

Utilização do Processamento Digital de Imagens no Monitoramento de Estações de Tratamento de Efluentes

Maurício A. da Motta Sobrinho¹, Marie-Noelle Pons², Valdinete Lins da Silva¹, Aline Clemente de Andrade¹; Antônio Luis Amaral³; Eugênio C. Ferreira³

¹ Universidade Federal de Pernambuco – Depto. de Engenharia Química

Av Prof. Arthur de Sá, s/n – 50.740-521- Recife – PE - E-mail: mottas@ufpe.br

² École Nationale des Industries Chimiques – Laboratoire des Sciences du Génie Chimique
1, Rue Grandville – 54 001- BP 451 – Nancy – France

³ Centro de Engenharia Biológica - IBQF, Universidade do Minho, 4710-057 Braga, Portugal

RESUMO

Neste trabalho é proposto um procedimento para reconhecimento semi-automático das espécies de protozoários por análise de imagem. Este programa (ProtoRec v.2) foi em seguida utilizado para estudar a evolução da microfauna durante períodos de transição (paragem e arranque da estação). Os resultados obtidos foram satisfatórios em relação ao reconhecimento das espécies pelo programa e o acompanhamento da estação permitiu-nos verificar a degradação e envelhecimento da lama e o aparecimento de protozoários que evidenciam tal fato.

INTRODUÇÃO

No tanque de arejamento de uma estação de tratamento de efluentes por lodo ativados, as bactérias aglomeram-se geralmente sob a forma de flocos bacterianos. Em torno destes flocos e no seio do líquido, além das bactérias livres encontram-se protozoários e metazoários. Estes grupos possuem relações de predação, competição e canibalismo (Canler et al., 1999). A presença dos protozoários é fundamental para o bom desempenho da estação. Além de reduzirem a turbidez do efluente final, estimulam o crescimento bacteriano, promovem a floculação e algumas espécies eliminam a poluição (Gerardi et al., 1995; Curds et al., 1968).

Depois das bactérias, os protozoários são os microorganismos mais importantes numa estação de tratamento de esgotos (ETE). A sua sensibilidade às variações das condições do meio (concentração do substrato e do oxigênio dissolvido, presença de tóxicos, etc.), tornam-nos excelentes indicadores do estado da ETAR (Degrémont, 1989).

A importância da presença dos protozoários, na sua maior parte bacteriófagos, reside nos seguintes factos: alimentando-se das bactérias livres, reduzem a turbidez do líquido interfacial e conseqüentemente a Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) e percentagem de matéria seca (MS) do efluente final; reduzem a quantidade de bactérias patogênicas (50% de redução na ausência de protozoários e 95% na presença deles, segundo Gerardi et al., 1995); seu regime bacteriófago estimula o crescimento bacteriano e o desenvolvimento de novos flocos de lodo ativados. Um último ponto, um pouco controverso, é que os protozoários podem eliminar a poluição (matéria orgânica).

De uma maneira simplista, podemos classificar os protozoários em flagelados, ciliados e amebas. Os ciliados, presentes em concentrações mais elevadas, podem ser classificados segundo o seu regime alimentar em bacteriófagos e carnívoros. Os bacteriófagos, segundo a sua mobilidade são agrupados em nadadores, móveis de fundo e sésseis.

Vários autores realizaram estudos para identificar as diferentes espécies de ciliados presentes (Curds et Cockburn, 1970a; Sasahara et Ogawa, 1983), assim como estabelecer relações entre os desempenhos das instalações e a presença e abundância de uma certa espécie de protozoário (Curds e Cockburn, 1970b; Madoni, 1994a; Nicolau e al., 1997). A Tabela 1 apresenta uma relação entre o grupo de protozoários dominante e a eficiência biológica da estação, assim como possíveis causas para o mau funcionamento.

Tabela 1 - Algumas situações particulares no funcionamento de uma ETE por lodo ativados (Madoni, 1994a)

Grupo Dominante	Eficiência	Causa possível
Pequenos flagelados	má	Lamas pouco oxigenadas; carga muito forte; entrada de substancias fermentescíveis.
Pequenos ciliados nadadores (< 50 µm)	mediocre	Tempo de contacto muito fraco; lamas pouco oxigenadas.
Grandes ciliados nadadores (> 50 µm)	mediocre	Carga muito forte.
Ciliados móveis de fundo	boa	
Ciliados sésseis + ciliados móveis de fundo	boa	
Ciliados sésseis	em baixa	Fenómenos transitórios (carga descontínua; extracção recente de lamas).
Pequenas amebas nuas e flagelados	má	Carga muito elevada não facilmente biodegradável.
Amebas com teca	boa	Carga baixa; licor diluído; boa nitrificação.

A colonização das lamas inicia-se com as bactérias, flagelados e ciliados nadadores livres, que vêm geralmente com o esgoto a ser tratado. Em seguida, à medida que a idade das lodo ativados aumenta, os ciliados móveis de fundo seguidos dos ciliados sésseis (fixos) começam a instalar-se. Salienta-se ainda que os móveis de fundo e principalmente os ciliados sésseis retornam pelo canal de recirculação enquanto que os nadadores livres e os flagelados podem sair junto com o efluente final. A redução das bactérias deve-se sobretudo ao regime alimentar bacteriófago dos protozoários. A figura 1 mostra a evolução dos microorganismos em função da idade das lamas.

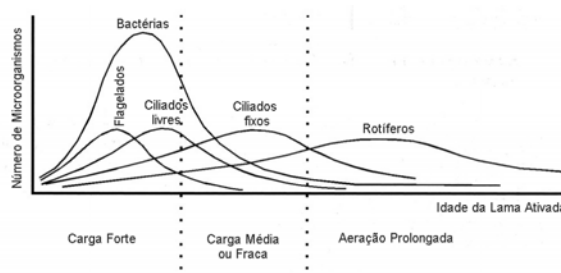


Figura 1 - Evolução dos grupos de microorganismos em função do avanço do lodo (Canler et al., 1999).

O índice biótico de lamas (sludge biotic index - SBI), proposto por Madoni (1994b), avalia a sensibilidade do ecossistema da estação baseado nas condições físicas, químicas e operacionais da mesma. Este método é baseado ao mesmo tempo nas diferentes sensibilidades demonstradas por cada grupo em relação aos parâmetros físico-químicos e operacionais e na abundância e diversidade da microfauna. Este método exige uma identificação, contagem e classificação dos protozoários.

Para a identificação destas espécies, faz-se geralmente uma observação visual e contagem manual das espécies presentes. Este procedimento exige tempo e um técnico com conhecimentos em microbiologia. A fim de otimizar o tempo e identificação das espécies

foi desenvolvido um programa (ProtoRec) em ambiente Visilog que identifica as espécies presentes a partir de parâmetros morfológicos (Amaral et al., 1999; Da Motta et al, 2001).

MATERIAIS E MÉTODOS

As amostras de lama foram recolhidas no tanque de arejamento da ETAR de Braga. Uma gota da amostra é posta numa lâmina e a aquisição é realizada em estado fresco (sem adição de corantes ou outros produtos). De cada amostra foram recolhidas 50 imagens de protozoários com iluminação simples e direta.

O sistema de aquisição de imagem é formado por um microscópio de epifluorescência Axioskop (Zeiss, Oberkochen), sobre o qual é conectada uma câmara CCD AVC D5CE (Sony, Tokyo). O sinal é tratado por um adaptador CMA-D5CE (Sony, Tokyo) para em seguida ser digitalizado num computador graças a uma placa de aquisição Meteor 2 (Matrox, Dorval).

A Figura 2 mostra algumas das etapas do tratamento de imagem pelo programa ProtoRec v.2. A partir da imagem inicial em 256 tons de cinzento, realiza-se um pré-tratamento para realçar os contornos dos protozoários. Em seguida traçam-se as zonas de interesse (onde se encontram os protozoários) e binariza-se a imagem. O resíduo em torno do protozoário é eliminado e por fim cada um é etiquetado e os seus parâmetros de forma são calculados. Através de uma base de dados de varias espécies, pode-se então identificar o protozoário.

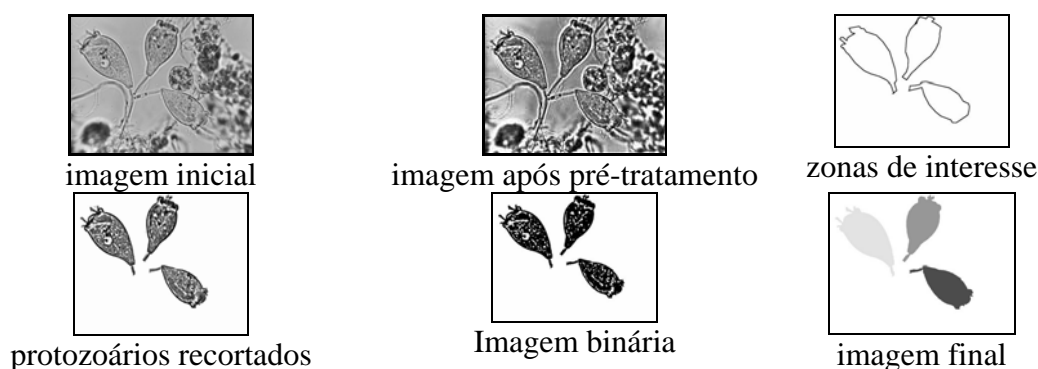


Figura 2 - Etapas do programa ProtoRec v2.0

RESULTADOS

Durante o Inverno de 2000-2001, a cidade de Braga (Pt) registou uma elevada pluviosidade devido às fortes chuvas que se verificaram na região do Minho. Tal fato causou vários problemas à ETAR, que teve que parar várias vezes. Como causas principais temos o elevado caudal e a entrada de areia que obriga a realizar paragens para limpeza. Foi realizado um acompanhamento iniciado na segunda-feira 19/03/01, quando a estação funcionava normalmente. No dia 20/03 ocorreu a paragem "nível 1", onde a alimentação foi cortada mas continuou-se a arejar e a recircular a lama entre o tanque de arejamento e o clarificador. O acompanhamento prosseguiu até segunda-feira 26/03/01, em que se verificou uma paragem da recirculação e na terça-feira ocorreu a parada do arejamento.

Os resultados obtidos deste acompanhamento serão divididos em duas partes: na primeira parte será analisada de maneira manual a microfauna e as informações obtidas a partir das espécies e grupos dominantes e numa segunda parte a avaliação do reconhecimento automático das espécies por análise de imagem através do programa ProtoRec v.2.

Análise Manual

Ao observar-se a evolução dos grupos de protozoários e dos metazoários (Figura 3), nota-se o envelhecimento da lama em conformidade com a figura 2. Inicialmente observa-se uma redução dos ciliados nadadores (*Trachelophyllum*), que deixam de entrar na estação, vindo do esgoto, e continuam a sair pelo clarificador.

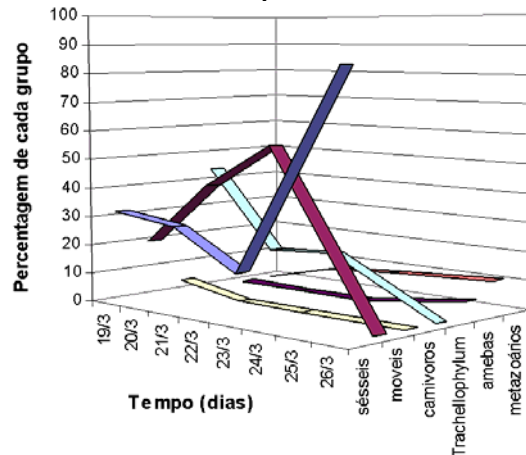


Figura 3 - Evolução dos grupos de protozoários e dos metazoários em função do tempo.

Esta fase é seguida do aumento dos móveis de fundo, que se alimentam das bactérias que estão na superfície dos flocos. Com a redução do substrato as bactérias começam a morrer e esta fonte tende a esgotar-se, ocasionando o declínio desta espécie.

Os ciliados sésseis, que inicialmente tinham decaído em número voltam a aumentar. Este aumento deve-se sobretudo à presença de *Opercularias*, que são resistentes a condições de estresse tais como a limitação de oxigénio ou nutrientes. Esta passagem da predominância dos móveis para os sésseis mostra, segundo a tabela 1, uma queda no desempenho da estação. Podemos tirar uma primeira conclusão de que até três dias, mantendo-se o arejamento e a recirculação a estação poderia reiniciar em boas condições.

Partindo-se para uma análise por espécie dominante, Figura 4, o primeiro facto que nos vem à vista é a redução na diversidade da microfauna. Inicialmente tínhamos 11 espécies diferentes no tanque de arejamento e após uma semana encontramos apenas 5.

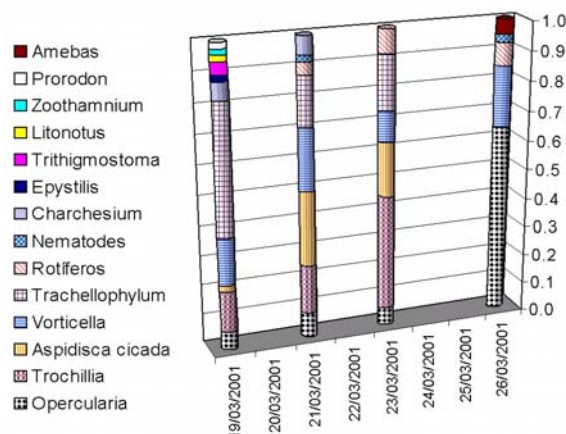


Figura 4 - Evolução das espécies de protozoários e metazoários em função do tempo

Inicialmente tem-se uma forte predominância do *Trachelophyllum* com cerca de 45%. Este nutre-se de bactérias e pequenos flagelados e está presente em qualquer domínio de carga. Canler et al. (1999) cita que quanta mais elevada for a carga, maior será a sua

concentração e no caso de ser a espécie dominante, estará correlacionado com um depuração medíocre e será indicador de fenómenos transitórios, como por exemplo uma sobrecarga.

No terceiro dia de análise encontramos o domínio da *Trochilia* que é um indicador de uma boa qualidade de efluente e está presente em estações onde o processo de instalação já está instalado (Canler et al., 1999). Ela pode assim indicar o processo de catabolismo, onde as bactérias vão consumir suas reservas energéticas, liberando sais minerais, entre os quais os nitratos.

Por fim encontramos uma forte predominância das *Opercularias*. Este protozoário é resistente a condições de estresse tais como a presença de certos tóxicos (sais, metais pesados, etc.), acidez e deficit de oxigenação. Sua presença esta associada a rendimentos de medíocres a bom e a efluentes tratados com uma concentração importante em NH_4^+ . Podemos assim confirmar a redução na qualidade depuratória da microfauna após 6 dias sem alimentação. A presença do NH_4^+ deve-se provavelmente aos sais libertados durante o catabolismo.

Reconhecimento das espécies com ProtoRec v.2

A classificação dos protozoários faz-se segundo uma árvore de decisão. Separa-se inicialmente os ciliados sésseis (que possuem um pedúnculo), com e sem mionema (músculo responsável pela contração localizado no interior do pedúnculo de alguns protozoários), dos protozoários móveis.

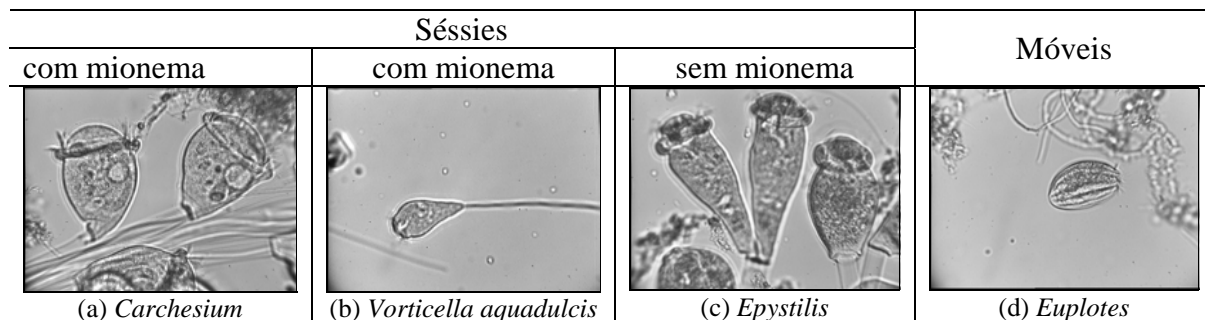


Figura 5 - Alguns protozoários comuns em lodo ativados

Os protozoários ciliados sésseis com mionema estudados são: *Carchesium* (fig. 5a), *Vorticella aquadulcis* (fig. 5b), *Vorticella convallaria*, *Vorticella microstoma* e *Zoothamnium*. Os sésseis sem mionema considerados foram: *Epistylis* (fig 5c) e *Opercularia*. Os ciliados móveis, que não possuem pedúnculo são : *Aspidisca cicada*, *Trachelophyllum*, *Litonotus* (um carnívoro que se alimenta de outros protozoários como as *Vorticellas*), *Trithigmotoma* e *Euplotes* (fig. 5d).

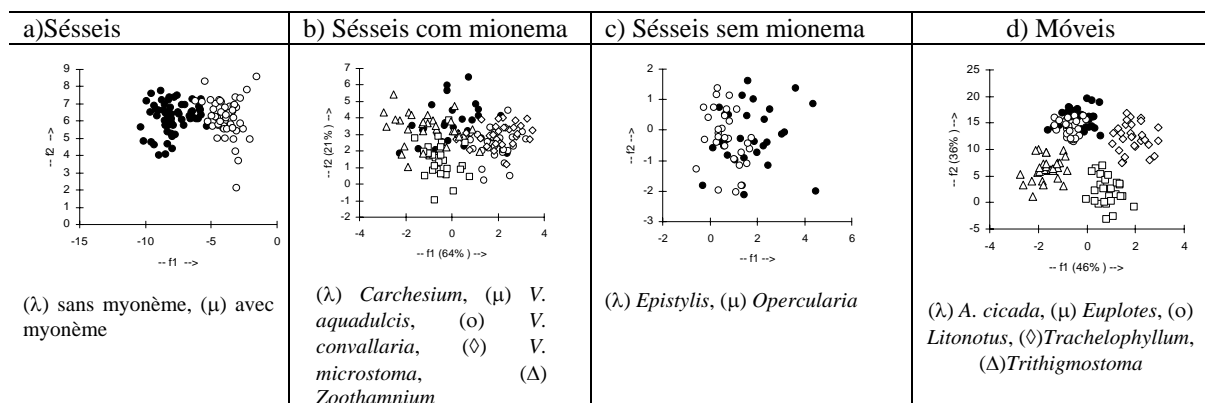


Figura 6- Posição nos planos f_1 - f_2 das diferentes espécies de protozoários

Os protozoários sésseis são em seguida classificados em função da presença de uma mionema. A Figura 6a mostra a boa separação entre os sésseis com e sem mionema. Entretanto, a distinção entre as várias espécies de sésseis com mionema, figura 6b, é mais delicada e reflete as dificuldades encontradas quando da identificação visual.

As duas espécies de sésseis sem mionema são relativamente bem separadas, Figura 6c. Em relação aos móveis, Figura 6d, o problema de separação entre o *Euplotes* e a *A. cicada* não é observado quando utilizamos o plano f_1-f_3 , no qual estes protozoários estão bem separados.

A Tabela 2 indica o índice de reconhecimento obtido durante a fase de validação durante a qual foram classificados 30 indivíduos de cada espécie, que não participaram na fase de aprendizagem. A qualidade do reconhecimento foi quantificada segundo o seu grau em: boa (> 70%), de razoável (entre 50 e 70%), de fraca (entre 30 e 50%) e de má (abaixo de 30%).

Tabela 2 : Qualidade e grau de reconhecimento segundo o protozoário durante a fase de validação
(+ = boa depuração, - = depuração medíocre).

Tipo de protozoário	Qualidade do reconhecimento	Taxa de reconhecimento (%)	Qualidade do tratamento de depuração
Móveis	Boa	81	
Sésseis favoráveis	Boa	77	+
<i>Trithigmotoma</i>	Boa	73	+
<i>Litonotus</i>	Boa	92	
<i>Trachelophyllum</i>	Boa	77	-
<i>Epistylis</i>	Boa	70	+
<i>Opercularia</i>	Razoável	60	-
<i>V. convallaria</i>	Má	20	-
<i>V. microstoma</i>	Fraca	33	-

Os sésseis que encontramos quando a qualidade do tratamento é boa são o *Carchesium* e *Zoothamnium*. De uma maneira geral o índice de reconhecimento foi bom. Os maiores problemas estão ligados ao isolamento das espécies de *Vorticella*. Entretanto, não se considerando a separação das várias espécies, que mesmo para um especialista é difícil podemos considerar a identificação da classe *Vorticella* como razoável.

Algumas espécies de protozoários são indicadores de uma boa qualidade de depuração, outros não fornecem nenhuma informação. A principal preocupação é de identificar os indicadores de mau funcionamento e que possam dar um indicio do problema responsável pelo mesmo.

Dentre as espécies que indicam um bom estado, o *Carchesium* (índice de reconhecimento de 37%), *Vorticella aquadulcis* (53%) e *Zoothamnium* (67%) são os que apresentam maior dificuldade de identificação.

Em relação aos móveis, o índice de reconhecimento é superior a 70% para a *Aspidisca cicada* e para o *Euplotes*.

Até o momento o programa ProtoRec v.2 estava limitado aos protozoários ciliados. Durante o acompanhamento da estação de Braga foi encontrada uma nova espécie, a *Trochillia*, que está sendo incluída na nova versão do ProtoRec, assim como serão incluídas algumas amebas com tecas e de metazoários, indicadores da idade de lodo ativado.

CONCLUSÕES

Uma nova metodologia para a identificação semi-automática de protozoários ciliados presentes em estações de tratamento de efluentes por lodo ativados foi implementada a partir de trabalhos anteriores (Amaral et al., 1999; Da Motta et al., 2001). Após aquisição das imagens, o programa ProtoRec faz um pré-tratamento e pede que sejam demarcadas as áreas onde se encontram os protozoários. Em seguida, baseado na silhueta do protozoário calcula 10 parâmetros de forma que irão caracteriza-lo. A classificação é realizada em duas etapas, nas quais o utilizador do programa irá realizar apenas a segunda pois as informações da primeira farão parte do banco de dados do programa. Para a realização de cada etapa foi utilizada a análise factorial discriminante. O índice de médio de reconhecimento foi de aproximadamente 70%, quando não consideradas as *Vorticellas*.

Ao realizar a análise da lama activada de Braga foi observada uma nova espécie de ciliado, a *Trochillia*, que deverá ser introduzida em breve no ProtoRec. As informações fornecidas pelos metazoários e amebas poderão fornecer mais informações sobre o estado biológico da estação, devendo portanto serem incluídas na versão 3 do programa.

Em relação ao acompanhamento da estação, pudemos verificar que até três dias de paragem não compromete o estado da microfauna (em termos de rendimento biológico), porém, a partir de seis dias vê-se claramente a degradação do mesmo. Além da inclusão de novos microorganismos, prevê-se ainda para a nova versão de ProtoRec a introdução de novos parâmetros a fim de obter uma melhor separação e identificação das espécies na fase de tratamento estatístico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amaral A.L., Baptiste C., Pons M.N., Nicolau A., Lima N., Ferreira E.C., Mota M., Vivier H., (1999) Semi-automated recognition of protozoa by image analysis, *Biotechnology Techniques*, **13**, 111-118.
- Canler J.-P., Perret J.-M., Duchène P., Cotteux E. (1999) Aide au diagnostic des stations d'épuration par l'observation microscopique des boues activées, Cemagref Editions, Paris.
- Curds C.R. (1992). *Protozoa in the water industry*, Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- Curds C.R., Cockburn A., Vandike J.M. (1968) An experimental study of the role of the ciliated protozoa in the activated-sludge process, *Water Pollution Control*, **67**, 312-329
- Curds C.R., Cockburn A. (1970a) Protozoa in biological sewage-treatment process : I. a survey of the protozoan fauna of British percolating filters and activated-sludge plants, *Water Research*, **4**, 225-236.
- Curds C.R., Cockburn A. (1970b) Protozoa in biological sewage-treatment process – II. protozoa as indicator in the activated-sludge process, *Water Research*, **4**, 237-249.
- Gerardi M.H., Horsfall F.L., et al. (1995) *Wastewater Biology: The microlife*, A Special Publication, Water Environment Federation, Virginie.
- Da Motta M., Pons M.-N., Vivier H., Amaral A. L., Ferreira E. C., Roche N., Mota M. (2001) Study of protozoa population in wastewater treatment plants by image analysis, *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, **18** (1), 103 -111
- Einax J.W., Zwanziger H.W., Geiss S., (1997) *Chemometrics in environmental analysis*, VCH-Wiley, Weinheim
- Degrémont (1989) *Mémento Technique de L'eau*, Vol. 1, Lavoisier, Paris.
- Madoni P. (1994a) La microfaune nell'analisi di qualità biologica dei fanghi attivi, AGAC di Reggio Emilia - Università degli Studi di Parma, Parma.
- Madoni P. (1994b) A Sludge Biotic Index (SBI) for the evaluation of the biological performance of activated sludge plants based on the microfauna analysis, *Water Research*, **28** (1), 67-75.
- Madoni P., Atlante Fotografico “ Guida all'analisi microscopica del fango attivo ”, AGAC – Regio Emilia, Università degli Studi di Parma (1996).
- Nicolau A., Lima N., Mota M., Madoni P. (1997) Os protozoários como indicadores da qualidade biológica de lodo ativados, *Boletim de Biotecnologia*, **56**, 14-19.
- Pons M.N., Vivier H., Dodds J.A. (1997) Particle shape characterization using morphological descriptors, *Part. Part. Syst. Charact.*, **14**, 272-277.
- Russ J.C. (1995). *The image processing handbook*. 2^e édition, CRC Press, Boca Raton
- Sasahara T., Ogawa T. (1983) Treatment of brewery effluent. part IV: protozoa and metazoa found in activated sludge process for brewery effluent, *Monatsschrift für Brauwissenschaft*, **11**, 433-448.