado de Lewis *et. al.*, 2000).

MALDI-TOF	
Precisão	0.05 – 0.2% (50 – 200 ppm)
Resolução	2000
(m/z) razão massa-carga	>300 000

Espectrometria de massa em proteómica

Abordagem do tipo “Top-Down”

Em proteómica uma abordagem do tipo top-down, as amostras de proteínas intactas são analisadas directamente através de electroforese em gel bidimensional pelo método de espectrometria de massa. Neste tipo de análises, o espectro de massa não fornece informações acerca da identidade das proteínas mas apenas a abundância relativa das diferentes massas. O perfil da proteína é depois analisado e seleccionado as massas de interesse podendo ser purificadas e identificadas (Pernemalm, 2009).

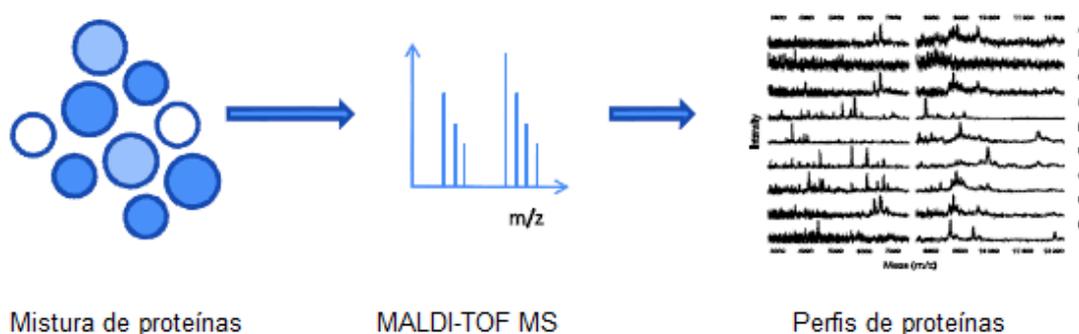


Figura 2.28 – Esquema da espectrometria de massa em proteómica baseada numa estratégia do tipo “Top-Down” (adaptado de Pernemalm, 2009).

Estratégia do tipo “Bottom-Up”

A abordagem “bottom-up”, tornou-se uma das mais comuns em espectrometria de massa baseada em proteómica. Este método baseia-se numa clivagem enzimática das proteínas em péptidos, normalmente através da tripsina. A clivagem enzimática é realizada para facilitar a ionização, fragmentação e identificação de proteínas. Para reduzir a complexidade da mistura de péptidos estes são submetidos a uma separação cromatográfica antes da análise de espectrometria de massa (Pernemalm, 2009). A sequência de péptidos pode ser

determinada pela interpretação dos dados resultantes da fragmentação dos péptidos em espectro de massa Tandem ou espectro MS/MS (Mann et. al., 2001).

Nesta técnica, a partir de uma mistura, um pico de um ião correspondente a um dado péptido é primeiro seleccionado no espectrómetro de massa e depois é dissociado pela colisão com um gás inerte, como árgon ou azoto (Mann et. al., 2001).

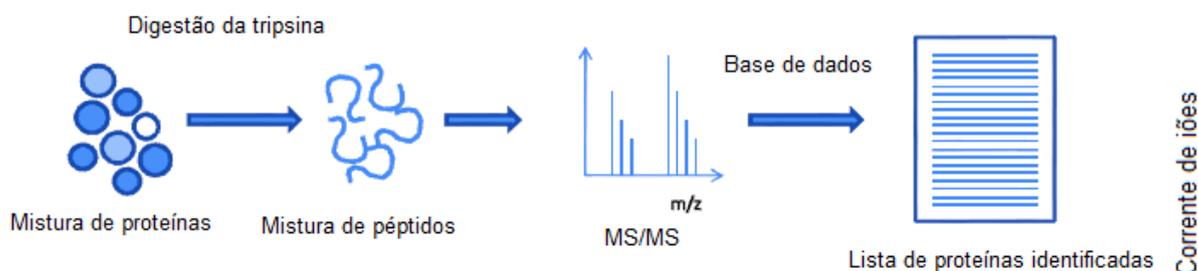


Figura 2.29 – Esquema da espectrometria de massa em proteómica baseada numa estratégia do tipo “bottom-up” (adaptado de Pernemalm, 2009)

2.7.6 – Técnica FISH

O método Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) é um método molecular para identificar bactérias. Segundo Manser et. al. (2005), este método permite uma quantificação rápida e fiável de espécies de bactérias nitrificantes em lamas activadas e serve, ainda, para detectar microrganismos filamentosos em lamas activadas no tratamento de águas residuais.

Através da utilização de sondas de oligonucleótidos, normalmente com 15 a 30 nucleótidos de comprimento, complementares às regiões 16S rRNA, a sonda reage com uma molécula fluorescente que, quando iluminada com luz ultra-violeta, pode ser visualizada (Jenkins et. al., 2004). Com esta técnica é possível identificar microrganismos à escala laboratorial e diferenciar os níveis taxonómicos, dependendo da especificidade da sonda utilizada. É a única técnica de biologia molecular quantitativa, embora a quantificação seja complexa e subjectiva (Sanz, 2007).

Segundo Sanz (2007), com esta técnica os microrganismos podem ser identificados, localizados e quantificados em quase todos os ecossistemas; porém, a sequência rRNA 16 S é conhecida apenas por algumas espécies de bactérias filamentosas e, conseqüentemente, existem poucas sondas de oligonucleótidos para identificá-las. Por exemplo, num total de 80 espécies filamentosas com morfotipos diferentes em sistemas de lamas activadas doméstico e industrial, apenas 20 são identificadas pelo método FISH. Esta técnica inclui primeiramente uma fixação e permeabilização da amostra, seguido de uma hibridização, depois, lavagem para remover a sonda não acoplada e, por último, a detecção

de células marcadas por microscopia. Este procedimento pode ser concluído em poucas horas (Amann *et. al.*, 2001).

3 – Materiais e Métodos

3.1 - Colheita e armazenamento da Amostra

Em Julho de 2010, foi efectuada uma colheita de água residual na ETAR de Santa Cruz (figura 3.1), utilizando para o efeito um recipiente em polipropileno com um volume total de 5 litros. De seguida, esta amostra foi transportada para o laboratório e refrigerada a 4°C, para posterior análise e identificação potencial da presença de bactérias filamentosas.



A)



B)

Figura 3.1 - **A)** Tanque de arejamento; **B)** decantador secundário da ETAR de Santa Cruz.

3.1.1 – Meio de cultura

O meio de cultura selectivo em meio sólido (Czapek Agar), foi preparado de acordo com o protocolo descrito por Abelho (2010) de modo a favorecer preferencialmente o crescimento de bactérias filamentosas.

CZAPEC AGAR

- Sacarose (7,5 g)
- NaNO₃ (0,75 g)
- MgSO₄ × 7 H₂O (0,125 g)
- KCl (0,125 g)
- FeSO₃ × 7 H₂O (0,0025 g)
- K₂HPO₄ (0,25g)
- Agar (3,75 g)
- Água destilada (250 ml)

Sucintamente, o meio de cultura foi pesado através de uma balança analítica (*METTLER AE 200*) e introduziu-se os reagentes num erlenmeyer (500 mL) perfazendo com um volume de 500 mL de água bi-destilada. De seguida, a solução foi colocada sobre uma placa de aquecimento, (*HEIDOLPH VV - micro*) e com o auxílio de um magnete a solução foi agitada até se obter uma solução translúcida (figura 3.2), indicativa da dissolução dos reagentes do meio.



A)



B)

Figura 3.2 - **A)** Balança analítica; **B)** placa de aquecimento e agitação.

A solução foi selada utilizando uma rolha de algodão e cobrindo com papel de alumínio. De seguida, o erlenmeyer contendo a solução com o meio selectivo bem como as placas de Petri a serem utilizadas foram esterilizadas num autoclave (*RAYPA*) a uma temperatura de 121°C e a uma pressão de 1 atmosfera durante aproximadamente 15 a 20 minutos. Posteriormente o erlenmeyer e as caixas de Petri foram retirados do autoclave deixando-se arrefecer até atingir uma temperatura que permitisse o manuseamento (figura 3.3).



A)



B)

Figura 3.3 - **A)** Meios de cultura em Erlenmeyer e caixas de Petri; **B)** Autoclave.

Depois do processo de esterilização o meio de cultura foi distribuído (cerca de 10 ml) nas caixas de Petri em condições de assepsia (junto à chama do bico de Bunsen).

Após a solidificação do meio de cultura (aproximadamente 1 hora), foi realizado o espalhamento do meio para colonização das placas. Para o efeito, foi utilizada uma ansa previamente esterilizada à chama. As placas de Petri foram invertidas e incubadas a 37°C durante 48 horas (figura 3.4.). Após o período de incubação, efectuaram-se repicagens de colónias seleccionadas e efectuou-se nova incubação de acordo com o descrito anteriormente na tentativa de restringir o crescimento de bactérias não filamentosas. Foram recolhidas amostras de colónias e transferidas para *eppendorfs* contendo uma solução tampão (PBS) e glicerol (20%) e armazenadas a -80°C. As colónias armazenadas foram posteriormente utilizadas para novo crescimento em meio de cultura selectivo.



A)



B)



C)



D)

Figura 3.4 - **A)** Meio de cultura nas caixas de Petri; **B)** Agitação de uma suspensão de bactérias no vórtex; **C)** Inoculação em placas de agar; **D)** Incubadora.

3.2 – Observação Microscópica e Colorações

Primeiramente, observou-se ao microscópio óptico (*Leica DMLB, Alemanha*) a amostra geral de lama, retirada da ETAR, de modo a visualizar e identificar o tipo de organismos existentes (figura 3.5). De seguida, aplicou-se dois tipos de coloração, coloração de Gram e de Hematoxilina & Eosina.



Figura 3.5 - Microscópio óptico.

3.2.1 – Coloração de Gram

A coloração de Gram (Christian Gram, Dinamarca, 1884), permite distinguir bactérias Gram positivas de Gram negativas, com base na coloração diferencial com o complexo de violeta de cristal - iodo, e com a safranina como reagente contrastante. A parede celular dos organismos Gram positivos retêm este complexo após aplicação de álcool e desenvolvem uma cor violeta, enquanto que os organismos Gram negativos descoram e por outro lado, desenvolvem uma cor rosa / vermelha. Este método torna-se muito útil na medida em que permite avaliar a contaminação bacteriana de amostras ou analisar determinadas características morfológicas de bactérias isoladas de culturas bacterianas mistas ou isoladas.

Procedimento

A preparação do esfregaço seguiu o protocolo de Coico (1997) e Lillie, (1977) de acordo com os seguintes procedimentos:

- 1 – Utilizou-se uma ança estéril e preparou-se uma camada fina de amostra a ser corada numa lâmina de vidro (figura 3.6);
- 2 – Selecionou-se uma colónia e efectuou-se a ressuspensão numa gota de água esterilizada previamente aplicada na lâmina;
- 3 – Secou-se o esfregaço ao ar.



Figura 3.6 - Lâmina de vidro com camada fina de amostra.

Coloração

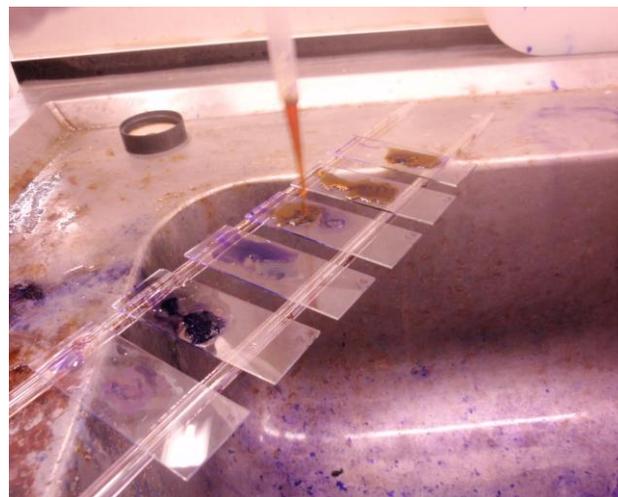
1 – Cobriu-se o esfregaço com solução de violeta de cristal e após 30 segundos removeu-se o corante (figura 3.7);

2 – Banhou-se em água corrente durante 5 segundos. Retirou-se o excesso de água (pode ser utilizada água da companhia corrente);

3 – Cobriu-se o esfregaço com solução de iodo de Gram durante 1 minuto (figura 3.6). Banhou-se com água como no passo anterior e retirar o excesso de água.



A)



B)

Figura 3.7 - **A)** Esfregaço com solução de violeta de cristal; **B)** Esfregaço com solução de iodo.

Descoloração e coloração de contraste do esfregaço

1 – Aplicou-se na lâmina uma solução de descoloração (acetona), inclinando a lâmina ligeiramente e lentamente, deixando cair a solução de descoloração sobre o esfregaço na lâmina, permitindo que esta cubra o esfregaço (figura 3.8);

2 – Banhou-se com água bi-distilada durante 5 segundos. Retirou-se o excesso de água;

3 – Cobriu-se a lâmina com corante de contraste (safranina) durante 30 segundos (figura 3.8);

4 – Lavou-se com água corrente, e secou-se ao ar.



Figura 3.8 - **A)** Solução de descoloração (acetona); **B)** Corante de contraste (safranina).

Observação da lâmina

1 – Examinou-se ao microscópico os esfregaços para distinção entre bactérias Gram positivas e negativas.

As bactérias Gram positivas desenvolveram uma cor violeta quando comparadas com as Gram negativas que desenvolveram uma cor rosa.

3.2.2 – Coloração de hematoxilina & eosina

Adicionalmente à coloração de Gram efectuou-se uma coloração de H&E para observação e exame dos esfregaços. A coloração de Hematoxilina & Eosina é uma técnica de rotina geralmente utilizada em histologia. Nas células coradas com H&E (coloração de rotina) os ácidos nucleicos presentes no núcleo são corados pela hematoxilina, dando ao núcleo um tom azul-púrpura. A eosina é atraída pelos elementos básicos da proteína do citoplasma da

célula, corando-o de róseo a vermelho. As bactérias Gram (+) apresentam uma cor arroxeada com H&E (Santos *et. al.*, 2007).



A)

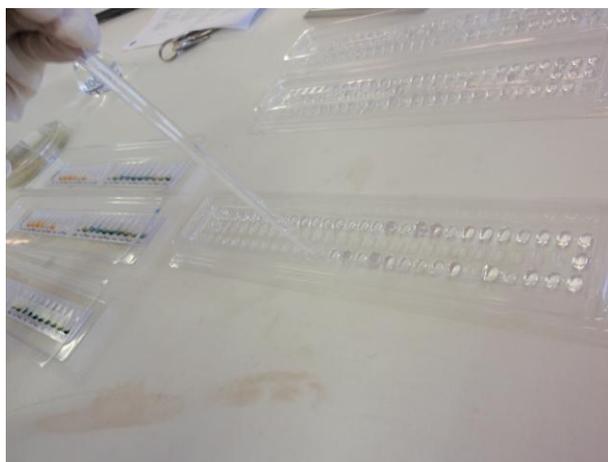
Figura 3.9 - **A)** Corantes hematoxilina-eosina.

3.3 – Método API 20 E

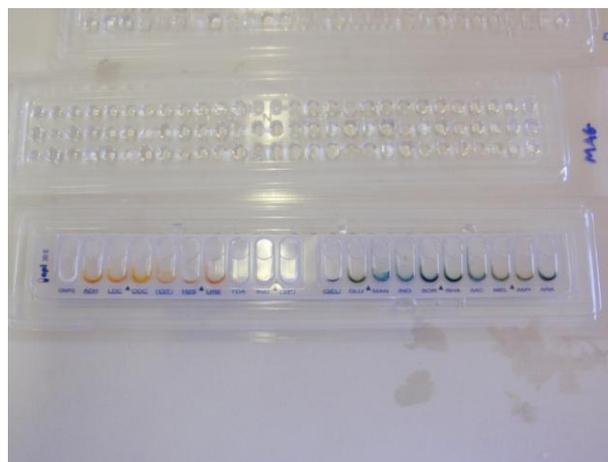
Para a realização dos testes API 20 E utilizou-se o protocolo fornecido pela empresa Biomérieux (<http://www.biomerieux.pt/servlet/srt/bio/portugal/home>).

Preparação da galeria

Foram distribuídos nos alvéolos do fundo da caixa de incubação 5 ml de água destilada estéril para criar uma atmosfera húmida e posteriormente colocou-se a galeria na caixa de incubação (figura 3.10).



A)



B)

Figura 3.10 - **A)** Fundo da Caixa de incubação com água destilada; **B)** Galeria na caixa de incubação.

Preparação do inoculo

Foi preparada uma suspensão bacteriana constituída por uma solução de NaCl (0.85%) (Biomérieux) onde foi ressuspensa em 5ml uma colónia de bactérias bem isolada e em condições de assepsia. Esta suspensão foi homogeneizada através da utilização de um vórtex (*FISHER BIOBLOCK SCIENTIFIC*) como se mostra na figura 3.11.

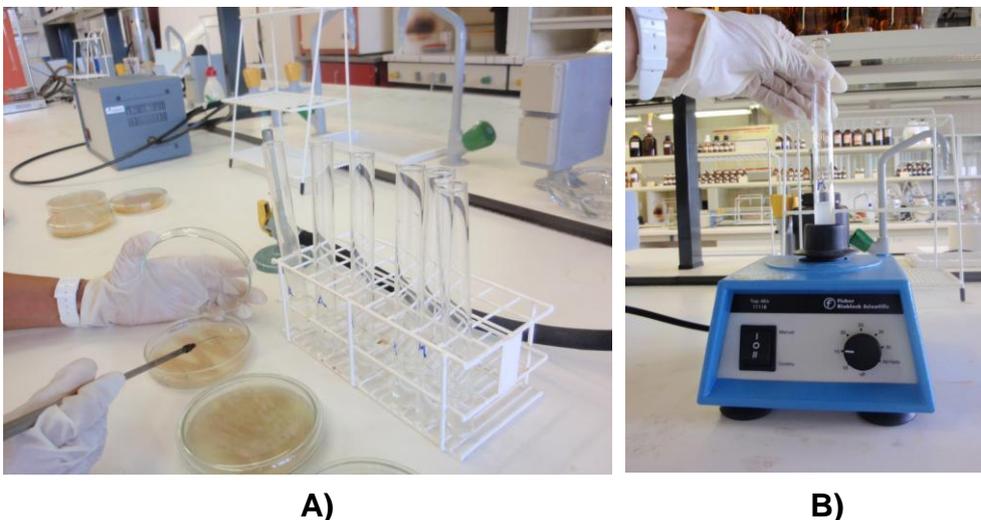
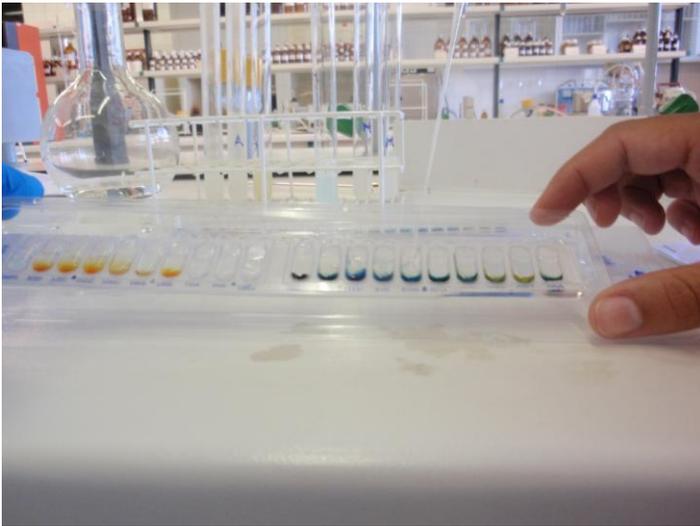


Figura 3.11 - **A)** Ampolas com colónias isoladas em condições de assepsia; **B)** Vórtex para homogeneizar as bactérias.

Inoculação da galeria

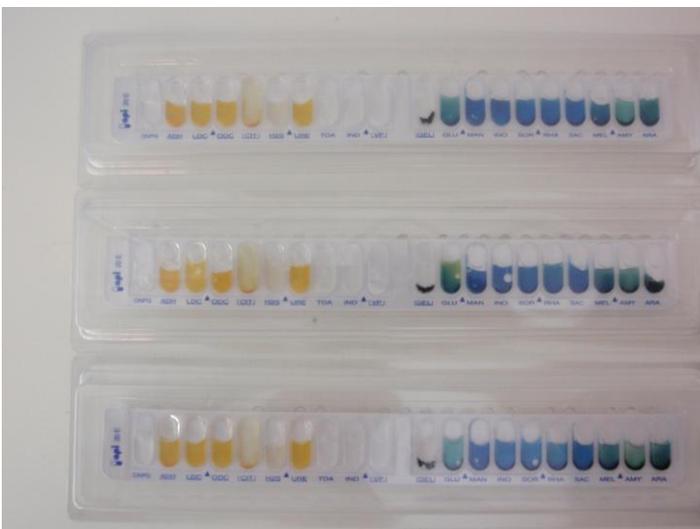
- 1 – Introduziu-se a suspensão nos tubos da galeria utilizando a mesma pipeta (para evitar formação de bolhas no fundo dos tubos);
- 2 – Para os testes CIT, VP e GEL encheu-se o tubo e cúpula;
- 3 – Para os outros testes, encheu-se apenas os tubos (e não as cúpulas);
- 4 – Para os testes: ADH, LDC, ODC, H₂S, URE criou-se uma anaerobiose enchendo a cúpula com óleo de parafina;
- 5 – Fechou-se a caixa de incubação;
- 6 – Incubou-se a 36° C ± 2° C durante 18-24 horas, conforme se mostra na figura 3.12.



A)



B)



C)



D)

Figura 3.12 - **A)** Suspensão nos tubos da galeria; **B)** Óleo de parafina; **C)** Caixas de incubação fechadas; **D)** Galerias na incubadora.

Leitura e interpretação

Leitura da galeria

1 – Após a incubação, a leitura da galeria efectuou-se consultando o quadro de leitura (figura 3.13);

2 – Se 3 ou mais testes (teste GLU + ou -) são positivos, regista-se na ficha de resultados todas as reacções espontâneas e em seguida revela-se os testes que necessitavam da adição de reagente (figuras 3.14 e 3.15):

- Teste TDA: adicionou-se 1 gota de reagente TDA. Uma cor castanho-avermelhada indica uma reacção positiva;

- Teste IND: adicionou-se 1 gota de reagente JAMES. Uma cor rosa difundida em toda a cúpula indica uma reacção positiva;

- Teste VP: adicionou-se 1 gota dos reagentes VP 1 e VP 2. Esperou-se, no mínimo, 10 minutos. Uma cor rosa ou vermelha indica uma reacção positiva. Uma fraca coloração rosa após 10 minutos deve ser considerada negativa;

Testes complementares:

1 – Redução dos nitratos em nitritos (NO_2) e em azoto (N_2):

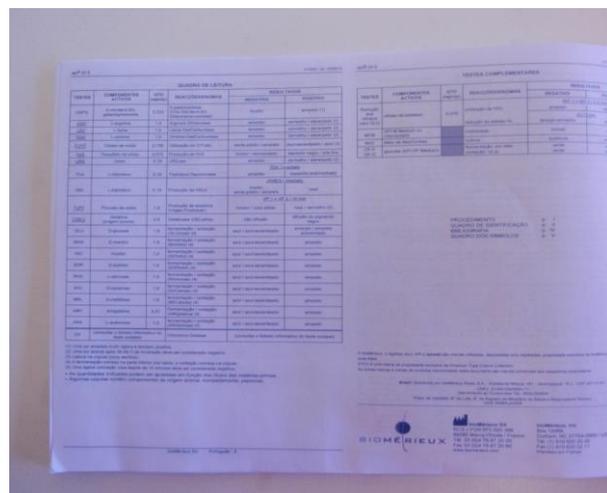
- Adicionou-se 1 gota dos reagentes NIT 1 e NIT 2 no tubo GLU.

- Esperou-se 2 a 5 minutos. Uma cor vermelha indica uma reacção positiva (NO_2). Uma reacção negativa (coloração amarela) pode ser devida à produção azoto (presença de bolhas mínimas):

- Adicionou-se 2 a 3 mg de reagente Zn na cúpula GLU. Após 5 minutos, se o tubo permanecer amarelo indica uma reacção positiva (N_2). Se a cúpula estiver laranja-vermelha, a reacção é negativa, os nitratos ainda presentes no tubo foram reduzidos a nitritos pelo zinco.



A)



B)

Figura 3.13 - **A)** Galeria após a incubação; **B)** Quadro de leitura.

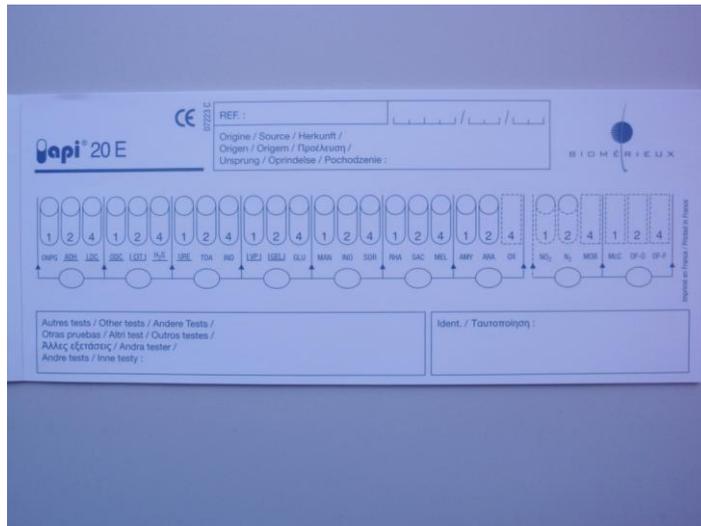


Figura 3.14 - Ficha de resultados.



A)



B)

Figura 3.15 - A) Reagentes usados em alguns testes; B) Galerias após a adição de reagentes.

Interpretação

Perfil numérico

1 – Na ficha de resultados, os testes foram separados por grupos de três e um valor 1, 2 ou 4 é indicado para cada um. A galeria API 20 E engloba 20 testes, adicionando no interior de cada grupo os valores que correspondem às reacções positivas, obtêm-se 7 algarismos (figura 3.14).

Identificação

1 – A partir da base de dados:

- Catálogo analítico - procurou-se o perfil numérico na lista dos perfis.

2 – A partir do programa *apiweb*:

- Introduziu-se manualmente no teclado o perfil numérico com 7 algarismos.

3.4 – MALDI-TOF MS

3.4.1 - Extracção das proteínas bacterianas

Para a caracterização de proteínas por espectrometria de massa (MALDI TOF-MS) foi seguido um protocolo de acordo com Shevchenko *et. al.*,(2006), o qual se resume no seguinte:

1 – Efectuou-se a recolha de uma amostra de cultura de bactérias (200-400 mg) em 1 ml de tampão de lise (PBS);

2 – Sonicou-se através de uma sonda de ultra-sons (*UP H 100 HIELSCHER* 35 kHz, Alemanha) durante 3 x 10s num goblé com gelo para evitar o aquecimento da amostra;

3 – Centrifugou-se a 13000 rpm, durante 5 minutos, (4°C) para separação das proteínas solúveis (sobrenadante) das insolúveis (*pellet*). Em seguida efectuou-se a recolha de uma aliquota (40 µl) de sobrenadante para aplicação posterior em gel SDS-PAGE para separação das proteínas por electróforese;

4 – Ressuspendeu-se o *pellet* em 1 ml de tampão de lise e recolheu-se de uma aliquota (40 µl) para separação das proteínas por electroforese.

3.4.2 - SDS-PAGE

Preparação do gel SDS -poliacrilamida

1 – Lavagem das placas de vidro com etanol e em seguida com água ultra pura;

2 – Introduziu-se o gel (solução I) nos espaços entre as placas e adicional butanol. Esperou-se 15-30 minutos até que a reacção de polimerização ter terminado;

3 – Removeu-se o butanol e a água formada durante a reacção de polimerização. Adicionou-se na base dos poços o gel (solução II) e colocou-se o pente desejado entre os espaços;

4 – Removeu-se cuidadosamente o pente e lavou-se os poços. O gel poderá ser utilizado para a electroforese e armazenado a 4°C.

3.4.3 - Electroforese

1 – Adicionou-se uma solução tampão (com azul bromofenol) para dar cor à mistura de proteínas (5 µl amostra proteína + 5 µl solução tampão). A mistura de proteínas standard para a electroforese foi preparada do mesmo modo;

2 – Desnaturou-se a proteína em água a ferver durante 3-5 minutos numa placa de aquecimento (*TEHTNICA ROTAMIX SHP 10*) (figura 3.16);

3 – Colocou-se o *gel sanduíche cassete* no conjunto de eléctrodos. De seguida, encheu-se a câmara interna do mini tanque com a solução tampão a correr (figura 3.16);

4 – Moveu-se as soluções e a mistura de proteínas standard (10 µg cada) devagar com uma pipeta (figura 3.17);

5 – Colocou-se a tampa sobre a tina de electroforese (*BIO-RAD, EUA*) e certificou-se que os cabos eléctricos estavam bem ligados segundo as cores (figura 3.17);

6 – Iniciou-se a electroforese: 120 V constante; 400 mA; 70 minutos (figura 3.17);

7 – Depois da electroforese completa, desligou-se a alimentação e os cabos eléctricos; Retirou-se a tampa do tanque e retirou-se cuidadosamente o conjunto da câmara interna;

8 – Separou-se os dois pratos para remover suavemente o gel da sanduíche cassete através de uma espátula verde em cunha (figura 3.18);

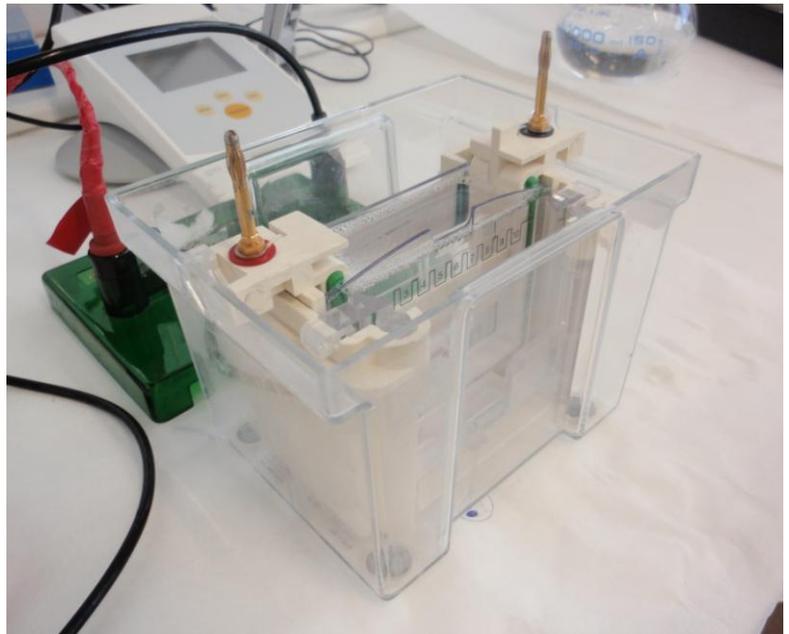
9 – Banhou-se o gel com água ultra pura;

10 – Colocou-se o gel na solução de coloração coomassie blue R-250 durante 1 hora;

11 – Removeu-se a solução de coloração e adicionou-se a solução de descoloração. O gel foi mantido nesta solução até à sua análise (figura 3.18).

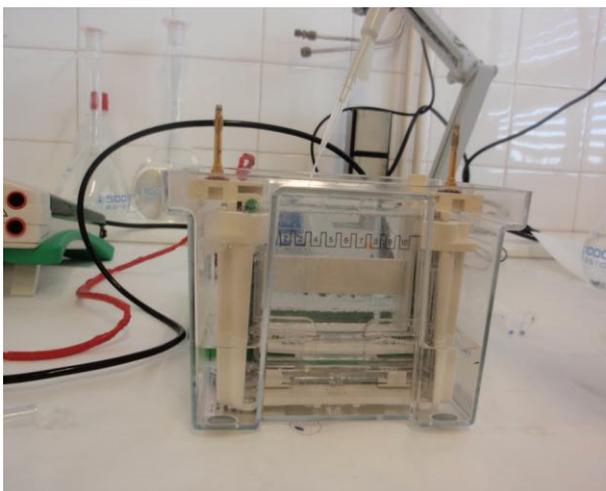


A)

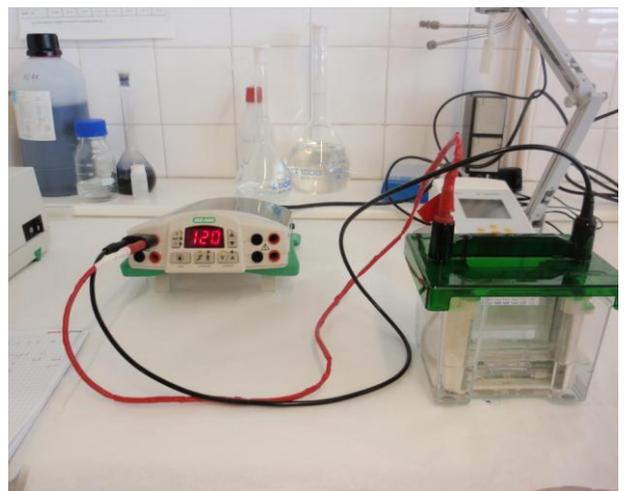


B)

Figura 3.16 - **A)** Desnaturar as proteínas; **B)** Tina de electroforese.



A)

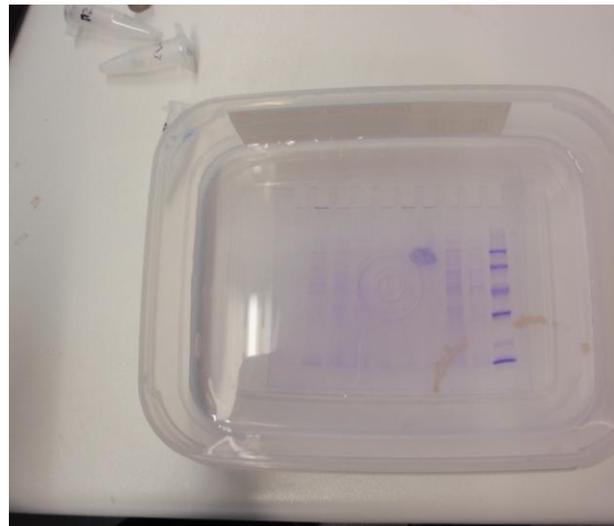


B)

Figura 3.17 - **A)** Correr as soluções com o auxílio da pipeta; **B)** Mini tanque com tampa e cabos ligados.



A)



B)

Figura 3.18 - **A)** Separação dos pratos para remover o gel; **B)** Gel na presença de descoloração.

3.4.4 - Digestão da proteína no gel

1 – Cortou-se bandas de proteína do gel para um *ependorf*, com o auxílio de um bisturi (fez-se pequenos cortes no gel com um bisturi dado que auxilia a penetração dos reagentes durante o tratamento da amostra);

2 – Adicionou-se 100 µl de bicarbonato de amônio 12,5 mM/50% acetonitrilo e sonicou-se no banho de ultra-sons (*ELMA*, Alemanha) por 5 minutos (35 kHz e 60% de amplitude) (figura 3.19);

3 – Retirou-se a água e adicionou-se 100 µl de acetonitrila, e sonicou-se no banho de ultra-sons por 5 minutos (35 kHz e 60% de amplitude);

4 – No final das etapas de lavagem dos pedaços de gel, estes devem ser rígidos e de cor branca;

5 – Removeu-se o acetonitrilo (Sigma) e adicionou-se 40 µl de DDT 10 mM. Sonicou-se no banho de ultra-sons a temperatura ambiente por 5 minutos (35 kHz e 60% de amplitude);

6 – Removeu-se o DDT e adicionou-se 30µl de IAA 100 mM. Sonicou-se no banho de ultra-sons a temperatura ambiente por 5 minutos (35 kHz e 60% de amplitude);

7 – Repetiu-se o procedimento de lavagem com ambic/acetoneitrila e acetoneitrila e secou-se na centrífuga (*EPPENDORF*, EUA) a vácuo;

8 – Adicionou-se 15 µl de tripsina para cada amostra e, em seguida, 10 µl de AmBic 12,5 mM/ acetonitrilo 10%. Realizou-se a digestão enzimática no sonicador: 50% amplitude sonicação por 2 minutos (figura 3.19);

9 – Adicionou-se 20 µl de ácido fórmico 5%. Recolheu-se o sobrenadante para novos *eppendorfs*;

10 – Para as partes que sobraram do gel, adicionou-se 25 µl de acetonitrilo 50%/ ácido trifluoroacético 0,1%. Sonicou-se por 2 minutos com 50% amplitude no sonicador. Recolheu-se o sobrenadante e repetiu-se esta etapa de extracção mais uma vez (figura 3.19);

11 – Secou-se as proteínas digeridas na centrífuga a vácuo;

12 – Ressuspendeu-se a digestão de péptidos em 10 µl de ácido fórmico 0,3%. Usou-se o banho de ultra-sons por 5 minutos (35 kHz e 60% de amplitude);

13 – Adicionou-se a solução matriz (α -CHCA) na razão 1:1 e colocou-se 1 µl da amostra na placa de Maldi (figura 3.20).



A)



B)

Figura 3.19 - **A)** Banho de ultra-sons; **B)** Sonda de ultra-sons.

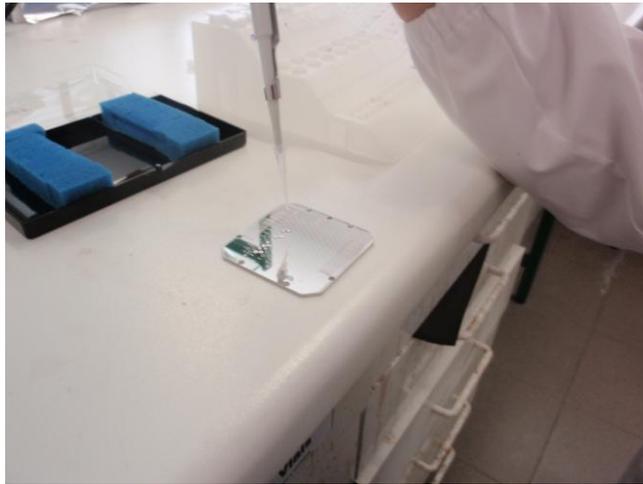


Figura 3.20 - Placa de MALDI.

3.4.5 - Análise em MALDI-TOF e Identificação das proteínas

O espectro de massa foi obtido com um MALDI TOF-TOF MS (BRUKER, EUA) em modo reflector. Após a aquisição do espectro efectuou-se a identificação de proteínas previamente seleccionadas através da pesquisa em bases de dados com o programa de análise MASCOT.

4 – Resultados e Discussão

4.1 – Meios de cultura

Para a determinação da população de bactérias filamentosas da ETAR de Santa Cruz, utilizou-se o meio selectivo *CZAPEC AGAR* conforme, descrito no ponto 3.1.1. Realizaram-se vários crescimentos bacterianos, de forma a tentar poder-se obter uma cultura pura. Na primeira repicagem, não se conseguiram obter culturas puras, como se mostra na figura 4.1 A, através das diferentes texturas e cores. Na segunda repicagem a cultura obtida apresentou um aspecto mais selectivo com uma textura e cor homogénea, conforme se mostra na figura 4.1B.

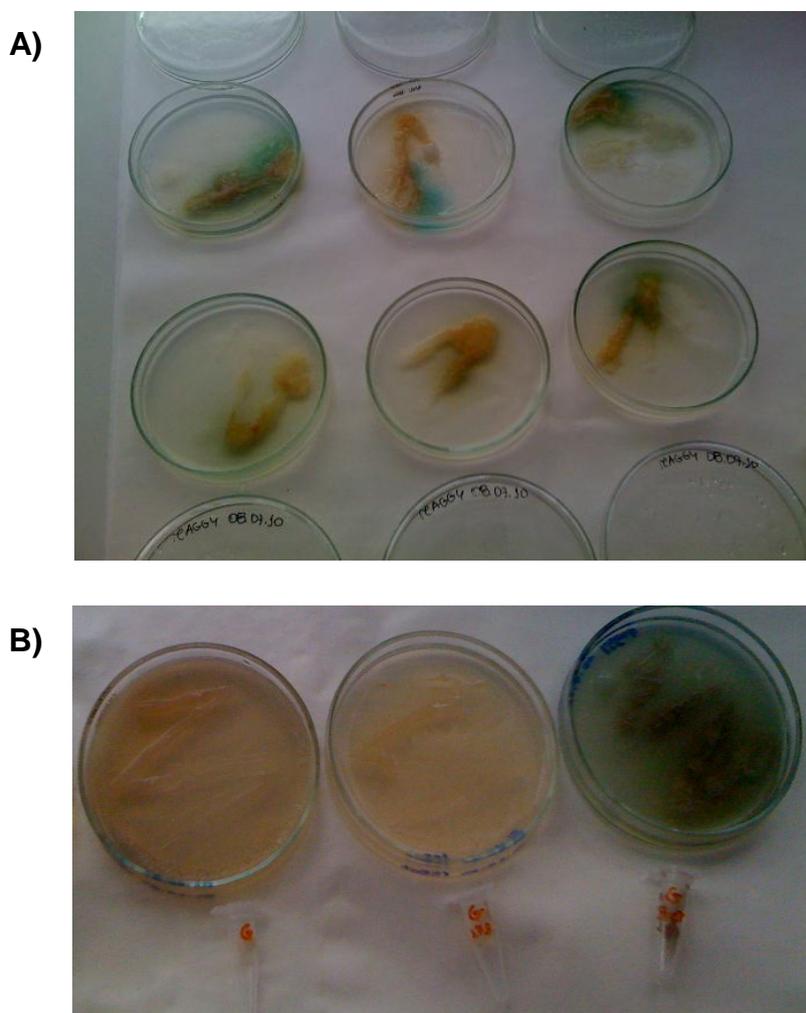


Figura 4.1 - **A)** Placas com bactérias na 1ª repicagem; **B)** Placas com bactérias na 2ª repicagem.

Após observação ao microscópio verificou-se que os resultados obtidos nos meios de culturas preparados não foram suficientemente selectivos, dado que cresceram diferentes tipos de microrganismos e, conseqüentemente, não se obtiveram culturas puras.

Esfregaço

Na preparação do esfregaço, observou-se uma fina camada de lama sobre uma lâmina de vidro, que provocou a dissociação dos elementos celulares. Através do microscópio óptico (*Leica DMLB*, Alemanha) com uma ampliação 400x e de 1000x visualizou-se o aspecto geral da lama. Na figura 4.2, mostra-se o aspecto geral da lama, tendo-se identificado diferentes microrganismos, incluindo organismos filamentosos e não filamentosos.

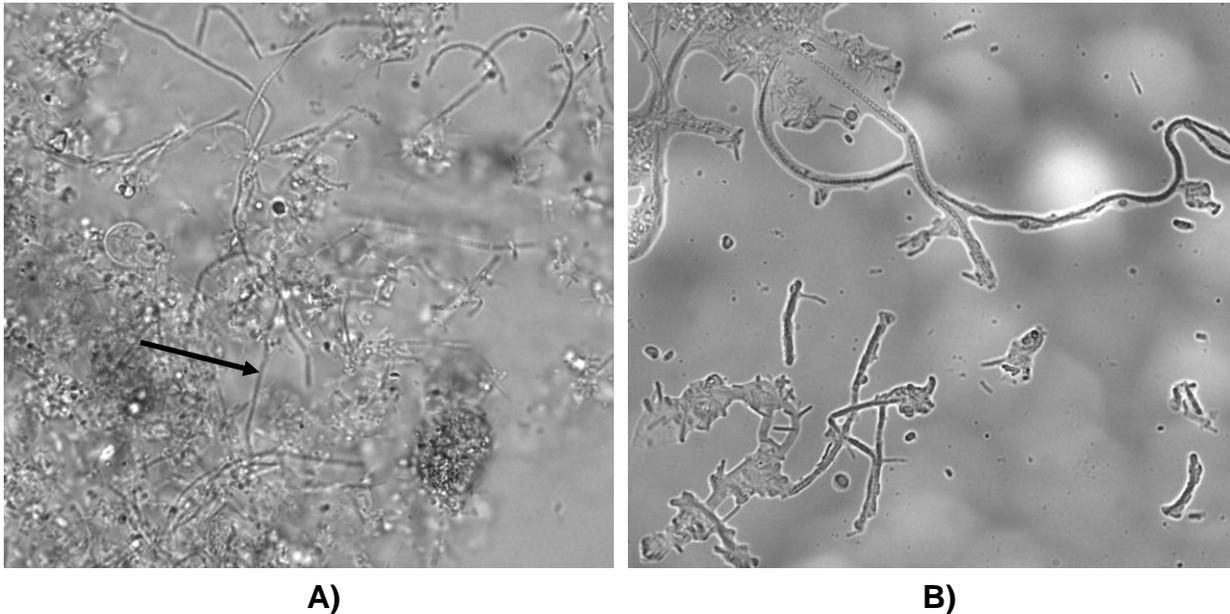


Figura 4.2 - **A)** e **B)** Aspecto geral da lama (sem corante) ampliação 400x.

4.2 – Coloração de hematoxilina & eosina

Para a coloração de hematoxilina e eosina, a amostra geral de lamas foi corada na presença destes corantes sendo posteriormente observada no microscópio óptico após montagem com lamela e resina DPX (ampliação 400x e 1000x) conforme se mostra na figura 4.3. É notório a presença de organismos filamentosos (figura 4.3 C e D, respectivamente) que coraram de rosa/vermelho o citoplasma das células e de azul os núcleos.

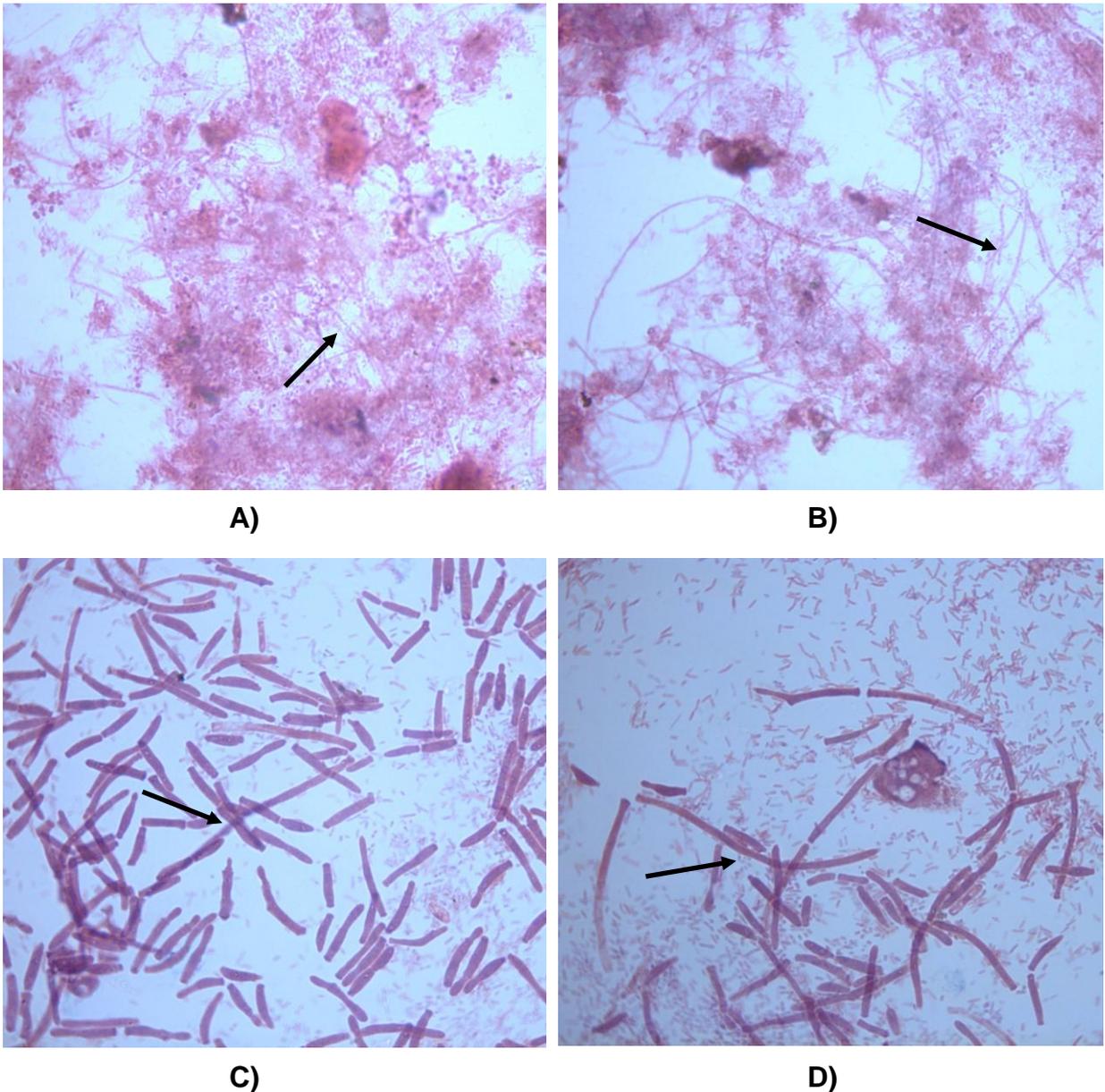


Figura 4.3 - **A) e B)** Aspecto geral da lama com corante hematoxilina-eosina ampliação 400x; **C) e D)** Presença de organismos filamentosos com corante hematoxilina-eosina ampliação 1000x.

4.3 – Coloração de Gram

A coloração de Gram é uma técnica usual de coloração de preparações histológicas para observação posterior ao microscópio óptico, utilizada para corar diferentes microrganismos com base na sua composição química e integridade da parede celular. São classificados em Gram positivos se apresentarem uma cor azul-violeta ou Gram negativos se, por outro lado, apresentarem uma cor vermelha (Pandolfi & Pons, 2004, Eikelboom, 2000). Na figura 4.4 A e B, mostram-se observações microscópicas com uma ampliação 400x e 1000x respectivamente, da amostra geral de lama após coloração Gram, antes de realizar o meio

de cultura. A amostra corou de vermelho e por isso, as bactérias presentes foram classificadas de Gram negativas.

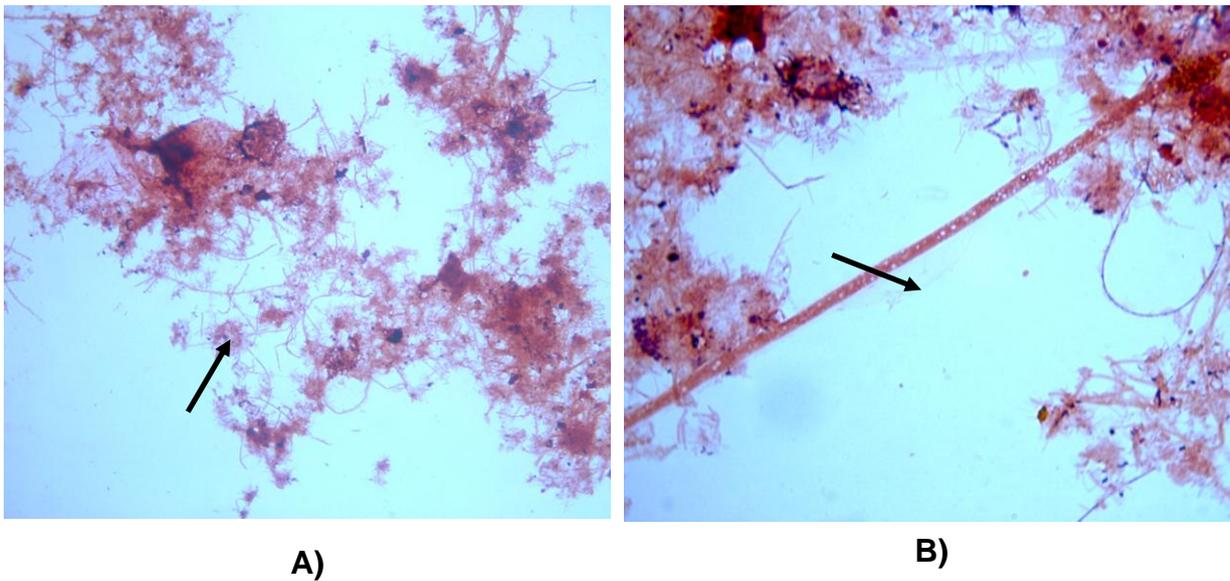


Figura 4.4 - **A)** e **B)** Lamas activadas após coloração de Gram.

Em relação à figura 4.5 A), referente à primeira repicagem, foi observada a presença de múltiplos tipos de organismos, isto é, uma cultura não pura. Deste modo, repetiu-se o procedimento, embora com uma amostra mais diluída, de forma a obter-se uma cultura mais próxima da cultura pura, isto é, com uma menor quantidade de organismos presentes no meio e através de repicagens sucessivas. As colónias foram armazenadas (pequenas amostras) em eppendorfs para identificação posterior através dos métodos API e MALDI-TOF (figura 4.5 B, C e D).

Com base nas figuras 4.4 e 4.5 as bactérias obtidas e observadas foram classificadas como sendo Gram negativas, uma vez que apresentam uma coloração rosa/vermelho.

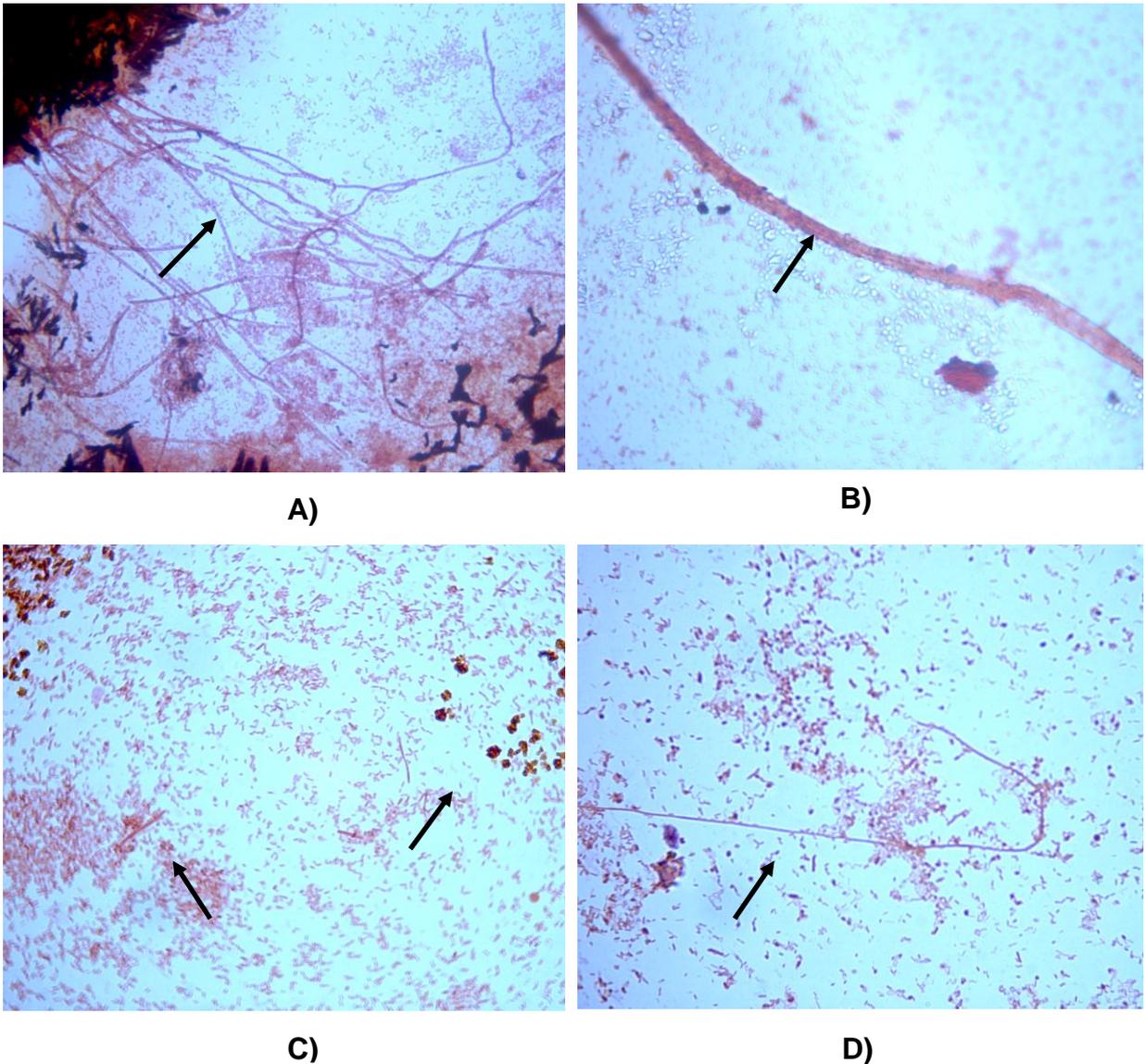


Figura 4.5 - **A)** Filamentos após coloração de Gram na 1ª repicagem; **B), C)** e **D)** Filamentos após coloração de Gram na 2ª repicagem.

Limitações e principais vantagens do método Gram

A técnica das colorações é de fácil aplicação e rápida implementação, contudo, apresenta algumas limitações. A principal desvantagem está na resolução e precisão do método, limitado pelos sistemas ópticos tradicionais, uma vez que não é, muitas vezes, possível efectuar-se uma análise por microscopia de contraste de fase. (Eikelboom, 2000).

Algumas bactérias filamentosas podem apresentar reacções variáveis às colorações, dificultando a sua identificação. Outro aspecto importante, é o facto de existirem também diferentes autores que descrevem os organismos filamentosos com o mesmo tipo morfológico de forma distinta ou mesmo incompleta (Wanner, 1994).

4.4 – Kits API

O API 20 E é uma metodologia padronizada para a identificação de *Enterobacteriaceae* e outros bacilos Gram negativos de crescimento não fastidioso. As galerias contêm vinte câmaras, cada uma das quais constituída por um microtubo e uma cúpula.

As galerias foram incubadas durante 24h a 37°C (figura 4.6), conforme já descrito no ponto 3.3.5. A leitura das reacções foi efectuada consultando o Quadro de Leitura e a identificação dos microrganismos através dos programas de identificação *apiweb* (REF 20 100 / 20 160) e *ABIS ONLINE BACTERIA IDENTIFICATION* através da introdução de um código de perfis.



Figura 4.6 - Galeria após incubação.

Na figura 4.7 mostra-se a ficha de resultados com a informação obtida para os testes 1, 2 e 3, através da leitura das reacções e com o auxílio do Quadro de leitura.

C)

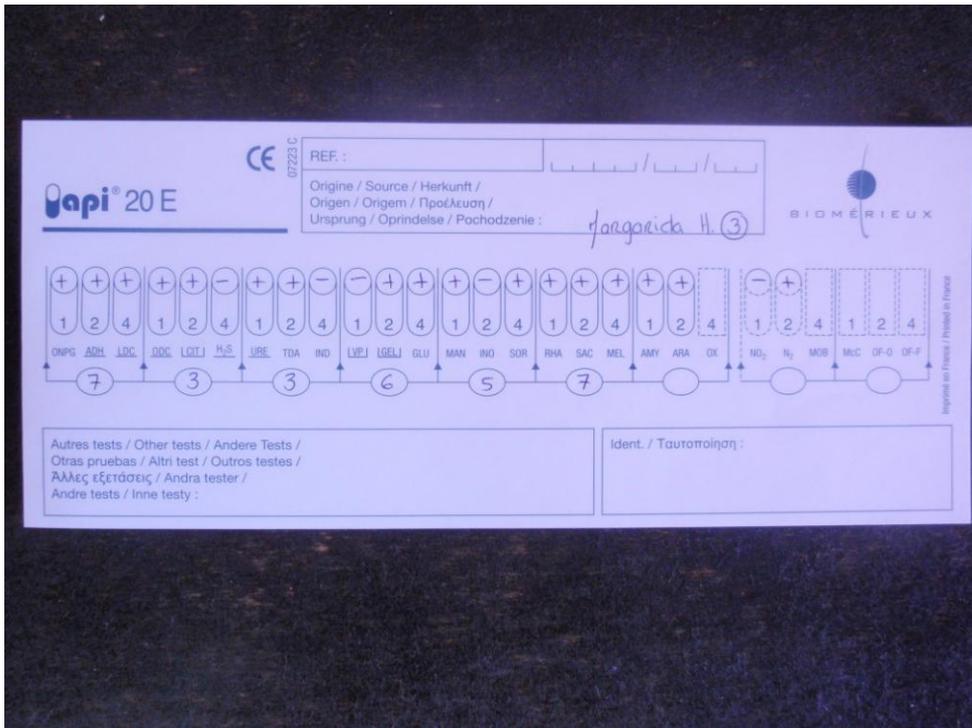


Figura 4.7 - **A)** Ficha de resultados 1; **B)** Ficha de resultados 2; **C)** Ficha de resultados 3.

No Quadro 4.1 mostram-se os resultados obtidos referentes à probabilidade dos programas de base de dados *apiweb* e *ABIS online* para identificação das bactérias predominantes através da introdução de um código de perfis.

Quadro 4.1 - Diferentes programas para identificar as bactérias predominantes através do kit API 20 E.

API web		ABIS online			
Espécie	%	Espécie	% teste 1=teste 3	Espécie	% teste 2
Serratia odorífera	99	Enterobacter (Erwinia) dissolvens	76	Serratia odorífera	84
Serratia marcescens	99	Serratia grimesii	80	Enterobacter (Erwinia) dissolvens	81
Serratia liquefaciens	99	Enterobacter cloacae	76	Serratia grimesii	86
Enterobacter sp.	99	Enterobacter gergoviae	74	Enterobacter aerogenes	79

Como se pode observar no Quadro 4.1, através da aplicação do programa *apiweb*, com uma probabilidade de 99%, os géneros identificados foram a *Serratia* e *Enterobacter* e 70

presumivelmente as espécies *Serratia odorífera*, *Serratia marcescens*, e *Serratia liquefaciens*.

Com o programa *ABIS online*, para o teste 1 e 3, os géneros predominantes foram igualmente a *Serratia* e *Enterobacter* com probabilidades entre os 70 - 80%, bem como, para o teste 2, embora com uma probabilidade mais baixa, próxima dos 80% (Quadro 4.1).

A *Serratia* é uma bactéria Gram negativa anaeróbia facultativa podendo provocar infecções ao nível do trato urinário e respiratório e feridas cirúrgicas (Vasconcelos, *et. al.*, 2006).

A *Enterobacter* pertence à família das bactérias *Enterobacteriaceae*, gram negativos e anaeróbios facultativos, ou seja, tanto realizam metabolismo respiratório como fermentativo. As espécies de *Enterobacter* são organismos patogénicos responsáveis por várias infecções respiratórias, do trato urinário, da pele, entre outras. Estas bactérias podem ser encontradas nas fezes de humanos e animais, na água, nos vegetais, insectos e produtos lácteos (Sanders *et. al.*, 1997).

Os programas aplicados para interpretação dos resultados obtidos apresentaram coerência na identificação dos microrganismos do género *Serratia* e *Enterobacter*. Contudo, trata-se de resultados que apresentam algum grau de incerteza dado não se ter conseguido obter culturas totalmente puras.

Limitações do método API

Este método é de fácil aplicação e os resultados são obtidos num curto período de tempo. No entanto, os resultados obtidos por estes testes podem ser enganosos dado que esta metodologia não permite identificar novas espécies, isto é, espécies que não estão incluídas no sistema de base de dados, ou seja, o sistema API 20 E. Esta metodologia destina-se à identificação das *Enterobacteriaceae* e dos bacilos Gram negativos não fastidiosos não podendo ser utilizado para identificar outros microrganismos ou excluir a sua presença.

Assim, podem existir diferentes conclusões quando se comparam resultados obtidos através de técnicas convencionais e através da técnica API devido principalmente à diferença do princípio das reacções utilizadas.

Através da metodologia API poder-se-ão obter desvios de percentagens de probabilidade de identificação de microrganismos, causados na maior parte dos casos, pelas variações do tipo de substrato e por não serem utilizadas culturas puras (presença de um único tipo de microrganismo).

Outra limitação do kit API poderá estar relacionada com o tempo de incubação. Segundo as informações fornecidas pela empresa Biomérieux, o tempo de incubação poderá ter de ser superior a 24 horas (tempo máximo aconselhado no protocolo da mesma empresa).

No estudo realizado o tempo de incubação foi de 24 horas, tempo esse, que poderá não ter sido suficiente para uma correcta leitura dos testes bioquímicos através da observação da modificação da cor.

4.5 – MALDI-TOF

Em electroforese 1-D, as proteínas são separadas de acordo com o seu peso molecular (PM). Quando bem sucedida, obtém-se um gel de poliacrilamida contendo numerosas *bandas*, bem separadas, cada uma correspondendo a uma proteína, conforme se mostra nas figuras 4.8 e 4.9 delimitadas por um rectângulo. No estudo realizado, foi efectuada uma análise das proteínas com amostras de bactérias filamentosas e não filamentosas, em paralelo, tendo-se cortado bandas do mesmo gel.

Na figura 4.8 mostra-se o gel#1 preparado com a respectiva proteína analisada: proteína P3 com peso molecular aparente de 100 Kda, corresponde à linha fracção proteínas insolúveis M1.

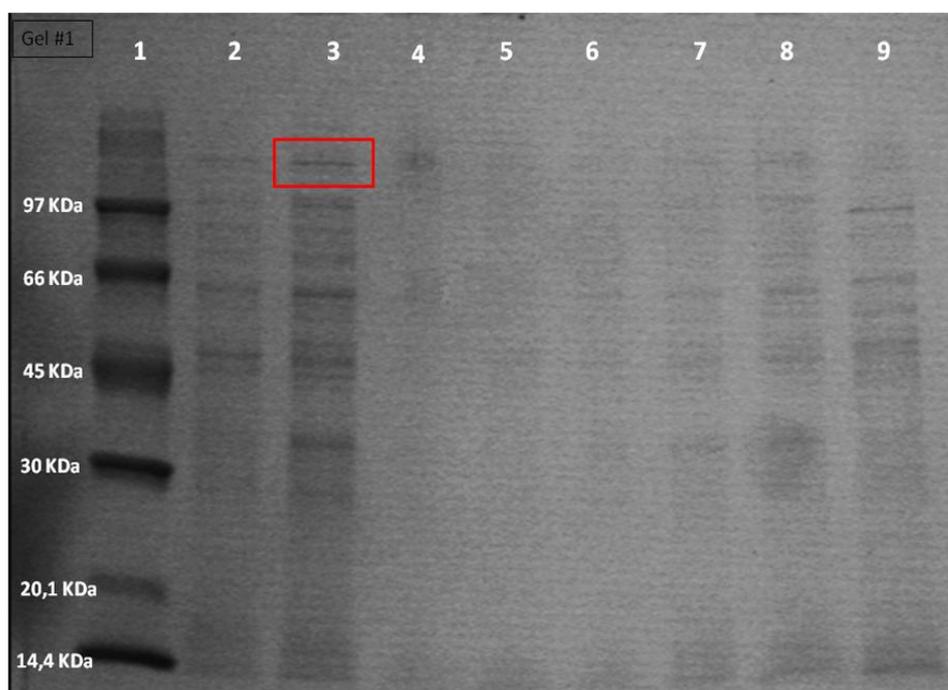


Figura 4.8 - P3 (100 Kda) (Gel#1: Lane 1 – padrão LMW, Lane 2 – fracção proteínas solúveis M1; Lane 3 – fracção proteínas insolúveis M1; Lane 4 – fracção proteínas solúveis

M1 (diluído 1:10); Lane 5 – fracção proteínas insolúveis M1; Lane 6 – fracção proteínas solúveis I1 (diluído 1:10); Lane 7 – fracção proteínas insolúveis I1 (diluído 1:10); Lane 8 – fracção proteínas solúveis I1; Lane 9 – fracção proteínas insolúveis I1).

Na figura 4.9 mostra-se o gel#2 e as proteínas analisadas nomeadamente, a proteína P5 com peso molecular aparente 66 Kda que corresponde à linha fracção proteínas solúveis M2 e a proteína P6 com peso molecular aparente 60 Kda, que corresponde à linha fracção proteínas insolúveis M2.

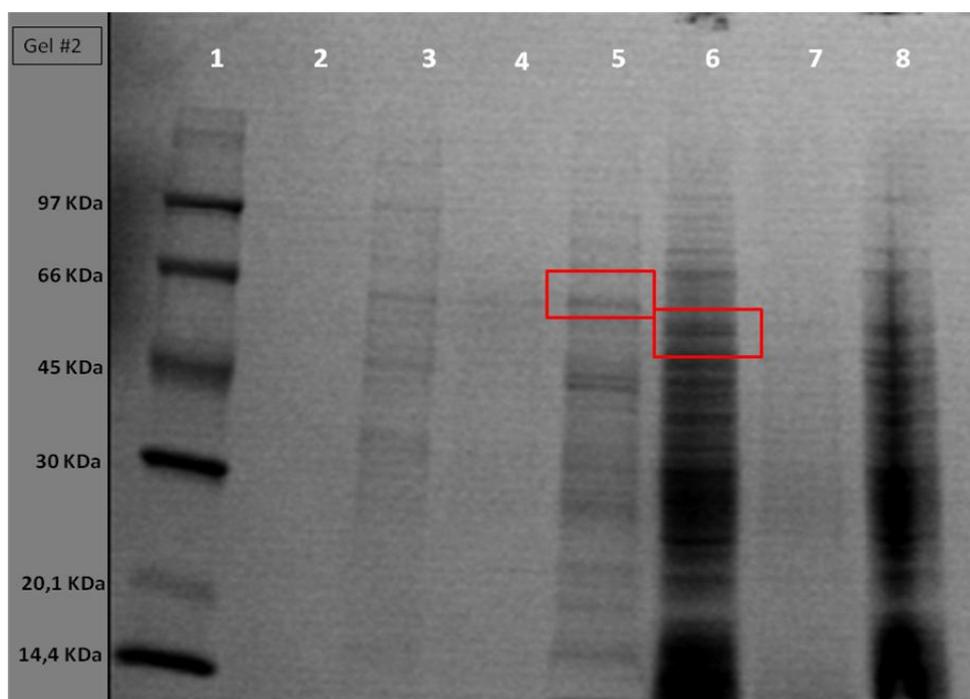
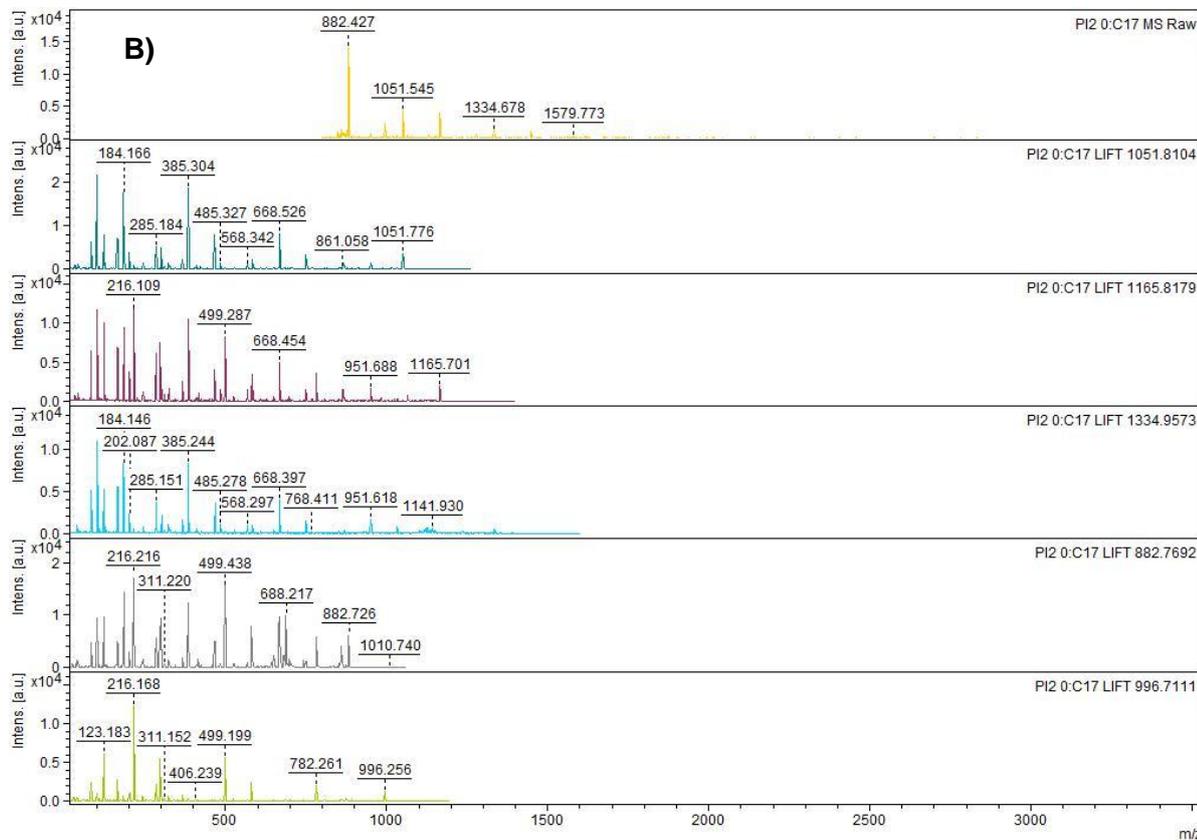
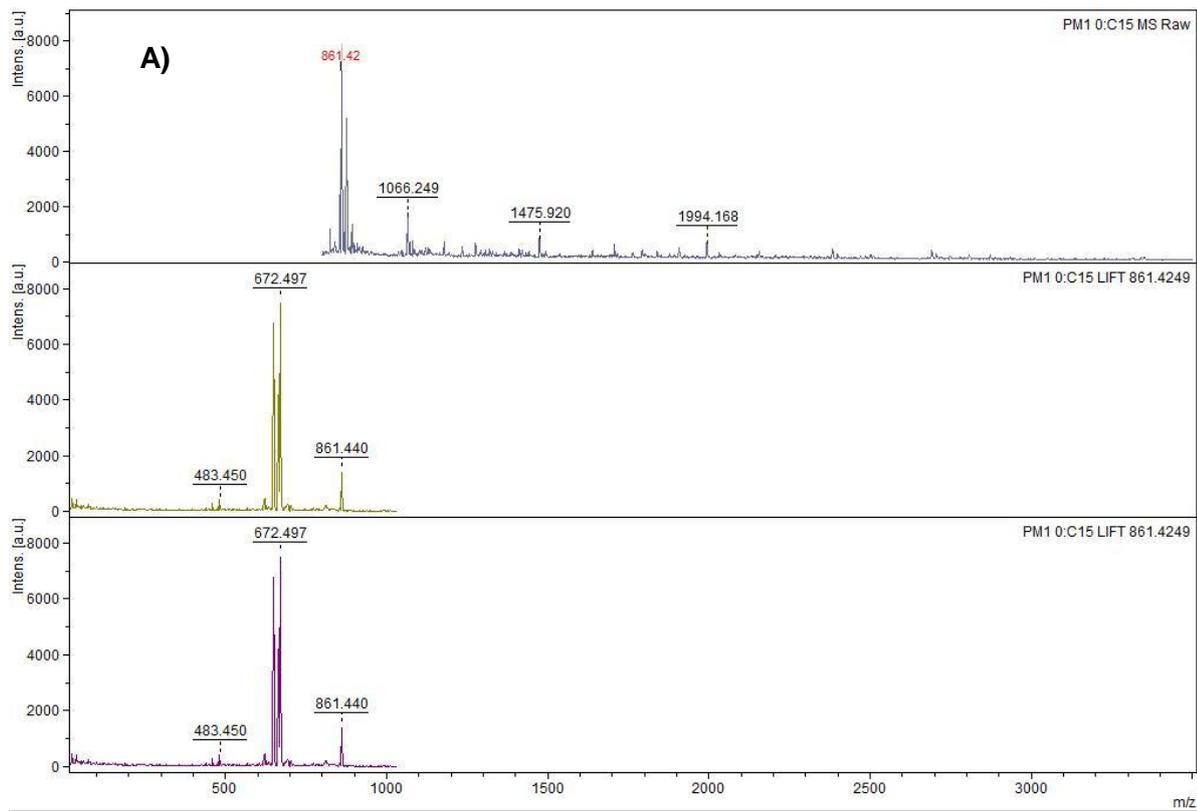


Figura 4.9 - P5 (66 Kda), P6 (60 Kda) (Gel#2: Lane 1 – padrão LMW, Lane 2 – fracção proteínas solúveis M2 (diluído 1:10); Lane 3 – fracção proteínas insolúveis M2 (diluído 1:10); Lane 4 – fracção proteínas solúveis M2 (diluído 1:10); Lane 5 – fracção proteínas solúveis M2; Lane 6- fracção proteínas insolúveis M2; Lane 7 – fracção proteínas solúveis I2; Lane 8- fracção proteínas insolúveis I2).

Os espectros relacionam a abundância dos fragmentos peptídicos *versus* a relação m/z, e através dos bancos de dados, é possível a identificação das proteínas. As análises foram realizadas a partir de iões de péptidos intactos (espectrometria de massa ou MS), e de péptidos fragmentados (espectrometria de massa em tandem ou MS/MS).

Nas análises de MS, realizadas pela Universidade de Vigo-Campos Ourense, através do equipamento *BRUKER* (EUA), os valores m/z dos péptidos fragmentados não permitiram uma identificação inequívoca e significativa das proteínas das espécies estudadas. A

informação obtida apenas revelou a abundância relativa às diferentes massas presentes, que neste caso, foi pequena, conforme se mostra na figura 4.10.



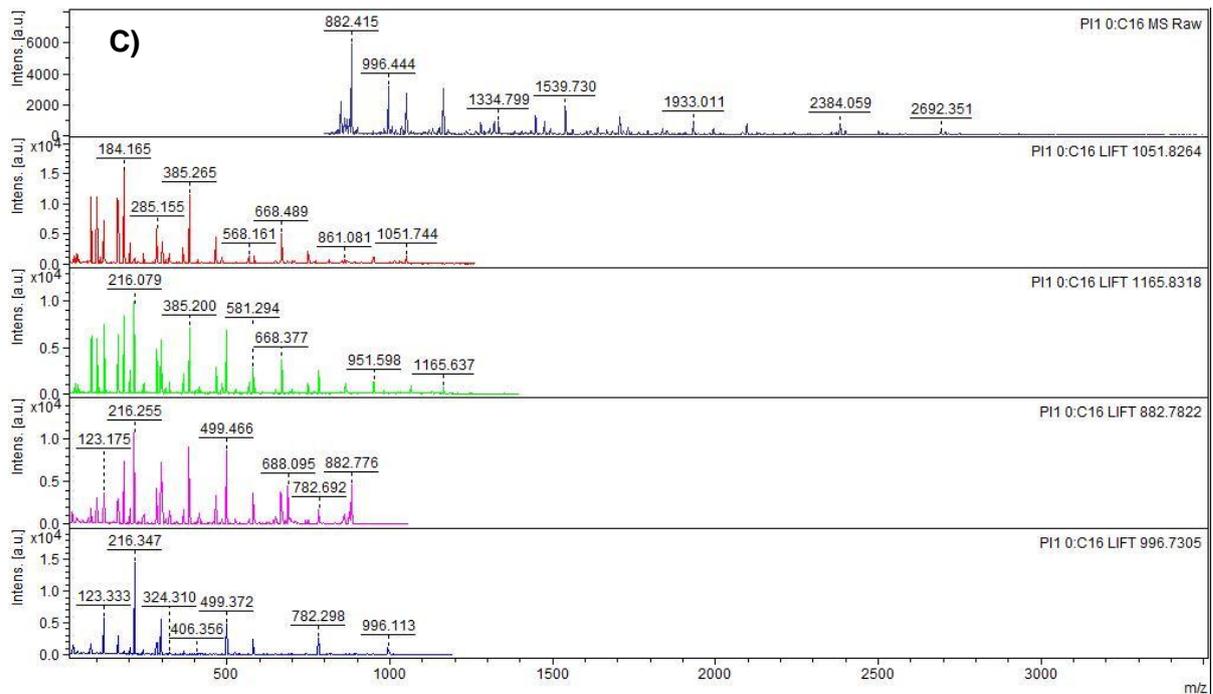


Figura 4.10 - **A), B) e C)** Espectros MALDI-TOF-TOF MS.

No entanto, através das análises de espectrometria de massas em tandem ou MS/MS, a fragmentação dos péptidos em aminoácidos permitiu determinar a relação m/z desses resíduos, identificando-se a sequência de aminoácidos.

No Quadro 4.2, apresenta-se a identificação putativa das proteínas efectuada com o software de pesquisa MASCOT. O quadro mostra a probabilidade de uma dada proteína identificada pertencente a uma determinada espécie não ser um evento aleatório (Score). O quadro indica também a correspondência de péptidos entre a proteína analisada e a presumivelmente identificada.

Quadro 4.2 - Correspondência e cobertura da sequência de péptidos da digestão em gel.

Proteína Identificada	Espécie	Massa teórica (Da)	Mascot score	Cobertura da sequência (%)	Correspondência de péptidos - Matching
lipid A export ATP-binding/permease protein MsbA	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	64750	43	6%	3
AMP-dependent synthetase and ligase	<i>Geobacter sp</i>	61693	42	6%	3
ParB-like partition protein	<i>Escherichia coli</i>	68354	42	6%	3
PMM					
leucyl-tRNA synthetase	<i>Syntrophus aciditrophicus</i>	99967	56	6%	4
EmbrB/QaCA family	<i>Serratia sp.</i>	53800	43	6%	3
Chitinase	<i>Enterobacter sp.</i>	61017	43	6%	3

Os resultados obtidos poderão não ser totalmente conclusivos, provavelmente devido a vários aspectos, nomeadamente, (i) a amostra não era pura; (ii) a proteína pode não ter correspondido à espécie analisada; (iii) poderão ter ocorrido sobreposições de proteínas, que apresentassem pesos moleculares e pontos isoeléctricos (pI) semelhantes; (iv) e o equilíbrio entre as diluições efectuadas poderá não ter sido atingido.

Comparando o MALDI-TOF-MS com os API'S, obtiveram-se dois géneros iguais: *Serratia sp.* e *Enterobacter sp.* No entanto, este método, mostra que quanto maior o *mascot score*, maior a cobertura da sequência e, maior a correspondência de péptidos, significa maior probabilidade de identificação de uma determinada proteína. Através deste raciocínio, conclui-se que a proteína identificada é a leucyl-tRNA synthetase que pertence à espécie *Syntrophus aciditrophicus*.

A análise por MALDI-TOF MS não permitiu uma identificação conclusiva das proteínas seleccionadas a partir do gel. Uma futura abordagem para resolução deste problema poderá ser a optimização do método separativo de electroforese através de estratégias de fraccionamento e deplecção das amostras de modo a reduzir a sua complexidade. Poderia, ainda optimizar-se a densidade do gel de modo a permitir uma melhor definição e separação das bandas correspondentes às proteínas em estudo.

Limitações do método MALDI-TOF

Uma das maiores limitações do método MALDI-TOF prende-se com a grande heterogeneidade de um proteoma, isto é, a complexidade do conjunto de proteínas. Por

outro lado, existem ainda também limitações na solubilização de proteínas membranares, de uma forma compatível com uma separação apropriada por eletroforese 1-D. Assim, quanto menor for a concentração de uma proteína, mais difícil é a sua visualização nos géis, quer devido aos limites dos métodos de detecção, quer devido à possível sobreposição de proteínas, que apresentem pesos moleculares e ponto isoeléctrico (pI) semelhantes.

Para além disso, trata-se de um método de acesso restrito e bastante caro, podendo actualmente não ser adequado como método de rotina.

5 – Conclusão

Neste trabalho foram comparados diferentes métodos para identificação de bactérias filamentosas presentes nas lamas da estação de tratamento de águas residuais de Santa Cruz e que são causadoras de fenómenos de *bulking*.

Todas as metodologias para identificação de microrganismos passam pelo isolamento das suas colónias visíveis até se atingir uma cultura quase pura, em placas de meio de cultura sólido. Um isolamento bem sucedido pode ser demorado e em alguns casos até mesmo impossível (Abelho, 2010). Esse aspecto constitui uma limitação muito relevante de todas as metodologias existentes e que torna extremamente importante o aparecimento de uma nova técnica ou metodologia, que seja mais fácil e principalmente menos demorada, por exemplo, na utilização corrente e praticamente imediata em ETAR.

No estudo realizado, não foi possível obter culturas puras, no entanto, procedeu-se à caracterização e a uma possível identificação dos microrganismos presentes, nomeadamente, observações microscópicas ao longo do estudo, colorações de Gram e hematoxilina & eosina e aplicação dos métodos API e MALDI-TOF.

Os resultados obtidos através de microscopia óptica, sem qualquer tipo de coloração da amostra bruta de lamas, mostraram a presença de diferentes tipos de microrganismos. Obtiveram-se também, para a mesma amostra, os mesmos resultados quando se procedeu à coloração com hematoxilina & eosina. No entanto, após o isolamento e crescimento microbiano no meio de cultura selectivo, na presença destes corantes, foi evidente a predominância de apenas dois tipos de microrganismos.

Os resultados obtidos após a aplicação da coloração de Gram, mostraram que os microrganismos presentes eram Gram negativos, uma vez que coraram de vermelho devido ao corante de contraste, a safranina.

Como já foi referido, dentro do tempo da realização do estudo não foi possível obter culturas puras de microrganismos para uma identificação precisa através dos métodos utilizados, nomeadamente, microscopia óptica, API e MALDI-TOF. Esta limitação do estudo realizado, poderá ser explicado pelo facto do meio de cultura não ter sido suficientemente selectivo.

Os resultados obtidos através da aplicação do kit API 20 E e posterior identificação do inerente código, através do programa *apiweb* revelaram a presença de três espécies do género *Serratia* e uma espécie do género *Enterobacter*. Contudo, quando se procedeu à aplicação do código ao programa *ABIS*, para o teste 1 e 3, os resultados foram ligeiramente diferentes e revelaram a presença de três espécies do género *Enterobacter* e uma espécie do género *Serratia* e para o teste 2, predominaram duas espécies do género *Serratia* e duas espécies do género *Enterobacter*. Deste modo, os resultados evidenciaram a presença de

apenas dois géneros: *Serratia* e *Enterobacter*, manifestando uma coerência entre estes programas, podendo, no entanto, haver diferenças ao nível da espécie. Para se obter resultados mais conclusivos ter-se-ia que proceder a testes complementares.

Desta forma, não foi possível identificar ao nível da espécie o organismo predominante na amostra. Este facto poderá estar relacionado com o meio de cultura escolhido e provavelmente também com o tempo, insuficiente, de incubação das galerias API (24h – tempo máximo aconselhado no protocolo Biomerieux).

Os resultados obtidos através do MALDI-TOF-MS, indicaram a presença de diferentes espécies/géneros através da identificação das proteínas, nomeadamente: a proteína EmbrB/QaCA family corresponde ao género *Serratia sp.*, a proteína Chitinase corresponde ao género *Enterobacter sp.*, a proteína lipid A export ATP-binding/permease protein MsbA corresponde à espécie *Peptostreptococcus anaerobius*, a proteína AMP-dependent synthetase and ligase corresponde ao género *Geobacter sp.*, a proteína ParB-like partition protein corresponde à espécie *Escherichia coli* e a proteína leucyl-tRNA synthetase corresponde à espécie *Syntrophus aciditrophicus*. Estas informações demonstram, mais uma vez, que não se obtiveram culturas puras, sendo essa a principal razão para a multiplicidade de resultados.

Contudo, este método, mostra que quanto maior o mascot score e quanto maior a cobertura da sequência e maior a correspondência de péptidos, então, maior será a probabilidade de identificação de uma determinada proteína. Através deste raciocínio, concluiu-se que a proteína identificada é a leucyl-tRNA synthetase que pertence à espécie *Syntrophus aciditrophicus*.

6 – Referências Bibliográficas

- Abelho, M. (2010). *Protocolos de Microbiologia Ambiental*. Trabalhos práticos de Biologia – módulo Microbiologia. Escola Superior Agrária de Coimbra.
- Al-Mutairi, N. Z. (2009). *Aerobic selectors in slaughterhouse activated sludge systems: A preliminary investigation*. *Bioresource Technology* 100: 50-58.
- Alkan, U., Eleren, S., Nalbur, B., Odabas, E. (2008). *Influence of the activated sludge system configuration on heavy metal toxicity reduction*. *World J. Microbiology Biotechnology* 24: 1435–1443.
- Amann, R., Fuchs, B. M., Behrens, S. (2001). *The identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridization*. *Environmental biotechnology* 12: 231–236.
- Beveridge, T.J., (1990). *Mechanism of Gram variability in select bacteria*. *Journal of Bacteriology* 172: 1609 –1620.
- Bott, C. B., & Love, N. G. (2002). *Investigating a mechanistic cause for activated sludge deflocculation in response to shock loads of toxic electrophilic chemicals*. *Water Environmental Research*, 74 (3), 306-315.
- Busse, H., Denner, E. B. M., e Lubitz, W. (1996). “*Classification and identification of bacteria: current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematics,*” *Journal of Biotechnology* 47, no. 1: 3-38.
- Capelo, J.L., Carreira, R., Diniz, M., Fernandes, L., Galesio, M., Lodeiro, C. (2009). *Overview on modern approaches to speed up protein identification workflows relying on enzymatic cleavage and mass spectrometry-based techniques*. *Analytica Chimica Acta* 650: 151–159.
- Caravelli, A., Giannuzzi, L., & Zaritzky, N. (2004). *Effect of chlorine on filamentous microorganisms present in activated sludge as evaluated by respirometry and INT-dehydrogenase activity*. *Water Research* 38: 2395-2405.
- Casey, T. (1993). *Unit treatment processes in water and wastewater engineering*. Wiley.
- Cha, D. K., Jenkins, D., Lewis, W. P., Kido, W. H. (1992). *Process control factors influencing Nocardia populations in activated sludge*. *Water Environmental Research*, 64, 37.
- Coico, R., (1997). *Current Protocols in Immunology, Gram Staining*. Apêndice 30, A.30.1-A.30.2, Suplemento 23, John Wiley & Sons Inc, New York.

- Dabert, P., Fleura-Lessard, A., Mounier, E., Delgenes, J.P., Moletta, R., Godon, J.J. (2001). *Monitoring of the microbial community of a sequencing batch reactor bioaugmented to improve its phosphorus removal capabilities*. Water Science and Technology 43, 1–8.
- Daneshvar, N., Niaei, A., Akbari, S., Aber, S., Kazemian, N. (2007). *Photocatalytic Disinfection of Water Polluted by Pseudomonas Aeruginosa*. Global NEST Journal. Vol 9, No 2, 132-136.
- Dinçer, Ali R., Kargi, Fikret. (2000). *Kinetics of sequential nitrification and denitrification processes*. Enzyme and Microbial Technology 27, no. 1-2: 37-42.
- Eckenfelder, W. W., Ford, D. L., Lankford, P. W., Shell, G., & Sullivan, D. L. (1986). *Operation, control and management of activated sludge plants treating industrial wastewaters*. Vanderbilt University School of Engineering, Nashville, Tennessee.
- Eckenfelder, W. W., Musterman, J. L. (1995). *Activated sludge treatment of industrial wastewater*. Technomic Publishing Company, Inc.
- Eikelboom, D. H. (2000). *Process control of activated sludge plants by microscopic investigation*. IWA publishing.
- Fernades, I. (2009). *Aplicação de compósitos de TiO₂ em carvão ativado na fotodegradação do fenol com luz ultravioleta*. Faculdade de Ciências e Tecnologia. Universidade Nova de Lisboa.
- Flores-Alsina, X., Comas, J., Rodriguez-Roda, I., Gernaey, K.V., Rosen, C. (2009). *Including the effects of filamentous bulking sludge during the simulation of wastewater treatment plants using a risk assessment model*. Water Research 43: 4527-4538.
- Gray, N. F. (2004). *Biology of wastewater treatment second edition*. Imperial College Press.
- Grijpspeerdt, K., Verstraete, w. (1997). *Image analysis to estimate the Settleability and concentration of activated sludge*. Water Research 31, no. 5: 1126-1134.
- Guerrera, I. C., Kleiner, O. (2005). *Application of Mass Spectrometry in Proteomics*. Bioscience Reports, Vol. 25: 71-93.
- Higgins, M. J., & NovaK, J. T. (1997). *Dewatering and Settling of activated sludges: the case for using cation analysis*. Water Environmente Research , 69 (2), 225-232.
- Hillenkamp, F., Peter-Katalinic. J., (2007). *MALDI MS - A Practical Guide to Instrumentation, Methods and Applications*. Wiley VCH.

- Hoffmann, M.R., Martin, S.T., Choi, W., Bahnemann, D.W. (1995). *Environmental applications of semiconductor photocatalysis*. Chem. Rev. 95, 69-96.
- Huang, Z., Maness, P-C., Blake, D. M., Wolfrum, E. J., Smolinski, S. L. (1999). *Bactericidal mode of titanium dioxide photocatalysis*. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 1-29.
- Jenkins, D., Richard, M. G., & Daigger, G. T. (2004). *Manual on the causes and control of activated sludge bulking, foaming, and others solids separation problems*. Londres: Lewis Publishers.
- Juang, D. F., Morgan, J. M. (2001). *The applicability of the API 20E and API Rapid NFT systems for the identification of bacteria from activated sludge*. Electronic Journal of Biotechnology. Vol.4 No.1: 18-24.
- Kampfer, P., Welting, D., Hoffmeister, D., & Dott, W. (1995). *Growth requirements of filamentous bacteria isolated from bulking and scumming sludge*. Water Research , 29 (6), 1585-1588.
- Lay, J.O. (2001). *MALDI-TOF Mass spectrometry of bacteria*, Mass Spectrom. Rev. 20, 172-194.
- Lewis, J. K., Wei, J., Siuzdak, G. (2000). *Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry in peptide and protein analysis*. Encyclopedia of Analytical Chemistry, 5880-5894.
- Lillie RD, (1977). *The Gram Stain. A quick method for staining gram positive organisms in tissue*. Archs.Path., V5 p828-834.
- Lopes, A. M., & Fonseca, Á. (1996). *Biologia Microbiana*. Universidade Aberta.
- Mann, M., Hendrickson, R., Pandey, A. (2001). *Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry*. Annu. Rev. Biochem. 70: 437–73.
- Manser, R., Muche, K., Gujer, W., Siegrist, H. (2005). "A rapid method to quantify nitrifiers in activated sludge." Water Research 39, no. 8: 1585-1593.
- Marques, C. B. (2009). *Fotocatálise solar para tratamento de águas de captação*. Faculdade de Ciências e Tecnologia. Universidade Nova de Lisboa.
- Martins, A. M., Pagilla, K., Heijnen, J. J., & Loosdrecht, M. (2004). *Filamentous bulking sludge - a critical review*. Water Research 38: 793-817.

MetCalf e Eddy, I. (2003). *Wastewater engineering: treatment and reuse 4ª Edição*. McGraw-Hill Higher.

Nogueira, R. F. P., Jardim, W. F. (1998). *A Fotocatálise Heterogénea e sua aplicação ambiental*. Instituto de Química. UNICAMP vol 21: 69-72.

Oliveira, J. S. (1982). *Operações e processos fundamentais em engenharia sanitária. Fundamentos da depuração biológica*. Faculdade de Ciências e Tecnologia. Universidade Nova de Lisboa.

Pandolfi, D. & Pons, Marie-Noelle. (2004). *Gram-staining characterisation of activated sludge filamentous bacteria by automated colour analysis*. Biotechnology Letters 26: 1841–1846.

Paolo Madoni e Donatella Davoli, (1997). "Testing the control of filamentous microorganisms responsible for foaming in a full-scale activated-sludge plant running with initial aerobic or anoxic contact zones," *Bioresource Technology* 60, no. 1: 43-49.

Pernemalm, M. (2009). *Cancer proteomics: Method development for mass spectrometry based analysis of clinical materials*. Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden.

Raimundo, M., (2009). *Protocolos da disciplina de Laboratórios de Operações Unitárias em Engenharia Sanitária - DCEA*, Faculdade de Ciências e Tecnologias, Universidade Nova de Lisboa.

Richard, M., Brown, S., & Collins, F. (2003). *ACTIVATED SLUDGE MICROBIOLOGY PROBLEMS AND THEIR CONTROL*. Buffalo, NY, 20th Annual USEPA National Operator Trainers Conference.

Saida, H., Maekawa, T., Satake, T., Higashi, Y., Seki, H. (2000). *Gram stain index of a natural bacterial community at a nutrient gradient in the freshwater environment*. Environmental Pollution 109, no. 2: 293-301.

Sanders, W. E., Sanders C. C. (1997). *Enterobacter spp.: Pathogens Poised To Flourish at the Turn of the Century*. Clinical Microbiology Reviews p. 220–241.

Santana, F., Amaral, L., & Maurício, R. (2009). *Técnicas de Drenagem e Tratamento de Águas Residuais*. Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

Santos, H. M., Diniz, M. S., Costa, P. M., Peres, I., Costa, M. H., Alves, S., Capelo, J. L. (2007). *Toxicological effects and bioaccumulation in the freshwater clam (Corbicula fluminea) following exposure to trivalent arsenic*. Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

- Saraiva, I. *Tecnologia - Processos de Tratamento de Efluentes*. Ambiente AIP.
- Sardinha, J. (2009). *Tratamento biológico de águas residuais, Sistemas de Tratamento de Águas e Efluentes*. Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., and Mann, M. (1996). *Mass spectrometric sequencing of proteins from silver stained polyacrylamide gels*. Anal. Chem. 68, 850-858.
- Steen, H. & Mann, M. (2004). *The abc's (and xyz's) of peptide sequencing*. Nature Reviews Molecular Cell Biology 5, 699–711.
- Silva, S. A., & Mara, D. D. (1979). *Tratamentos biológicos de águas residuárias: lagoas de estabilização*. ABES.
- Su, M., Cha, D.K., Anderson, P.R. (1995). *Influence of selector technology on heavy metal removal by activated sludge: secondary effects of selector technology*. Water Research 29, no. 3: 971-976.
- Tracy, K. D., Adams, M. E., Flammino, A. (1986). Control of activated sludge settling characteristics with anaerobic selectors. Proc. 59th Annu. Conf. Water Pollut. Control Fed. Los Angeles.
- Trauger, S. A., Webb, W., Siuzdak, G. (2002). "Peptide and protein analysis with mass spectrometry." Spectroscopy 16: 15-28.
- Truu, J. et al., (1999). "Comparison of API 20NE and Biolog GN identification systems assessed by techniques of multivariate analyses," Journal of Microbiological Methods 36, no. 3: 193-201.
- Tsang, Y. F. (2008). Nocardia foaming control in activated sludge process treating domestic wastewater. Bioresource Technology 99: 3381–3388.
- Vasconcelos, F.F., Menezes, E.A., Cunha, F.A., Salviano, N. C., Ângelo, M. R. F., Oliveira, I. N.R. (2006). *Perfil de resistência da bactéria da espécie Serratia marcescens isolada de infecções hospitalares no Hospital Geral de Fortaleza*. RBAC, vol. 38(1): 35-37.
- Vesilind, P. A. (2003). *Wastewater treatment plant design*. Water Environment Federation.
- wanner, J. (1994). *Activated sludge bulking and foaming control*. Technomic Publishing Company, Lancaster.
- Xie, B., Dai, X. C., & Xu, Y. T. (2007). *Cause and pre-alarm control of bulking and foaming by Microthrix parvicella - A case study in triple oxidation ditch at wastewater treatment plant*. Journal of Hazardous Materials , 143 (1-2), 184-191.

Wastewater Organisms Database, Victor Santa Cruz Productions, Perris, California, USA.

<http://www.biomerieux.pt/servlet/srt/bio/portugal/home>