

**Identificação de Bactérias Filamentosas em Processos de Lamas Activadas
através da Técnica de Hibridização *in-situ* de Fluorescência (FISH)**

Ângela Alexandra Valente Abreu

**Dissertação para Mestrado em Tecnologia do Ambiente
na Universidade do Minho**

**Universidade do Minho
Escola de Engenharia
Departamento de Engenharia Biológica**

2004

Tese realizada sob a orientação de:

Maria Madalena dos Santos Alves

Professora Auxiliar

Co-orientação de:

Ana Paula Rodrigues da Cunha Nicolau

Estudante de Pós Doutorado

Agradecimentos

O presente trabalho não teria sido possível sem a ajuda de várias pessoas, que de diferentes formas contribuíram para a realização do mesmo.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer ao Departamento de Engenharia Biológica, da Universidade do Minho, e às pessoas que o compõem, pelas boas condições que me disponibilizaram. Agradeço à minha orientadora, Doutora Madalena Alves, pela sua orientação científica, disponibilidade e pela amizade com que sempre me presenteou. À co-orientadora, Doutora Ana Nicolau, pela sua orientação científica, disponibilidade, e por me ter inculcido o gosto pela identificação de bactérias filamentosas e protozoários.

Agradeço também aos meus colegas do laboratório de Biotecnologia Ambiental, à Lúcia, Olga e Luís, pelo bom ambiente de trabalho e camaradagem proporcionados. Um agradecimento especial ao Pablo, pela sua ajuda na parte informática, e à Alcina, por me ter acompanhado nos primeiros passos na técnica de FISH. Agradeço também às colegas do laboratório de Ecologia e Microbiologia Molecular, à Vera e Brigitte, pelo bom ambiente de trabalho e camaradagem, e pelos bons momentos de descontração vividos durante os longos períodos de espera das hibridizações.

Aos meus colegas de mestrado e amigos, à Diana, Fernando e Rui, pelos bons momentos vividos durante os trabalhos de grupo, e não só... Ao Nuno, pela sua ajuda, amizade, paciência, e grande incentivo. Finalmente agradeço à minha família, em especial aos meus pais e irmã, pelo carinho e incentivo.

Sumário

O presente trabalho incidiu na aplicação de técnicas moleculares na monitorização da biodiversidade microbiológica num processo de lamas activadas, de uma estação municipal de tratamento de águas residuais (ETAR). A técnica molecular de hibridização *in situ* de fluorescência (FISH) foi optimizada para a identificação de algumas bactérias filamentosas, causadoras de “bulking” e “foaming”. A informação obtida a partir da técnica de FISH foi comparada com as técnicas clássicas de identificação, baseadas em descrições morfológicas e resposta a colorações de Gram e Neisser. Foram avaliadas as limitações inerentes a cada uma das técnicas com vista à sua potencial aplicação de uma forma rotineira em ETAR's. Os dados de operação da ETAR foram relacionados com a biodiversidade microbiana e calculou-se o Índice Biológico de Lamas (IBL), de forma a complementar a informação a nível da actividade biológica e eficácia depuradora da ETAR.

As técnicas clássicas baseadas nas colorações revelaram-se de fácil aplicação e de rápida implementação, apesar das limitações encontradas, a nível da subjectividade da observação e das variações de reacção à coloração originadas pelos factores ambientais inerentes. Para além das limitações referidas anteriormente, existem também algumas imprecisões nos manuais de identificação, verificando-se que estes diferem em alguns casos de autor para autor.

A técnica de hibridização *in situ* de fluorescência permitiu a identificação de bactérias filamentosas num ambiente complexo, como o caso das lamas activadas, apesar de algumas dificuldades sentidas. A principal teve a ver com a escolha das sondas e com a optimização das condições de hibridização específicas para cada sonda. Inicialmente foram testadas cinco sondas: HHY, GOR0596, MPA645, CHL1851, EUB338 específicas respectivamente das bactérias *Haliscomenobacter hydrossis*, *Gordona*, *Microthrix parvicella*, Tipo 1851 e maior parte do domínio bactéria. Mais tarde, devido à ausência de resultados com a sonda GOR0596, foi testada uma nova sonda (MNP1), específica para a maior parte dos Nocardioformes. A utilização da MPA645 não permitiu a visualização dos filamentos de *Microthrix parvicella*, mesmo depois de aumentada a permeabilidade das células através de pré-tratamentos com lisozima e mutanolisina. Isto sugere que esta sonda não é indicada para a identificação da *Microthrix parvicella* existente nas amostras analisadas. Existem outras sondas nomeadamente: a MPA60, MPA223 e MPA650 específicas para *Microthrix parvicella*, que em trabalhos futuros poderão ser testadas separadamente ou mesmo em conjunto. A sonda CHL1851 também não permitiu a identificação da bactéria Tipo 1851. Dado que actualmente esta é a única sonda para este tipo bacteriano, não foi possível concluir acerca da sua presença nas amostras analisadas.

Outro aspecto limitante teve a ver com a qualidade das imagens adquiridas, o que possivelmente teve origem na potência da fonte de luz do microscópio de fluorescência que não era a adequada.

De uma forma geral muito trabalho necessita ainda de ser desenvolvido a nível da identificação e classificação filogenética das bactérias filamentosas, de forma a permitir o desenvolvimento de novas sondas mais específicas. Do ponto de vista prático conclui-se que a técnica de FISH requer uma metodologia não muito fácil de aplicar, de uma forma rotineira, em sistemas de tratamento de água residuais. É necessário uma maior confiança no método para que se torne mais fácil a sua aplicação de uma forma sistemática.

Abstract

This work was focused on the application of molecular techniques for monitoring the microbial biodiversity in activated sludge processes. Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) technique was optimized for the identification of some filamentous bacteria responsible for the bulking and foaming events in such processes. The information obtained by FISH was compared with the classical techniques based on morphological descriptions and staining reactions, such as Gram and Neisser. The limitations associated to both techniques and the potential systematic applicability in wastewater treatment plants were evaluated. The microbial biodiversity was related to the operational performance of the wastewater treatment plant and the sludge biotic index (SBI) was calculated, to complete the information about the biological activity and plant performance.

The classical techniques, based on staining reactions, were easy and fast, but some limitations were found such as some subjectivity and the fact that environmental conditions may affect the reaction to the staining. Another problem related to the classical approach, is some ambiguity in identification manuals, since different authors present different conclusions.

FISH allowed the identification of filamentous bacteria in the complex environment of activated sludge, although some difficulties were found. One of the main problems was the difficulty to select the most appropriate probes. Initially, five probes were used: HHY, GOR0596, MPA645, CHL1851, EUB338. These probes were specific to *Haliscomenobacter hydrossis*, *Gordona*, *Microthrix parvicella*, Type 1851 and bacteria domain, respectively.

No results were obtained using probe GOR0596, and a new probe was tested, MPN1, specific to most Nocardioforms. *Microthrix parvicella* could not be detected with the probe MPA645, even after permeabilization of the cell membrane with lysozyme and mutanolysine treatments. This suggests that in our environmental samples, the probe MPA645 is not adequate. Other probes, like MPA60, MPA223 or MPA650, should be tested in future studies, to verify the viability of these probes in activated sludge samples. Also Type 1851 was not identified using the probe CHL1851. Since this probe is the only one known for this bacteria type, no conclusion could be withdrawn about the presence of Type 1851 in the studied samples. Another problem found in FISH analysis was the low quality of the images obtained, due to the low intensity of the microscope light used in this study.

In a global way, there is still a lot of work to be developed in the area of identification and filogenetic classification of filamentous bacteria, in order to allow the development of new probes with applicability in activated sludge. From the practical viewpoint, we can conclude that FISH is not yet an easy technique to apply in this type of environmental samples. In order to apply FISH routinely, more confidence in the probes used is necessary.

Índice

Agradecimentos.....	5
Sumário.....	7
Abstract.....	9
Índice.....	11
Lista de Figuras.....	17
Lista de Tabelas.....	21
Lista de Abreviaturas.....	23
1. Enquadramento e objectivo do trabalho.....	25
2. Introdução Geral.....	27
2.1 Processo de lamas activadas.....	29
2.1.1 Principais microrganismos em Lamas Activadas.....	31
2.1.2 Principais problemas causados por organismos filamentosos em sistemas de lamas activadas.....	32
2.1.2.1 “Bulking Sludge”.....	32
2.1.2.2 Espumas (“Foaming”).....	34
2.1.3 Principais causas do crescimento excessivo de bactérias filamentosas.....	35
2.2 Identificação de bactérias filamentosas através dos métodos clássicos.....	38
2.2.1 Descrição geral das principais bactérias filamentosas. Baseado em Spigoni, et al., (1992).....	41
2.2.1.1 <i>Microthrix parvicella</i>	41
2.2.1.2 <i>Nocardia</i> spp. (<i>Gordonia</i> spp.).....	42

2.2.1.3	<i>Haliscomenobacter hydrossis</i>	43
2.2.1.4	<i>Nostocoida limicola I</i>	43
2.2.1.5	<i>Nostocoida limicola II</i>	44
2.2.1.6	<i>Nostocoida limicola III</i>	44
2.2.1.7	<i>Sphaerotilus natans</i>	45
2.2.1.8	<i>Thiothrix I</i>	46
2.2.1.9	<i>Thiothrix II</i>	47
2.2.1.10	Tipo 021N	47
2.2.1.11	Tipo 0411	48
2.2.1.12	Tipo 1863	49
2.2.1.13	Tipo 0092	49
2.2.1.14	Tipo 0803	50
2.2.1.15	Tipo 0041	50
2.2.1.16	Tipo 1701	51
2.2.1.17	Tipo 0961	52
2.2.1.18	Tipo 0675	52
2.2.2	Avaliação qualitativa da abundância de bactérias filamentosas	53
2.3	Protozoários e o sistema de lamas activadas	54
2.3.1.	Espécies e grupos dominantes. Baseado em Madoni, (1994b)	56
2.3.1.1	Ciliados móveis de fundo e sésseis	56
2.3.1.2	Amebas com teca	57
2.3.1.3	Ciliados Sésseis (>80%)	57
2.3.1.4	Operculária spp.	58
2.3.1.5	Vorticella microstoma	58
2.3.1.6	Ciliados nadadores	58

2.3.1.7	Flagelados.....	59
2.3.2	Índice biótico de lamas.....	60
2.4	Métodos moleculares.....	60
2.4.1	Ecologia Molecular.....	60
2.4.2	Hibridização <i>in situ</i> de fluorescência.....	61
2.4.2.1	A molécula de rRNA e a sua utilização em filogenia microbiana.....	61
2.4.3	Construção de sondas de ácidos nucleicos.....	63
2.4.4	A técnica de FISH.....	65
2.4.4.1	Princípios.....	65
2.4.4.2	Parâmetros que afectam a hibridização <i>in situ</i> de fluorescência.....	67
2.4.5	Desenvolvimento de sondas para microrganismos de lamas activadas e implicações taxonómicas.....	69
2.4.6	Aplicação do FISH na identificação de algumas bactérias filamentosas.....	72
2.4.6.1	Nocardioformes.....	72
2.4.6.2	<i>Microthrix parvicella</i>	75
2.4.6.3	<i>Haliscomenobacter hydrossis</i>	75
2.4.7	O futuro do FISH em lamas activadas.....	76
3.	Materiais e Métodos.....	77
3.1	Amostragem.....	79
3.2	Métodos clássicos de identificação de bactérias filamentosas.....	79
3.2.1	Coloração de Gram.....	80
3.2.2	Coloração de Neisser.....	81
3.2.3	Observação microscópica e aquisição de imagens.....	82
3.3	Estudo da Comunidade de Protozoários.....	83
3.3.1	Cálculo de IBL (Índice Biótico de Lamas).....	83

3.3.2	Observação microscópica e aquisição de imagens	85
3.4	Métodos Moleculares – Hibridização <i>in situ</i> de Fluorescência	85
3.4.1	Fixação de células	85
3.4.2	Preparação das lâminas	87
3.4.3	Hibridização	88
3.4.4	Observação microscópica e aquisição de imagens	93
4.	Resultados e Discussão	95
4.1	Métodos clássicos de identificação de bactérias filamentosas.....	97
4.1.1	Coloração de Gram	97
4.1.2	Coloração de Neisser	98
4.1.3	Evolução da abundância das bactérias filamentosas ao longo do tempo de amostragem	99
4.1.4	Limitações do método.....	103
4.2	Estudo da comunidade de protozoários	104
4.2.1	Principais protozoários observados.....	104
4.2.1.1	Ciliados Nadadores	104
4.2.1.2	Ciliados Sésseis.....	105
4.2.1.3	Ciliados Móveis de Fundo	106
4.2.1.4	Ciliados carnívoros	106
4.2.1.5	Flagelados	107
4.2.2	Evolução do IBL ao longo do tempo de amostragem.....	107
4.2.3	Limitações do método.....	108
4.3	Identificação de bactérias filamentosas através de hibridização <i>in situ</i> de fluorescência	109
4.3.1	<i>Haliscomenobacter hydrossis</i>	110
4.3.2	Nocardioformes.....	111

4.3.3	<i>Microthrix parvicella</i>	114
4.3.4	Tipo 1851.....	116
4.3.5	Limitações do método	117
5.	Conclusões Gerais	121
6.	Referências Bibliográficas.....	123

Lista de Figuras

Figura 2.1 - Rede trófica estabelecida num processo de lamas activadas. Adaptado de Pons, <i>et al.</i> , (1999).	29
Figura 2.2 - <i>Microthrix parvicella</i> 1000x. Adaptado de Santa Cruz Produções	42
Figura 2.3 – <i>Nocardia spp.</i> 1000x. Adaptado de Santa Cruz Produções	43
Figura 2.4 - <i>Haliscomenobacter hydroxsis</i> 1000x. Adaptado de Santa Cruz Produções	43
Figura 2.5 - <i>Nostocoida limicola</i> I 1000x.. Adaptado de Santa Cruz Produções	44
Figura 2.6 – <i>Nostocoida limicola</i> II 1000x. Adaptado de Santa Cruz Produções	44
Figura 2.7 – <i>Sphaerotilus natans</i> 1000x. Adaptado de Santa Cruz Produções	46
Figura 2.8 – <i>Thiothrix</i> I 100x. Adaptado de Santa Cruz Produções	47
Figura 2.9 – <i>Thiothrix</i> II 1000x. Adaptado de Santa Cruz Produções	47
Figura 2.10 - Tipo 021N 1000x. Adaptado de Santa Cruz Produções	48
Figura 2.11 - Tipo 0411 1000x. Coloração Gram. Adaptado de Santa Cruz Produções.....	49
Figura 2.12 – Tipo 1863 1000x. Adaptado de Santa Cruz Produções	49
Figura 2.13 – Tipo 0092 1000x. Coloração Gram. Adaptado de Santa Cruz Produções.....	50
Figura 2.14 - Tipo 0041 1000x. Adaptado de Santa Cruz Produções	51
Figura 2.15 - Tipo 1701 1000x. Adaptado de Santa Cruz Produções	51
Figura 2.16 - Tipo 0961 1000x. Adaptado de Santa Cruz Produções	52
Figura 2.17 - Tipo 0675 1000x. Coloração Gram. Adaptado de Santa Cruz Produções.....	52
Figura 2.18 – Árvore filogenética dos três domínios: Bactéria, Archaea e Eucarya, adaptado de Woese <i>et al.</i> , (1990).	63

Figura 2.19 – Etapas da construção de sondas de ácidos nucleicos e sua aplicação (Amann <i>et al.</i> , 1995).....	65
Figura 2.20 – Hibridização <i>in situ</i> com sondas de oligonucleótidos.	66
Figura 2.21 – Especificidade da sonda MNP1, MLP, DLP, GLP1, GLP2 e GLP3. O diagrama é baseado nas sequências parciais da subunidade 16S rRNA e indica a relação filogenética das bactérias Gram positivas seleccionadas e as sequencias dos clones SMKN originários da análise da sequência 16S rRNA de uma amostra de lamas activadas. Schuppler <i>et al.</i> , (1995). A barra de escala representa 10% de diferença em sequência de nucleotidos. Adaptado de Schuppler <i>et al.</i> , (1998).	73
Figura 2.22 - Árvore filogenética mostrando os Actinomicetes mais representativos construída a partir da comparação das sequencias de rRNA da pequena subunidade ribossomal. A barra representa 5 alterações estimadas por 100 nucleótidos. As sondas de oligonucleótidos estão assinaladas com o respectivo grupo alvo. Adaptado de de los Reyes <i>et al.</i> (1997).....	74
Figura 4.1 - Nocardioformes C.C. Barra = 5 µm.....	97
Figura 4.2 - <i>Microthrix parvicella</i> C.C. Barra = 10 µm.....	97
Figura 4.3 - Tipo 1863 C.C. Barra = 5 µm.....	98
Figura 4.4 - Tipo 411 C.C. Barra = 5 µm.....	98
Figura 4.5 - <i>Haliscomenobacter hydroxsis</i> C.C.....	98
Figura 4.6 - Tipo 0961 C.C. Barra = 5 µm.....	98
Figura 4.7 - <i>Nostocoida limicola</i> II C.C. Barra = 5 µm.....	98
Figura 4.8 - <i>Microthrix parvicella</i> C.C. Barra = 5 µm.....	99
Figura 4.9 – Nocardioformes C.C. Barra = 5 µm.....	99
Figura 4.10 - Disposição não descrita da <i>Microthrix parvicella</i> C.C. Barra = 5 µm.....	100
Figura 4.11 - Aspecto geral da lama C.C. Barra = 10 µm.....	100
Figura 4.12 – Evolução do IVL ao longo do período de amostragem.....	101
Figura 4.13 – Dominância das bactérias Gram negativas C.C. Barra = 5 µm.....	101

Figura 4.14 – Dominância das bactérias Gram negativas C.C. Barra = 5 µm	101
Figura 4.15 – Aspecto geral da lama. Coloração Gram C.C.	102
Figura 4.16 – Aspecto geral da lama. Coloração Neisser C.C. Barra = 10 µm.....	102
Figura 4.17 – <i>Cyclidium</i> C. C. Barra = 10 µm	104
Figura 4.18 – Telotroco de <i>Vorticella</i> C.C.	104
Figura 4.19 – <i>Carchesium</i> C. C. Barra = 10 µm	105
Figura 4.20 – <i>Epistylis</i> C.C. Barra = 10 µm.....	105
Figura 4.21 – <i>Opercularia</i> C. C. Barra = 10 µm.....	105
Figura 4.22 – <i>Vorticella convallaria</i> C.C. Barra = 10 µm	105
Figura 4.23 – <i>Vorticella microstoma</i> C. C. Barra = 10 µm.....	105
Figura 4.24 – <i>Vorticella aquadulcis</i> C.C. Barra = 10 µm	105
Figura 4.25 – <i>Acineria</i> sp. C. C. Barra = 10 µm	106
Figura 4.26 – <i>Aspidisca</i> C.C. Barra = 10 µm	106
Figura 4.27 – <i>Chilodonella uncinata</i> C. C. Barra = 10 µm.....	106
Figura 4.28 - <i>Drepanomonas</i> C.C. Barra = 10 µm.....	106
Figura 4.29 – <i>Litonotus</i> C. C. Barra = 10 µm.....	106
Figura 4.30 - <i>Podophrya</i> C.C. Barra = 10 µm.....	106
Figura 4.31 – <i>Pequenos Flagelados</i> C. C. Barra = 10 µm	107
Figura 4.32a e b – <i>Haliscomenobacter hydrossis</i> hibridizada com HHY Barra = 10 µm....	110
Figura 4.33 a e b – Bactérias hibridizadas com EUB338 Barra = 10 µm.....	112
Figura 4.34 – Nocardioforme. Coloração DAPI. Barra = 10 µm.....	112
Figura 4.35 a, b, c e d – Nocardioformes hibridizados co MNP1 Barra = 10 µm.....	114
Figura 4.36 – Nocardioformes hibridizados com MNP1 dentro de floco Barra = 10 µm....	114
Figura 4.37 a e b – <i>Microthrix parvicella</i> em C.C. e hibridizada com EUB338 antes do pré- tratamento com lisozima.....	115

Figura 4.38 a e b – *Microthrix parvicella* em C.C. e hibridizada com EUB338 após pré-tratamento com lisozima 116

Lista de Tabelas

Tabela 2.1 - Principais espécies de bactérias filamentosas responsáveis pelo fenómeno de bulking em instalações de tratamento de efluentes domésticos ou industriais. Adaptado de Spigoni, <i>et al.</i> , (1992).	33
Tabela 2.2 - Filamentos dominantes como indicadores das condições causadoras de bulking em lamas activadas. Adaptado de (Richard, 1989).	35
Tabela 2.3 - Algumas situações particulares do funcionamento de estações de tratamento biológico de águas residuais por lamas lamas activadas (segundo Madoni, 1994b).....	56
Tabela 2.4 - Principais sondas utilizadas em tratamento de águas residuais. Fonte (Loy, <i>et al.</i> , 2003).	70
Tabela 2.5 - Exemplos de bactérias filamentosas de lamas activadas, em que a sequência 16S rRNA foi determinada. Os Nocardioformes não estão incluídos. Adaptado de Seviour <i>et al.</i> , (1999).	71
Tabela 2.6 - Principais sondas para Nocardioformes	74
Tabela 2.7 - Sondas para as principais bactérias filamentosas Gram negativas.....	76
Tabela 3.1 - Categorias de abundância dos organismos filamentosos em lamas activadas. Adaptado de Jenkins <i>et al.</i> , (1986).	82
Tabela 3.2 - Tabela de duas entradas para cálculo do IBL.....	84
Tabela 3.3 - Conversão do valor de IBL em classes de qualidade biológica das lamas e avaliação da eficiência depuradora do tratamento.....	85
Tabela 3.4 - Percentagem de formamida na solução de hibridização.....	89
Tabela 3.5 - Volume de NaCl a adicionar à solução de lavagem de acordo com a percentagem de formamida.....	89
Tabela 3.6 - Descrição das sondas de oligonucleótidos utilizadas nas hibridizações.	92

Tabela 3.7 - Comprimentos de onda de excitação emissão dos vários fluorocromos.....	93
Tabela 4.1 – Abundância relativa das bactérias filamentosas na 1ª fase de amostragem.	100
Tabela 4.2 – Abundância relativa das bactérias filamentosas na 2ª fase de amostragem	102
Tabela 4.3 – Abundância relativa das bactérias filamentosas durante a 3ª fase de amostragem	103
Tabela 4.4 - Resultados de cálculo de IBL e classes correspondentes.....	108
Tabela 4.5 - Parâmetros de hibridização para HHY	110
Tabela 4.8 – Parametros de hibridização com a MNP1	113
Tabela 4.9 - Parâmetros de hibridização para a MPA645.....	115
Tabela 4.10 - Parâmetros de hibridização para a CHL1851	117

Lista de Abreviaturas

CBO – Carência Bioquímica de Oxigênio.

CBO₅ – Carência Bioquímica de Oxigênio ao fim de 5 dias.

C.C. – Campo claro.

cDNA – Ácido desoxirribonucleico complementar.

CQO – Carência Química de Oxigênio.

Cy₃ – Indotrimetincianinas.

Cy₅ – Indopentametincianinas.

DNA – Ácido desoxirribonucleico.

ETAR – Estação de Tratamento de Águas Residuais.

F/M – Razão Alimento/Microrganismos.

FISH – Fluorescent *in situ* hybridization.

FLUOS – Fluoresceína.

G + C – Conteúdo em Guanina e Citosina.

IBL – Índice Biótico de Lamas.

IL – Idade de lamas.

IVL – Índice Volumétrico de Lamas.

IVLD - Índice Volumétrico de Lamas Diluído.

K_s – Constante de semisaturação.

LSU - Subunidade grande.

mRNA – Ácido Ribonucleico mensageiro.

OD – Oxigénio Dissolvido.

PCR – “Polymerase chain reaction”

PHB - Poli- β -hidroxibutirato.

RNA – Ácido Ribonucleico.

rRNA - Ácido Ribonucleico ribossomal.

S - Unidade Svedberg.

spp. – Espécie.

SST – Sólidos Suspensos Totais.

SSU - Subunidade pequena.

SSV – Sólidos Suspensos Voláteis.

Td – Temperatura de dissociação.

TEFL - Comprimento total de filamentos estendidos a partir da superfície do floco.

Tm – Temperatura de melting.

1. Enquadramento e objectivo do trabalho

O conhecimento profundo do estado de funcionamento de uma ETAR é essencial à sua gestão e pode ser feito, nomeadamente, através do controlo permanente dos parâmetros operacionais e das condições microbiológicas do licor misto. O controlo microscópico do licor misto é uma ferramenta útil e rápida para conhecer o estado de um reactor biológico e constitui um elemento base de operação, não só porque permite diagnosticar as patologias habituais do processo, mas também porque permite prever de forma atempada o seu aparecimento.

Os métodos clássicos de identificação de bactérias filamentosas baseados na observação microscópica de algumas características morfológicas e na reacção a colorações, essencialmente Gram e Neisser, permitiu a Eikelboom (1975) distinguir 26 tipos de bactérias filamentosas, em amostras de lammas activadas. Desde então, não se verificaram grandes desenvolvimentos ou alterações às classificações taxonómicas estabelecidas, sendo estas metodologias utilizadas com alguma frequência no controlo de rotina de ETARs.

As técnicas de ecologia molecular, actualmente em desenvolvimento, baseadas na sequência de certas regiões do RNA ribossomal, têm posto em causa as classificações taxonómicas anteriormente aceites, e tendem a revolucionar o conhecimento sobre ambientes microbianos complexos de que os sistemas de lammas activadas são um exemplo importante.

O objectivo do presente trabalho foi aplicar a técnica de hibridização *in situ* com sondas de oligonucleótidos (Fluorescent *in situ* hybridization - FISH) na identificação de algumas bactérias filamentosas presentes numa ETAR Municipal, cuja comunidade microbiana de bactérias filamentosas foi monitorizada recorrendo às técnicas clássicas. Pretendeu-se ainda relacionar esta informação com os de operação da ETAR e complementá-la com a monitorização da comunidade de protozoários. Para além da avaliação das potencialidades e limitações das duas técnicas, pretende-se também discutir a sua viabilidade e aplicabilidade numa ETAR municipal, como análise de rotina.

2. Introdução Geral

Neste capítulo é feita uma introdução geral ao processo de lamas activadas, numa perspectiva microbiológica. Apresenta-se uma breve descrição dos métodos de identificação clássicos e dos métodos actuais de identificação de bactérias filamentosas através de hibridização *in situ* de fluorescência (FISH). É também apresentada uma descrição geral dos protozoários no sistema de lamas activadas.

2.1 Processo de lamas activadas

O processo de tratamento biológico por lamas activadas foi pela primeira vez introduzido na Inglaterra em 1914 e é actualmente aquele que mais tem sido aplicado no tratamento de águas residuais domésticas e industriais em todo o mundo. O processo de lamas activadas consiste numa cultura de microbiológica de enriquecimento, constituída por um consórcio de micro e macro-organismos que metabolizam substâncias inorgânicas e orgânicas do efluente transformando-as em formas ambientalmente aceites (Richard, M., 1989). O sistema é composto, de uma forma geral, por um reactor biológico (tanques de arejamento) e um decantador secundário.

No tanque de arejamento existe uma complexa rede trófica, na qual as diferentes populações estabelecem relações de competição, predação e até canibalismo, tal como representado na Figura 2.1.

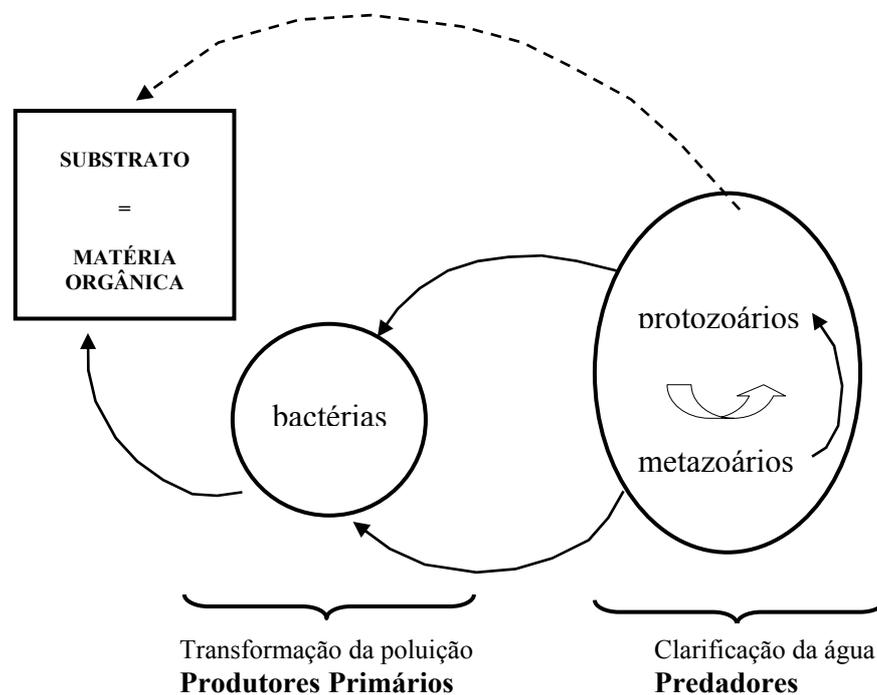


Figura 2.1 - Rede trófica estabelecida num processo de lamas activadas. Adaptado de Pons, *et al.*, (1999).

A componente biótica é representada pelos decompositores ou produtores primários (bactérias e fungos que obtêm a energia directamente da matéria orgânica dissolvida) e pelos consumidores ou predadores (flagelados heterotróficos, protozoários ciliados, rizopódios, e pequenos metazoários que se alimentam de bactérias e outros organismos). O aumento do número de decompositores, especialmente das bactérias heterotróficas, depende da quantidade de substâncias orgânicas dissolvidas no licor misto. No caso dos consumidores, o seu aumento depende da disponibilidade de presa. As bactérias dispersas são o alimento para os flagelados heterotróficos e para os ciliados bacteriófagos, que por sua vez se tornam presas dos protozoários e metazoários carnívoros (Spigoni, *et al.*, 1992).

O arejamento é necessário para satisfazer as necessidades em oxigénio das bactérias quimioheterotróficas aeróbias, as quais metabolizam por respiração os substratos orgânicos do licor misto, formando CO_2 e biomassa celular. O oxigénio é também necessário para as bactérias quimioautotróficas nitrificantes, as quais obtêm energia através da oxidação do NH_4 a NO_3 sendo a fonte de carbono o CO_2 , (Seviour, 1999). O oxigénio é ainda importante para os consumidores, nomeadamente os protozoários e os metazoários.

O sucesso deste tipo de processo assenta na rápida e completa separação entre a fase líquida e a biomassa celular, que é designada de lama e aparece sob a forma de flocos, no sedimentador secundário. Os sistemas de lamas activadas são dimensionados, assumindo que a separação das lamas biológicas da fase líquida é uma operação altamente eficiente obtendo-se, por conseguinte um efluente secundário de qualidade. Tal objectivo não poderá ser alcançado sem um controlo frequente da biomassa do reactor biológico e dos parâmetros com ela relacionados.

Muitos dos problemas relacionados com sistemas de depuração biológicos, têm origem bioquímica e ocasionam disfunções estruturais na biomassa do reactor, entre outras: espumas, bulking, crescimento disperso, desnitrificação no sedimentador secundário, turvação do efluente, etc.

No caso dos problemas causados por bactérias filamentosas, a correcção das disfunções passa por identificar correctamente os microrganismos responsáveis por tal patologia, antes de empreender uma acção correctora adequada, dado que a origem destes problemas difere segundo o grupo de organismos implicado. Por outro lado, os problemas

podem estar relacionados quer com o crescimento excessivo, quer com a ausência de bactérias filamentosas no licor misto.

Uma das ferramentas mais utilizadas para conhecer o estado de um reactor biológico é através do controlo microscópico do licor misto, mediante o qual é possível diagnosticar as patologias habituais da biomassa do reactor biológico e, idealmente prever o seu aparecimento, assim como identificar alterações do desempenho do processo.

2.1.1 Principais microrganismos em Lamas Activadas

De uma forma geral, a biomassa num processo de lamas activadas é constituída, aproximadamente, por 95% de bactérias e 5% de outros organismos, dos quais fazem parte os protozoários (ver ponto 1.3), rotíferos e invertebrados (Richard, 1989).

As lamas activadas são constituídas por uma componente orgânica e outra inorgânica, que se agregam mais ou menos casualmente, para formar o floco. O floco é constituído por diversas espécies de bactérias designadas de formadoras de flocos, representadas principalmente pelos géneros *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Citromonas*, *Flavobacterium* e *Zooglea*. Estas bactérias são capazes de segregar um material extra-celular gelatinoso que circunda a membrana externa chamado glicocálix. O glicocálix é formado por polissacáridos no caso das Gram negativas e por peptidoglicano, no caso das Gram positivas. Este polímero orgânico aumenta a viscosidade da água, ajudando as bactérias dispersas a formarem o micro-ambiente necessário à actividade das enzimas extra-celulares, facilitando, por outro lado a união de células simples para formar agregados maiores até constituir os flocos. A união das células depende da sua dimensão e da carga electrostática superficial e o mecanismo é em tudo similar à floculação com polielectrólitos sintéticos. A biofloculação pode ser definida como a interacção do exopolímero de células floculantes individuais para formar uma matriz tridimensional. Essa matriz é capaz de capturar partículas inorgânicas que incrementam o peso do floco e melhoram a sua sedimentação (Madoni, *et al.*, 1996).

Nem todas as bactérias presentes são formadoras de flocos. Muitos organismos filamentosos, na sua maioria bactérias, mas também fungos, podem desenvolverem-se no licor misto (Richard, 1989). As bactérias filamentosas são organismos unicelulares que se multiplicam por cissiparidade, permanecendo na vizinhança uma das outras. A compactação

da estrutura do floco é favorecida pelo crescimento de um esqueleto filamentosos, sobre o qual se vão acumulando substâncias inertes e outras bactérias, explicando a geral irregularidade dos flocos.

2.1.2 Principais problemas causados por organismos filamentosos em sistemas de lamas activadas

As bactérias filamentosas podem ser consideradas como parte integrante da comunidade microbiológica, do processo de lamas activadas. Embora a forma como elas surgem nas instalações continue, na maioria dos casos, a ser desconhecida (Wanner, 1993, 1994), têm um papel importante na formação de flocos com boa capacidade de sedimentação (Jenkins *et al.*, 1993). Os flocos sem esqueleto filamentosos ou com um crescimento filamentosos muito incipiente são, de um modo geral, menores, menos resistentes às agressões causadas, por exemplo, pelo arejamento e têm menor capacidade de sedimentar. Os problemas surgem quando o balanço da comunidade normal deste sistema fica perturbado e as bactérias filamentosas proliferam, causando problemas de bulking e foaming.

2.1.2.1 “*Bulking Sludge*”

O bulking é um problema muito habitual nos sistemas de lamas activadas, resultando numa deficiente sedimentação da lama biológica, podendo levar à sua perda com o efluente final, diminuindo assim a idade das lamas (IL) do sistema e a qualidade do efluente final. Podem surgir outros problemas associados ao bulking na estação de tratamento de águas residuais (ETAR) como, por exemplo, o aumento da carência química de oxigénio (CQO) e de sólidos no efluente final, a diminuição da concentração de sólidos na lama espessada e subsequente redução da idade das lamas, além da sobrecarga hidráulica na fase de tratamento de sólidos na ETAR.

Pode distinguir-se dois tipos de bulking: o bulking viscoso ou zoogléico e o bulking filamentosos. O primeiro está associado a uma síntese excessiva de exopolímero bacteriano que leva à formação de colónias com uma morfologia característica e com grande capacidade de retenção de água, provocando um “inchaço” nas lamas, com consequentes problemas de sedimentação. Os biopolímeros são agentes tensioactivos naturais e um arejamento excessivo de lama viscosa provoca a formação de espumas brancas, mas que, devido à sua capacidade

capturar biomassa, adquirem rapidamente uma cor acastanhada. Este facto causa uma perda de biomassa importante no efluente. A origem mais comum de bulking viscoso é um deficit nutritivo, nomeadamente quando se trata de um excesso de matéria carbonada em relação à quantidade de N e de P. O bulking filamentoso resulta do crescimento excessivo de microrganismos filamentosos (Tabela 2.1). As razões para a multiplicação excessiva destes microrganismos ainda são parcialmente desconhecidas (Soddell & Saviour, 1990). A partir do crescimento aproximadamente de 10 µm de filamentos por ml existe a desagregação flocular, com a conseqüente diminuição ou impossibilidade de sedimentação.

Ambos os tipos de bulking têm conseqüências na sedimentação e no espessamento. Os parâmetros mais utilizados para medir a sedimentação e espessamento das lamas biológicas são: o índice volumétrico de lamas (IVL) ou índice de Mohlman e o índice volumétrico de lamas diluído (IVLD) sendo este último considerado o mais apropriado (Jenkins, *et al.*, 1984). De uma forma geral, IVL e IVLD inferiores a 120 ml/g SST são sinónimos de lama biológica que sedimenta bem. Valores superiores a 150 ml/g SST indicam deficiente sedimentação da lama.

Tabela 2.1 - Principais espécies de bactérias filamentosas responsáveis pelo fenómeno de bulking em instalações de tratamento de efluentes domésticos ou industriais. Adaptado de Spigoni, *et al.*, (1992).

Espécie	Comum em instalações de tratamento	Comum em instalações de tratamento
	de efluentes domésticos	de efluentes industriais
<i>Sphaerotilus natans</i>	X	
<i>Haliscomenobacter hydrossis</i>	X	X
Tipo 1701	X	
Tipo 0041		X
Tipo 021N	X	X
<i>Microthrix parvicella</i>		X
Tipo 0803		X
Tipo 0092		X
<i>Nocardia</i>	X	X
Tipo 0675		X
Tipo 1851		X
Tipo 0914		X
Tipo 0961		X
Tipo 8581		X
Tipo 1863	X	
<i>Nostocoida limicola</i>	X	X
<i>Thiothrix</i>	X	X
<i>Beggiatoa</i>	X	X

Embora o bulking seja reconhecido como um dos problemas mais graves ao nível dos sistemas de tratamento biológico por lamas activadas, não existem soluções universais para controlar o excessivo crescimento destes microrganismos. As acções correctoras dependem do microrganismo em causa. É por isso importante identificar o filamento dominante que provoca o bulking, para tentar solucionar o problema pela raiz, adoptando uma acção correctora específica para combater tal microrganismo. A identificação nem sempre é fácil, uma vez que muitos filamentos são semelhantes entre si. Isto obriga a identificar pormenores característicos que algumas vezes são difíceis de observar e à utilização de colorações específicas ou, mais recentemente, à utilização de métodos moleculares.

2.1.2.2 Espumas (“Foaming”)

No tratamento secundário levado a efeito por qualquer sistema de lamas activadas é frequente o desenvolvimento de uma camada superficial de espuma no reactor biológico e no sedimentador secundário. De forma geral, distinguem-se três tipos de espumas: i) Espumas originadas pela colocação em funcionamento e/ou pela presença de detergentes. São brancas, pouco densas e dispersáveis, aparecendo tanto no reactor biológico como no sedimentador secundário; ii) Espumas originadas pela desnitrificação, que consistem na subida das lamas para a superfície do sedimentador secundário (rising sludge) devido à produção de azoto gasoso; iii) Espumas originadas pelo crescimento excessivo de certos microrganismos filamentosos.

As espumas biológicas são estáveis, densas, espessas e de cor acastanhada, aparecendo tanto na superfície do reactor biológico como no sedimentador secundário, dificultando a separação eficiente da biomassa bacteriana do efluente clarificado e reduzindo a sua qualidade (Jenkins *et al.*, 1993, Soddell & Seviour, 1990). A análise microscópica revela, geralmente, a presença de um grande número de um de dois tipos morfológicos de bactérias filamentosas: Actinomicetes Gram positivos, ramificados, contendo ácidos micólicos designados Nocardioformes (Chun & Goodfellow, 1995; Rainey *et al.*, 1995) ou Actinomicetes longos e não ramificados, Gram positivos, geralmente *Microthrix parvicella* (Blackall *et al.*, 1994).

As causas da ocorrência de “foaming” filamentoso também não são totalmente conhecidas, mas parecem envolver a hidrofobicidade associada aos lípidos da parede celular destes dois tipos morfológicos de Actinomicetes, causando a flutuação das lamas quando sujeitas a arejamento (Richard, 1989). Este tipo de espuma provoca várias disfunções dentro

do sistema de lammas activadas pois reduz a transferência de oxigénio, dificulta as tarefas de manutenção e produz muitas vezes um efluente de baixa qualidade.

Algumas das bactérias formadoras de “foaming”, entre as quais *Nocardia asteroides*, *Rhodococcus equi* e *Tsukamurella paurometabolum* são patogénicas oportunistas, ou seja, causadoras de doenças em pessoas com o sistema imunitário debilitado (Doig *et al.*, 1991; Prescott, 1991). Estas bactérias podem ser potencialmente propagadas através dos aerossóis formados. Operadores de ETAR’s e pessoas que vivam na vizinhança das mesmas podem estar expostos a aerossóis contendo estes Nocardioformes patogénicos (Richard, 1989).

2.1.3 Principais causas do crescimento excessivo de bactérias filamentosas

Foram apontadas por vários autores algumas causas do crescimento excessivo de bactérias filamentosas em relação às bactérias formadoras de flocos (Jenkins, *et al.*, 1986; La Rivière, *et al.*, 1986; Richard, 1989): valores de F/M (“Food to microorganisms ratio”) baixos, efluentes carentes em nutrientes (N, P), proporção incorrecta de C:N:P, baixo teor de oxigénio dissolvido, presença de substâncias facilmente biodegradáveis, idade elevada de lammas, configuração do reactor biológico e sistema de recirculação, pH baixo, efluentes sépticos e/ou ricos em sulfuretos (Tabela 2.2).

Tabela 2.2 - Filamentos dominantes como indicadores das condições causadoras de bulking em lammas activadas. Adaptado de (Richard, 1989).

Causa provável	Filamentos indicativos
Baixo oxigénio dissolvido (para a carga aplicada)	Tipo 1701, <i>S. natans</i> , <i>H. Hydrossis</i>
Efluentes contendo águas sépticas/ Sulfuretos	Thiothrix spp., Beggiatoa spp., Tipo 021N
Deficiência em nutrientes (N e/ou P)	Thiothrix spp., Tipos 021N, 0041 e 0675
F/M baixa	<i>M. parvicella</i> , <i>Nocardia spp.</i> , <i>H. hydrossis</i> , Tipos 0041, 0675, 0092, 0581, 0961 e 0803
pH baixo (<pH 6.0)	Fungos

Os vários tipos de bactérias filamentosas são incluídos em 6 grupos, de acordo com a causa provável do seu crescimento excessivo (Spigoni, *et al.*, 1992):

A – Espécies associadas a baixo teor de oxigénio dissolvido em lammas activadas;

B- Espécies que surgem com efluentes sépticos ou com desequilíbrio na relação CBO:N:P;

C – Espécies associadas a baixos valores de F/M ou a carência de nutrientes;

D – Espécies tipicamente de instalações com baixo F/M;

E – Espécies características de baixo pH;

F – *Nocardia* e outros géneros responsáveis pelo foaming;

Grupo A

Deste grupo de bactérias filamentosas, fazem parte o Tipo 1701 e *Sphaerotilus natans*. O crescimento excessivo destas bactérias está associado a baixos teores em oxigénio dissolvido. O teor de oxigénio dissolvido necessário para o sistema relaciona-se com o valor de F/M aplicado: quanto maior a F/M, maior será o consumo de oxigénio dissolvido, uma vez que a velocidade de remoção do substrato é maior. Numa comunidade composta por bactérias formadoras de flocos e por bactérias filamentosas, em condições limitantes de oxigénio dissolvido, tornar-se-ão dominantes as bactérias com maior afinidade para o oxigénio. O tipo 1701 e *Sphaerotilus natans* ganham na competição com as formadoras de flocos quando a concentração de oxigénio dissolvido é baixa ou muito baixa ($< 0.1 \text{ mg O}_2/\text{l}$).

Grupo B e C

Do grupo B, fazem parte as poucas bactérias com a capacidade metabólica oxidar sulfuretos e alguns ácidos orgânicos provenientes do efluente ou da fase anaeróbia da instalação. Existe uma correlação positiva entre a disponibilidade de sulfuretos e o propionato que, em condições anaeróbias, as bactérias sulfato-redutoras podem reduzir a ácido acético. Fazem parte deste grupo o Tipo 021N e *Beggiatoa* (Yamamoto, *et al.*, 1991).

Várias espécies do grupo B e C estão associadas ao desequilíbrio na relação CBO:N:P. O conceito teórico de carência nutricional indica um desvio da relação CBO:N:P = 100: 5: 1. No entanto, na prática, existem vários factores que influenciam a disponibilidade de N e P, como sejam: a forma química em que se encontra o N e P no efluente; a continuidade da composição de efluente ao longo do dia; a existência ocasional de grande quantidade de

substrato carbonado rapidamente biodegradável; a necessidade de N e P exógeno. Nas instalações que operam com longa idade de lamas, a necessidade nutricional é menor do que a referida anteriormente, porque uma parte dos nutrientes volta ao ciclo graças à lise celular e à mineralização das lamas.

Grupo D

De acordo com o princípio proposto por Chudoba (1985), a competição entre as bactérias formadoras de flocos e as bactérias filamentosas do grupo D é devida à diferente afinidade para o substrato dos dois grupos de micorganismos. As bactérias filamentosas são capazes de se desenvolver em meios com baixa concentração de substrato devido à sua constante de semisaturação (K_s) baixa. As bactérias formadoras de flocos, pelo contrário, possuem a máxima velocidade de utilização para concentrações de substrato mais elevadas.

Grupo E

O pH baixo favorece o desenvolvimento de fungos em lamas activadas (Jenkins *et al.* 1993 b), mas pouco mais é sabido sobre a sua capacidade em determinar a composição da população de bactérias filamentosas.

Grupo F

Nesta categoria estão englobados todos os Nocardioformes responsáveis pelo foaming. Estes organismos possuem células com invólucros rígidos contendo ácidos micólicos. Estes invólucros são hidrofóbicos, o que provoca a formação de espumas estáveis.

2.2 Identificação de bactérias filamentosas através dos métodos clássicos

Na identificação de bactérias filamentosas destaca-se o desenvolvimento e aplicação de métodos clássicos, com base em características morfológicas, bioquímicas e de coloração (Jenkins, *et al.*, 1984; 1993, Eikelboom, *et al.*, 1983). A identificação de bactérias filamentosas por esta via é muito laboriosa e altamente dependente da experiência do técnico. Acresce ainda que a fisiologia de grande parte das bactérias é desconhecida e para muitas espécies é mesmo impossível a obtenção de culturas puras para o seu estudo.

Na observação microscópica das bactérias filamentosas, dever-se-á ter em atenção os pormenores morfológicos a seguir descritos e a reacção às colorações, que podem ser diferenciadas de filamento para filamento, para o mesmo tipo morfológico (baseado em Spigoni, *et al.*, 1992).

Ramificação

Alguns organismos filamentosos podem ser ramificados. A ramificação pode ser de dois tipos: i) Ramificação verdadeira – quando a célula se ramifica, com continuidade citoplasmática na bifurcação dos tricomas. ii) Ramificação falsa – quando é a bainha que se ramifica e no ponto de bifurcação as células estão encostadas, sem continuidade citoplasmática.

Mobilidade

São poucos os filamentos móveis, encontrando-se entre estes *Beggiatoa* e algumas algas verdes (*Cianofíceas*). Alguns filamentos como *Thiothrix* e o Tipo 021N, podem apresentar movimentos limitados de contracção e oscilação.

Forma do filamento

Trata-se de uma característica importante para o reconhecimento da espécie. O tricoma pode ser direito, inclinado, levemente curvo, convoluto, ramificado ou irregular.

Localização do filamento

A posição do filamento em relação ao floco de lamas pode ser: i) Externa, quando o filamento se estende da superfície do floco; ii) Interna, quando o filamento se desenvolve dentro do floco; iii) Livre na fase líquida, quando o filamento não está ligado ao floco.

Dimensão do filamento

A dimensão dos filamentos depende de cada espécie.

Crescimento de bactérias sésseis

As bactérias filamentosas podem apresentar na superfície do tricoma outras células bacterianas ou pequenos flocos. Normalmente este crescimento sésseil manifesta-se em filamentos providos de bainha. É possível observar filamentos com bactérias presas de um modo desordenado sobre o tricoma, que não constitui um verdadeiro crescimento sésseil.

Bainha

A bainha é uma estrutura clara, transparente, externa à parede celular. A presença de bainha é uma das características mais difíceis de identificar.

Forma das células

Não é sempre possível reconhecer a forma das células que constituem o filamento. Por exemplo, nos casos de *Microthrix parvicella*, *Nocardia*, Tipo 0581, *H. hydrossis*, as células não são visíveis. Quando são evidentes, as células podem ser bastonetes ovais, bastonetes de extremidade arredondada, cocos, discoidais, quadradas, rectangulares ou em forma de barril.

Septo celular e indentação ao septo

O septo celular não é sempre visível e corresponde à parede celular no ponto de contacto entre duas células contíguas. Quando as células têm extremidades arredondadas, a junção entre duas células adjacentes apresenta uma reentrância que se designa por indentação.

Inclusões de enxofre

Alguns organismos crescem em presença de compostos reduzidos de enxofre e podem acumular grânulos de enxofre que são visíveis ao microscópio em contraste de fase, como inclusões muito refringentes de cor amarela. Os grânulos nem sempre são visíveis, mas, tratando a amostra com uma solução de sulfureto de sódio - Teste S, é possível observá-los. Todavia, microrganismos acumuladores de enxofre como Tipo 0914 não respondem ao Teste S.

Outras inclusões

Nas células de alguns filamentos são por vezes visíveis grânulos de cor escura, que consistem numa estrutura de reserva. Estes grânulos podem ser de polifosfato ou poli- β -hidroxibutirato (PHB) e podem ser identificados pela resposta à coloração de Neisser (o polifosfato resulta Neisser positivo, enquanto o PHB fica Neisser negativo).

Reacção às Colorações

As colorações são técnicas identificativas baseadas no uso de diversos tipos de corantes. As colorações mais habituais são a coloração de Gram e de Neisser. Em alguns organismos, a coloração modifica as dimensões (ex. Tipo 0092 aparece com um diâmetro muito maior depois da coloração de Neisser) e provoca a perda de algumas particularidades morfológicas (não são visíveis células singulares). As características que persistem e possibilitam a identificação da espécie são a posição, a dimensão do filamento e o eventual crescimento séssil.

Coloração Gram

De entre muitas variantes da coloração de Gram, utiliza-se um método específico para microrganismos filamentosos, o método de Hücker modificado (Spigoni, *et al.*, 1992). A maior parte das bactérias filamentosas são Gram negativas e algumas como o tipo 0041 e o tipo 0675 ficam com partes coradas de vermelho e partes coradas de azul e são definidas como Gram variáveis. Isto pode acontecer devido à presença de outras bactérias presas ao

tricoma que impedem o corante de penetrar completamente. O tipo 1851 apresenta uma coloração Gram débil, *Thiothrix*, *Beggiatoa* e o Tipo 021N, que geralmente são Gram negativas, podem corar de azul quando contêm quantidade notável de depósitos intracelulares de enxofre. As principais bactérias filamentosas Gram positivas são *Microthrix parvicella*, *Nocardia spp.* e *Nostocoida limicola* I.

Coloração Neisser

Este tipo de coloração fornece dois tipos de informação: coloração do tricoma e coloração dos grânulos intracelulares.

Alguns microrganismos filamentosos como *Nostocoida limicola* e o Tipo 0092 apresentam o tricoma completamente corado de azul violeta (Neisser positivo). Outros organismos como *M. parvicella* e *Nocardia* são Neisser negativos com grânulos Neisser positivos. Nos filamentos que se desenvolvem em instalações com alta carga estes grânulos são geralmente pequenos. Por sua vez, organismos como *H. hydrossis*, o Tipo 0675 e o Tipo 0041 usualmente Neisser negativos, podem apresentar uma cobertura Neisser positiva quando crescem em instalações de lamas activadas com alimentação carente em nutrientes.

2.2.1 Descrição geral das principais bactérias filamentosas. Baseado em Spigoni, et al., (1992)

2.2.1.1 *Microthrix parvicella*

Filamento estreito (diâmetro <1 µm) mas longo (100 – 400 µm), de forma irregular e convoluta, desenvolvendo-se no interior do floco formando emaranhados ou novelos e causando problemas de foaming e bulking (Figura 2.2). Não possui bainha nem crescimento de bactérias sésseis. Podem aparecer espaços vazios dentro do tricoma, que podem ser confundidos com a existência de uma bainha. As células não são visíveis. Quando o organismo contém grande quantidade de grânulos intracelulares assume um aspecto similar ao de um colar de pérolas.

Microthrix parvicella é Gram positiva e Neisser negativa com grânulos Neisser positivos. Do ponto de vista fisiológico, é caracterizada por apresentar um elevadíssimo

conteúdo em lípidos (35% em peso seco) e grande capacidade em utilizar rápida e preferivelmente o ácido oleico e de armazená-lo em grandes glóbulos intracelulares (Slijkhuis, *et al.*, 1982; Soddell, *et al.*, 1990). O crescimento desta bactéria é favorecido por vários factores que podem aparecer isolados ou combinados: F/M baixo (0.05 – 0.2 Kg CBO₅/Kg SSV.d) e consequente longa idade de lamas, alto conteúdo em óleos e gorduras do efluente, temperaturas baixas e baixa concentração de oxigénio dissolvido. Crescimento excessivo deste organismo acontece sobretudo na Primavera e em instalações com remoção biológica de nutrientes, acompanhado do aparecimento de nitritos.

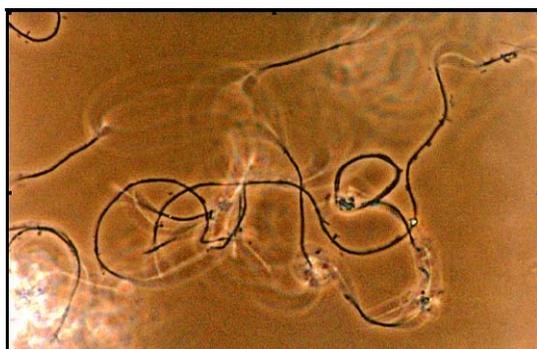


Figura 2.2 - *Microthrix parvicella* 1000x. Adaptado de Santa Cruz Produções

2.2.1.2 *Nocardia* spp. (*Gordonia* spp.)

Filamento de forma irregular, curto (10 – 20 µm) e dotado de ramificações verdadeiras, desenvolvendo-se no interior do floco ou livre na solução (Figura 2.3). As células não são observáveis ao microscópio óptico; no entanto têm forma irregular sem indentação ao septo celular. Não apresenta bainha, nem crescimento de bactérias sésseis. É Gram positiva e Neisser negativa, estando frequentemente presentes grânulos Neisser positivos e grânulos de PHB e sendo ausentes os grânulos de enxofre. A população microbiana que corresponde às características assinaladas é constituída por actinomicetes de vários géneros (ex. *Nocardia* sp., *Rhodococcus* sp., *Mycobacterium* sp.), não distinguíveis com as técnicas tradicionais de observação microscópica. Por este motivo fala-se de organismos semelhantes à *Nocardia amarae* (“*Nocardia amarae* like organisms” ou NALO). Esta bactéria está mais relacionada com o foaming em lamas activadas sendo responsável por uma espuma castanha espessa e estável nos tanques de arejamento e decantadores secundários. Esta bactéria está associada a efluentes com elevado conteúdo em óleos e gorduras ou substâncias tensioactivas e a

instalações com elevada idade de lamas, geralmente superior a nove dias, baixo F/M e deficiente oxigenação.

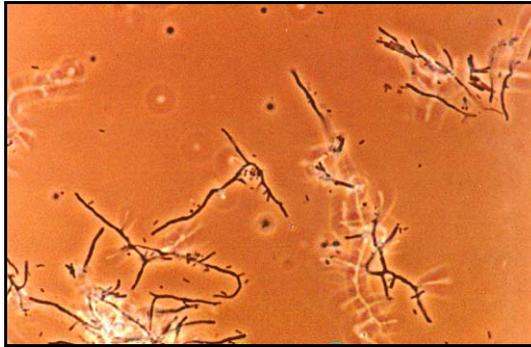


Figura 2.3– *Nocardia spp.* 1000x. Adaptado de Santa Cruz Produções

2.2.1.3 *Haliscomenobacter hydrossis*

Filamento fino de pequenas dimensões (diâmetro 0.5 μm e comprimento 20 – 100 μm), direito ou inclinado que se estende da superfície do floco ou se encontra livre na solução (Figura 2.4). Tem bainha, mas esta só se torna evidente quando aparecem espaços vazios ao longo do tricoma, podendo ainda ser observado crescimento de bactérias sésseis. As células não são visíveis, não tem septos celulares, nem grânulos intracelulares. É Gram negativa e Neisser negativa. O crescimento desta bactéria está associado a instalações com insuficiente oxigenação, baixo F/M, carência de nutrientes e/ou elevada concentração de substâncias rapidamente biodegradáveis.

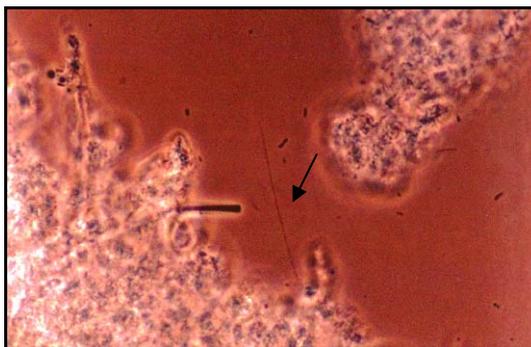


Figura 2.4 - *Haliscomenobacter hydrossis* 1000x. Adaptado de Santa Cruz Produções

2.2.1.4 *Nostocoida limicola I*

Filamento inclinado ou convoluto com diâmetro entre 0.6 – 0.8 μm e comprimento entre 100 – 200 μm , podendo ser encontrado no interior do floco ou livre na solução (Figura

2.5). É composto por pequenas células ovais ($0.6 - 0.8 \times 0.6 - 0.8 \mu\text{m}$) dotadas de um septo dificilmente observável. A bainha e o crescimento de bactérias sésseis estão ausentes. É Gram positivo e Neisser positivo, sem inclusões de enxofre.



Figura 2.5 - *Nostocoida limicola* I 1000x.. Adaptado de Santa Cruz Produções

2.2.1.5 *Nostocoida limicola* II

Filamento de forma convoluta que se encontra sobretudo no interior dos flocos. Tem dimensões superiores à da *N. limicola* I, diâmetro entre $1.2 - 1.4 \mu\text{m}$, comprimento entre $100 - 200 \mu\text{m}$, células ovais, redondas ou discoides ($1.2 - 1.0 \mu\text{m}$), com septo celular e indentação facilmente observáveis (Figura 2.6). A bainha e o crescimento de bactérias sésseis estão ausentes, assim como os grânulos de enxofre. Pode conter grânulos de PHB e a resposta à coloração Gram e Neisser é variável. Pode apresentar ramificação verdadeira.

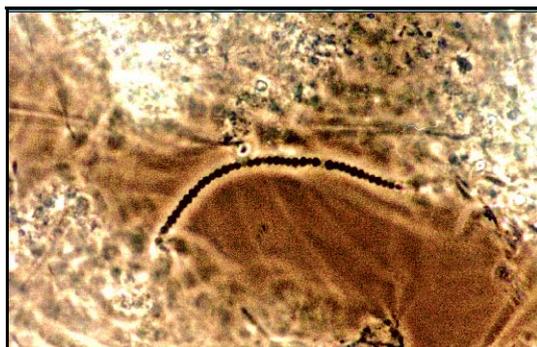


Figura 2.6 - *Nostocoida limicola* II 1000x. Adaptado de Santa Cruz Produções

2.2.1.6 *Nostocoida limicola* III

Filamento de grandes dimensões (diâmetro entre $1.6 - 2.0 \mu\text{m}$, comprimento entre $200 - 300 \mu\text{m}$) com crescimento convoluto estendendo-se para além da superfície do floco. As células são ovais ($1.6 \times 1.6 \mu\text{m}$), com septo celular e indentação facilmente observáveis. A

baínha está ausente, assim como grânulos de enxofre. No entanto, podem ser observados grânulos de PHB. Geralmente é Gram positivo e Neisser positivo, mas a coloração também pode resultar negativa.

Os três tipos de *Nostocoida limicola* estão associados a longa idade de lamas, F/M baixo, presença de efluentes industriais e baixa concentração de oxigênio dissolvido.

2.2.1.7 *Sphaerotilus natans*

Filamento direito ou ligeiramente curvo que emerge da superfície do floco causando frequentemente a formação de pontes entre flocos. O comprimento do tricoma é variável entre 100 a 1000 μm e o seu diâmetro varia entre 1 a 1.8 μm . Os filamentos são constituídos por células (1 – 1.8 μm x 1.5 – 3.0 μm) em forma de haste, com extremidades arredondadas (em forma de salsicha) claramente observadas no interior de uma baínha transparente. As células encontram-se empacotadas dentro da bainha, de modo a assumirem uma forma rectangular, o que acontece sobretudo na base do filamento. Frequentemente são observadas falsas ramificações, resultantes da ramificação da baínha e não das células, causando uma estrutura em ramo (Figura 2.7). O crescimento de bactérias sésseis é normalmente ausente, mas pode acontecer quando estes microrganismos crescem lentamente. As reacções às colorações Gram e Neisser são negativas. Não são observados grânulos de enxofre ou de polifosfato, mas é possível observar grânulos de reserva de cor escura que presumivelmente são poli- β -hidroxibutirato (PHB).

Em cultura pura, cresce rapidamente na presença de hidratos de carbono simples e ácidos orgânicos, utilizando o amoníaco como fonte de azoto. É estritamente aeróbia, mas pode sobreviver em condições de baixo oxigênio dissolvido e valores de F/M altos ($> 0.5 \text{ Kg CBO}_5/\text{Kg SSV.d}$). Esta capacidade permite-lhe competir favoravelmente com bactérias formadoras de flocos em lamas carentes de oxigênio.

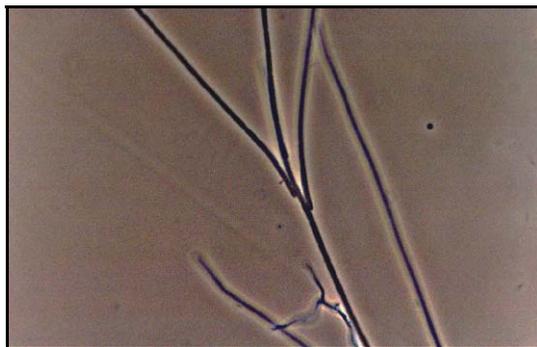


Figura 2.7– *Sphaerotilus natans* 1000x. Adaptado de Santa Cruz Produções

2.2.1.8 *Thiothrix* I

Filamento direito ou ligeiramente curvo, com diâmetro entre 1.4 – 2.5 μm , comprimento entre 100 – 500 μm , que se estende da superfície do floco formando pontes entre flocos (Figura 2.8). As células são retangulares (1.4 – 2.5 x 3.0 – 5.0 μm), com septo claramente visível e sem indentações. Tem bainha, mas raramente se observa o crescimento de bactérias sésseis. A reação às colorações de Gram e de Neisser é negativa, pode apresentar grânulos de enxofre, grânulos de PHB e grânulos Neisser positivos (polifosfato). O filamento pode resultar Gram positivo quando estão presentes muitos grânulos de enxofre ou quando a bainha, que pode ser muito espessa, impede uma boa descoloração. Algumas características peculiares, mas que não são sempre observáveis, são a formação de rosetas, presença de gonídias e a presença de um tricoma de diâmetro decrescente da base para a região apical.

Esta bactéria filamentosa pode originar problemas de bulking, no caso de entrada de efluentes sépticos contendo níveis apreciáveis de sulfuretos e ácidos orgânicos, a partir dos quais pode obter energia (mixotrofia) e no caso de carência de nutrientes. A distinção das duas causas é simples: a primeira é acompanhada pela presença de numerosos grânulos intracelulares de enxofre e segunda da presença de grânulos escuros de PHB. Esta espécie pode sobreviver em condições anaeróbias desde que em presença de fontes de enxofre (Wanner, *et al.*, 1987).

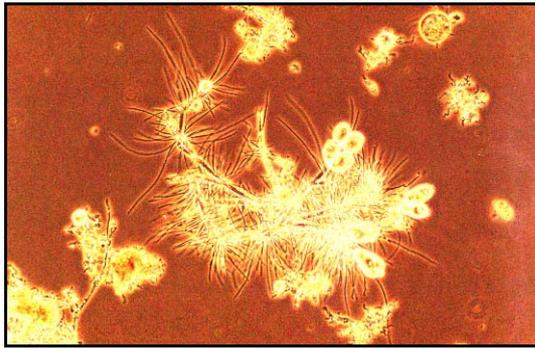


Figura 2.8 – *Thiothrix* I 100x. Adaptado de Santa Cruz Produções

2.2.1.9 *Thiothrix* II

É similar à *Thiothrix* I, mas tem dimensões mais reduzidas (diâmetro 0.7 – 1.4 μm , comprimento 50 – 200 μm). O tricoma é rectilíneo ou ligeiramente curvo e estende-se da superfície do floco. As células são rectangulares (0.7 – 1.4 x 1.0 – 2.0 μm) com septo celular visível, mas sem indentação. Tem bainha mas é difícil de detectar. Raramente se observa crescimento de bactérias sésseis. É Gram negativa e Neisser negativa, pode conter grânulos esféricos refringentes de enxofre, grânulos de PHB ou grânulos Neisser positivos. Pode formar rosetas ou gonídias e frequentemente o filamento estreita da base até ao ápice (Figura 2.9). É uma espécie indicadora da presença de esgotos sépticos, de carência de nutrientes ou da presença de alta concentração de substratos carbonados rapidamente biodegradáveis.

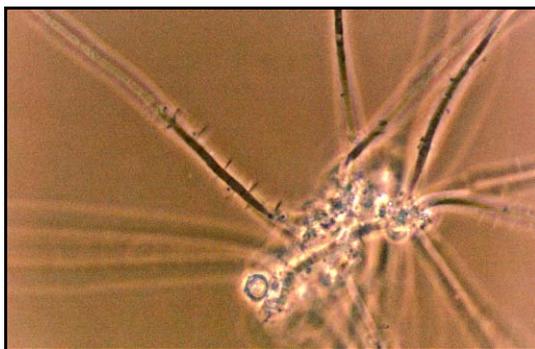


Figura 2.9 – *Thiothrix* II 1000x. Adaptado de Santa Cruz Produções

2.2.1.10 Tipo 021N

Filamento de grandes dimensões (diâmetro 0.8 – 2.0 μm , comprimento 100 - > 1000 μm) direito, levemente curvo ou convoluto, que se estende da superfície do floco causando frequentemente a formação de pontes. As células são de forma variável: no mesmo tricoma

podem ser ovais, rectangulares, quadradas ou em forma de barril ($1 - 2 \times 1 - 2 \mu\text{m}$). O tricoma tem septos bem definidos com indentações (Figura 2.10). É frequente observar células discoidais na base do filamento (diâmetro $1.0 - 2.0 \mu\text{m}$, comprimento $0.4 - 0.7 \mu\text{m}$), mas à medida que se caminha para o ápice, as células tendem a aumentar de comprimento passando à forma quadrangular depois rectangular e por fim à forma de barril (diâmetro $0.8 - 2.0$, comprimento $2.0 - 3.5 \mu\text{m}$). Não tem bainha nem bactérias sésseis, mas as células possuem parede celular que geralmente permanece depois da lise celular podendo ser confundida com a existência de uma bainha. O tricoma termina numa gonídia. É Gram negativa e Neisser negativa, pode conter grânulos Neisser positivos e grânulos refringentes de enxofre. Quando as células são ricas em grânulos de enxofre, o filamento adquire uma coloração Gram positiva débil. O crescimento deste filamento é favorecido pela presença de vários factores isolados ou combinados: efluentes sépticos ou contendo grandes quantidades de sulfuretos e/ou ácidos orgânicos, carência de nutrientes, grande concentração de substratos rapidamente biodegradáveis, F/M baixo.



Figura 2.10 - Tipo 021N 1000x. Adaptado de Santa Cruz Produções

2.2.1.11 Tipo 0411

Filamento de pequenas dimensões (diâmetro $0.8 \mu\text{m}$, comprimento $50 - 150 \mu\text{m}$), de forma irregular que se estende da superfície do floco (Figura 2.11). É constituído por células alongadas em forma de bastonetes ovais ($0.8 \times 2.0 - 4.0 \mu\text{m}$) com indentação ao septo. Não possui bainha nem crescimento sésseil. É Gram negativo e Neisser negativo sem grânulos intracelulares. Normalmente esta espécie não causa problemas de sedimentabilidade, mas pode causar problemas de crescimento disperso. Está associada a valores de F/M altos.

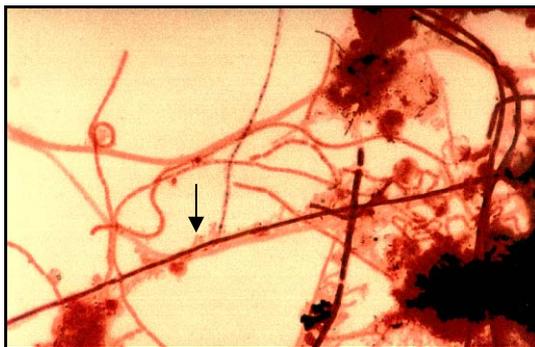


Figura 2.11 - Tipo 0411 1000x. Coloração Gram.
Adaptado de Santa Cruz Produções

2.2.1.12 Tipo 1863

Filamento de pequenas dimensões (diâmetro 0.8 μm , comprimento 20 – 50 μm) de forma irregular que se desenvolve no interior do floco ou livre na solução. As células são ovais (0.8 – 1.5 μm) com indentação ao septo (Figura 2.12). Não possui bainha nem crescimento de bactérias sésseis. É Gram e Neisser negativo podendo estar presente grânulos Neisser positivos. Esta bactéria normalmente não causa problemas de bulking, pois é constituída por uma cadeia flexível de células, contudo pode causar foaming pela sua tendência em crescer em solução. Está associada e instalações com baixa concentração de oxigénio dissolvido, quando se pratica cloragem na lama do reciclo e quando o processo é perturbado pela presença de óleos e gorduras.



Figura 2.12 – Tipo 1863 1000x. Adaptado de Santa Cruz
Produções

2.2.1.13 Tipo 0092

Filamento pequeno (diâmetro 0.8 – 1.0 μm , comprimento 10 – 60 μm) que se desenvolve principalmente no interior do floco (Figura 2.13). As células são rectangulares (0.8 x 1.5 μm), com septo pouco evidente e sem indentação. Não tem bainha nem crescimento

séssil. É Gram negativo e Neisser positivo e tem a particularidade de passar quase despercebida nas preparações de Gram, mas ser muito evidente nas preparações Neisser. Pode conter grânulos intercelulares e o tricoma fica mais espesso após a coloração Neisser. Causa problemas de bulking pela formação de flocos de malha larga. Está associado a instalações que operam com F/M baixo ou muito baixo e longa idade de lamas.

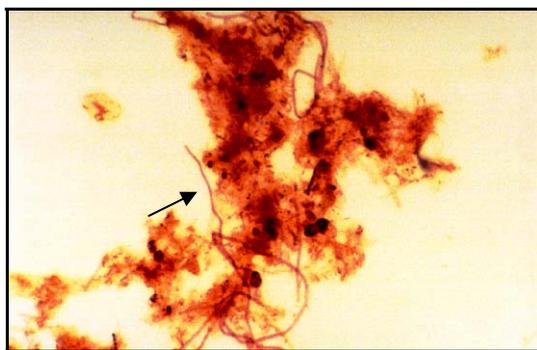


Figura 2.13 – Tipo 0092 1000x. Coloração Gram.
Adaptado de Santa Cruz Produções

2.2.1.14 Tipo 0803

Filamento direito ou ligeiramente curvado (diâmetro 0.8 μm , comprimento 50 – 150 μm) estende-se da superfície do floco ou livre na solução. As células são retangulares, sem indentação. Não tem bainha nem crescimento de bactérias sésseis. É Gram negativo e Neisser negativo, sem grânulos intracelulares. Está associado a valores F/M baixos.

2.2.1.15 Tipo 0041

Filamento direito ou levemente curvo, de grandes dimensões (comprimento 100 – 500 μm e diâmetro 1.2 – 1.6 μm), constituído essencialmente por células quadradas (1.2 – 1.6 x 1.5 – 2.0 μm) (Figura 2.14). Possui bainha e os septos celulares são facilmente visíveis. Em efluentes do tipo doméstico desenvolve-se coberto de crescimento de bactérias sésseis, em efluentes do tipo industrial o seu crescimento é tão rápido não permitindo a colonização da bainha com organismos sésseis. A resposta à coloração Gram é peculiar, geralmente é Gram positivo mas, se estiver densamente coberto de crescimento séssil a penetração do corante é dificultada e por vezes aparece como Gram variável. Em instalações industriais tende a ser Gram negativo. É Neisser negativo e raramente são observados grânulos Neisser positivos. Em instalações com carência de nutrientes pode ser envolvido por uma cobertura Neisser

positiva. Não possui grânulos de enxofre. Esta bactéria filamentosa está associada à idade de lamas elevada, F/M baixos e/ou carência nutricional.

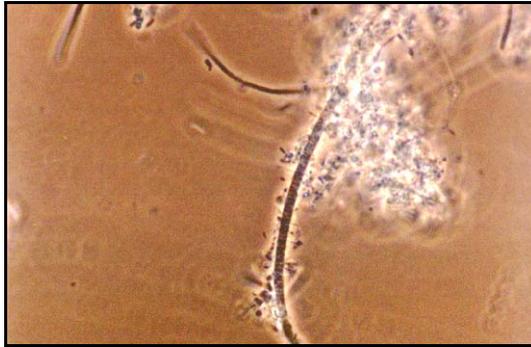


Figura 2.14 - Tipo 0041 1000x. Adaptado de Santa Cruz Produções

2.2.1.16 Tipo 1701

Filamento relativamente curto (10 – 100 μm) inclinado ou levemente curvo que cresce principalmente no interior do floco (Figura 2.15). Em geral apresenta um crescimento de bactérias sésseis abundante, observando-se ocasionalmente, o crescimento deste filamento para fora dos flocos sem bactérias sésseis aderidas, o que é um mau sinal, visto que quer dizer que está a crescer muito rapidamente não permitindo sequer a colonização. As células são em forma de bastonetes, com a extremidade arredondada (0.7 – 1.0 x 1.0 – 2.0 μm) e estão contidas numa bainha. O tricoma apresenta septos com indentações. É Gram negativo e Neisser negativo, observando-se frequentemente grânulos de PHB, mas não possui grânulos de enxofre. Este filamento é associado ao bulking, sendo um indicador de insuficiente oxigenação.

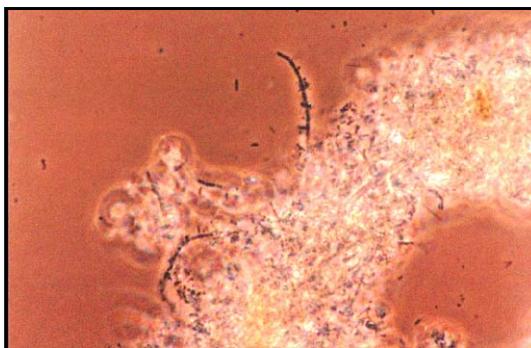


Figura 2.15 - Tipo 1701 1000x. Adaptado de Santa Cruz Produções

2.2.1.17 Tipo 0961

Filamento direito (diâmetro 0.8 – 1.4 μm , comprimento 40 - 150 μm) que se estende da superfície do floco, de cor muito clara e com células rectangulares (1.0 x 2.0 μm) (Figura 2.16). Não possui uma bainha verdadeira, mas por vezes observa-se um revestimento viscoso que pode ser confundido com uma bainha. É Gram negativo e Neisser negativo, sem inclusões celulares. Está associado a valores de F/M baixos.

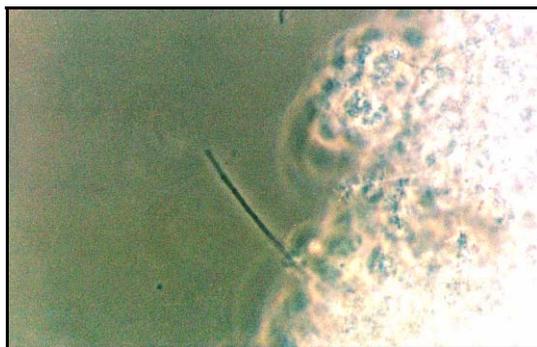


Figura 2.16 - Tipo 0961 1000x. Adaptado de Santa Cruz Produções

2.2.1.18 Tipo 0675

Este tipo bacteriano é muito similar ao Tipo 0041 mas, de dimensões mais reduzidas (comprimento 30 – 150 μm e diâmetro 0.7 – 1.0 μm) (Figura 2.17). As células são de forma quadrada (0.7 – 1.0 μm) com septo bem visível, sendo a bainha geralmente coberta por crescimento sésil. A resposta à coloração é análoga ao Tipo 0041, não possuindo grânulos de enxofre. Está associado a instalações a longa idade de lamas, baixo F/M e carência nutricional.

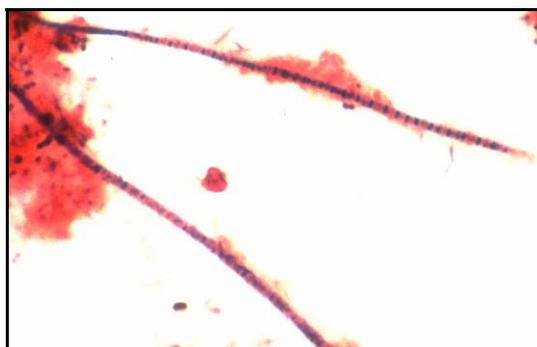


Figura 2.17 - Tipo 0675 1000x. Coloração Gram. Adaptado de Santa Cruz Produções

2.2.2 Avaliação qualitativa da abundância de bactérias filamentosas

Numa amostra de lamas activadas a população de bactérias filamentosas pode ser escassa ou presente de uma forma massiva. O efeito dos filamentos na estrutura dos flocos pode ser diverso: i) Nenhum, quando existem poucos filamentos ou quando o seu desenvolvimento se dá livre na solução; ii) Formação de pontes entre flocos especialmente no caso dos filamentos maiores que se estendem da superfície do floco; iii) Formação de flocos de malha larga devido ao desenvolvimento exagerado de filamentos no interior do floco (Spigoni, *et al.*, 1992).

A monitorização do número de bactérias filamentosas, assim como a identificação das espécies dominantes é fundamental para uma correcta avaliação do estado de funcionamento da instalação. Desta forma, poder-se-ão prever futuros problemas e/ou aplicar medidas correctivas na fase inicial dos mesmos.

Existem vários métodos simples de quantificação de bactérias filamentosas, nomeadamente o proposto pela equipa de San José/Santa Clara. CA. Water Pollution Control Plant (SJ/SCWPCP). Este método exprime a abundância através do número de vezes que o filamento intercepta uma linha assinalada na ocular, durante a observação microscópica de um campo inteiro, de uma amostra fresca de lamas activadas. Outro método utilizado é o descrito por Sezgin *et al.*, (1986) baseado no comprimento total de filamentos estendidos a partir da superfície do floco (TEFL), sendo, no entanto, um método de aplicação lenta e em laboratórios com recursos limitados não pode ser utilizado de uma forma rotineira. Actualmente, com o aumento da capacidade de processamento dos computadores, tem havido lugar ao desenvolvimento de programas de análise de imagem que permitem, de uma forma rápida, expedita e sem a subjectividade do observador, efectuar a quantificação de bactérias filamentosas (Amaral, 2003).

É também possível efectuar uma avaliação qualitativa da abundância de bactérias filamentosas presentes no processo de lamas activadas. Esta avaliação pode ser efectuada tendo como base as seis categorias propostas por Jenkins *et al.*, (1986). Este método baseia-se na observação de um certo número de flocos, de uma determinada amostra, sendo posteriormente atribuída uma categoria, adequada à situação, com base no número de filamentos existentes por floco.

2.3 Protozoários e o sistema de lamas activadas

Os protozoários melhoram a qualidade do efluente através da predação da maior parte das bactérias dispersas do licor misto que entram continuamente no sistema com o efluente e, ainda, de parte dos seus agregados. Na ausência de protozoários, o efluente final é caracterizado por possuir uma CBO mais elevada e uma maior turbidez, devido à presença de muitas bactérias dispersas (Cruds, 1975, Madoni, P., 1994a).

A densidade e diversidade da comunidade de protozoários estão relacionadas com o desempenho da instalação e com a qualidade do efluente final (Esteban *et al.*, 1990; Madoni, 1994a,b). A dominância ou a ausência de uma espécie particular, assim como a composição global da microfauna, podem ser consideradas bons indicadores da eficiência biológica da depuração por lamas activadas. Estes organismos são uma componente importantíssima em processos de lamas activadas sendo o seu papel fundamental na predação das bactérias dispersas (Cruds, 1975; Cruds & Cockburn, 1970a; Cruds *et al.*, 1968).

A microfauna, de uma forma geral, pode ser dividida em dois grupos, na óptica do gestor duma ETAR: i) grupo positivo constituído pelos ciliados móveis de fundo, ciliados sésseis e ameba com teca; e ii) grupo negativo constituído por pequenos flagelados, ciliados nadadores, *Vorticela microstoma* e *Operculária spp.* (Madoni, P., 1996).

O número de protozoários ciliados que vivem na instalação é normalmente da ordem dos 10^6 indivíduos por litro representando aproximadamente 9% do licor misto (SSV, peso seco) (Madoni, P., 1994a). Quando este número diminui para 10^4 por litro, indica uma deficiente depuração (Curds, 1975; Drakides, 1980; Madoni, 1981). Neste caso observa-se um aumento das bactérias dispersas e conseqüentemente o aumento da CBO e da turvação do efluente. Um elevado número de ciliados ($> 10^7$ indivíduos por litro) indica, pelo contrário, uma boa depuração e uma ótima eficiência.

Os ciliados bacteriófagos das lamas activadas podem ser divididos em 3 grupos funcionais, de acordo com o seu comportamento: i) os nadadores que se encontram na fracção líquida e ficam em suspensão no tanque de sedimentação e se alimentam das bactérias dispersas no licor misto; ii) os móveis de fundo que habitam a superfície dos flocos e se alimentam de bactérias que se encontram na superfície dos flocos; iii) os sésseis que se encontram fixos nos flocos mediante um pedúnculo, precipitando com o floco durante a

sedimentação e podendo ser recirculados juntamente com as lamas, que se alimentam também de bactérias dispersas.

O processo de lamas activadas baseia-se na formação de agregados de bactérias (flocos) sobre os quais outros organismos se podem desenvolver. Por isso, uma população de microrganismos com capacidade de se ligarem à lama tem vantagem sobre a população que nada livremente na fracção líquida e que está portanto sujeita a ser levada para fora do sistema, através do efluente (Madoni, P., 1994a).

As relações de competição e predação criam oscilações e sucessões das populações estabelecendo-se uma dinâmica populacional típica. Podem-se distinguir três fases distintas que se sucedem ao início de funcionamento de uma instalação de lamas activadas: i) a fase inicial da instalação é caracterizada pela presença de espécies típicas do efluente a tratar; estas espécies pioneiras são representadas principalmente pelos ciliados nadadores (*Colpidium*, *Cyclidium* e *Paramecium*) e por flagelados, sendo estes independentes da presença de lamas, não podendo ser considerados componentes típicos do ecossistema “tanque de arejamento”. Com a formação da lama activada, estes organismos competem com as espécies melhor adaptadas ao ambiente e rapidamente declinam. ii) a segunda fase é caracterizada pelo forte desenvolvimento de ciliados típicos do tanque de arejamento, sendo a comunidade caracterizada por uma grande riqueza de espécies em que as formas nadadoras são gradualmente substituídas por formas sésseis e móveis de fundo. iii) a fase estacionária é caracterizada por uma microfauna cuja estrutura em espécies reflecte as condições de estabilidade alcançadas no tanque de arejamento, com o equilíbrio dinâmico entre carga orgânica e lamas produzidas, removidas e recicladas. Nesta fase predominam as formas sésseis e móveis de fundo.

Como atrás se referiu, no tanque de arejamento de uma estação a funcionar normalmente, a microfauna é abundante (pelo menos 10^6 indivíduos por litro, geralmente 10^7 ind./l), diversificada, com uma composição em que nenhum grupo ou espécie predomina numericamente sobre os outros em mais que um factor de 10 (Madoni, 1994b).

Pelo contrário, uma microfauna que é dominada por uma espécie ou grupo é quase sempre indicação de disfunção trófica, devido à acção de factores limitantes que impedem o desenvolvimento da maior parte das espécies, favorecendo sobretudo as formas mais tolerantes a estes factores (Tabela 2.3).

Os factores limitantes mais comuns são a presença de substâncias tensioactivas no efluente de entrada, carga orgânica muito elevada ou muito baixa, grande perda de lamas e limitação de oxigénio no tanque de arejamento.

A identificação do grupo dominante permite diagnosticar o estado particular do funcionamento de uma instalação.

Tabela 2.3- Algumas situações particulares do funcionamento de estações de tratamento biológico de águas residuais por lamas activadas (segundo Madoni, 1994b).

Grupo Dominante	Eficiência	Causa possível
Pequenos flagelados	má	lamas pouco oxigenadas, entrada de substâncias em vias de fermentação
Pequenas amebas nuas e flagelados	má	carga elevada e/ou dificilmente degradável
Pequenos ciliados nadadores (<50 µm)	mediocre	permanência breve; lamas pouco oxigenadas
Grande ciliados nadadores (> 50 µm)	mediocre	carga demasiado alta
Ciliados sésseis	baixa	fenómenos transitórios
Ciliados móveis de fundo	boa	
Ciliados sésseis + móveis de fundo	boa	
Amebas com teca	boa	carga baixa e/ou diluída; boa nitrificação

2.3.1. Espécies e grupos dominantes. Baseado em Madoni, (1994b).

2.3.1.1 Ciliados móveis de fundo e sésseis

Estes dois grupos de ciliados normalmente co-dominam a microfauna de lamas activadas, o que é possível por ocuparem nichos ecológicos diferentes evitando a competição. No entanto, a relação de abundância entre os dois grupos tende a variar com a carga orgânica do efluente. Os móveis de fundo, de que são exemplos *Chilodonella uncinata*, *Acineria uncinata* (Madoni, P., 1996), *Aspidisca cicada*, *Aspidisca lynceus* e *Euplotes affinis*, diminuem com o aumento da carga orgânica, sobretudo a partir de valores de 0.6Kg CBO₅/Kg SSV.d (Curds & Cockburn, 1970 b, Klimowicz, 1970). Os organismos sésseis apresentam maior resistência a elevadas cargas orgânicas. Os ciliados móveis de fundo estão ainda inversamente relacionados com o IVL: densidades elevadas destes ciliados (>2000 ml⁻¹) estão associados a valores de IVL menores de 200; a partir de valores da ordem dos 400, os móveis de fundo reduzem drasticamente a sua presença (Pagnotta & Tommasi, 1979). Entre os ciliados móveis de fundo salienta-se que *Aspidisca sp.* pode ser tolerante ao cobre (Nicolau *et al.*, 1999; Nicolau *et al.*, 2001).

2.3.1.2 Amebas com teca

Nas lamas activadas, as amebas com teca estão presentes normalmente com três géneros: *Arcella*, *Diffugia* e *Englypha*. Estes protozoários colonizam as lamas activadas de instalações em funcionamento com baixa carga orgânica e são característicos de lamas dos tanques de arejamento de instalações onde ocorre remoção de azoto (Poole, 1984). As amebas com teca são muito abundantes ou dominantes nas lamas caracterizadas por baixa carga orgânica, longo tempo de retenção e alta concentração de oxigénio dissolvido (OD) e baixos valores de IVL. Estas características permitem geralmente obter uma completa nitrificação (Drakides, 1978; Chierici & Madoni, 1991). Sob tais condições, a qualidade do efluente é excelente e o desempenho biológico da instalação alcança o valor máximo. Em ocasiões de alta carga (>1 Kg CBO₅/Kg SSV.d) e alto valor de CQO do efluente, estas espécies são substituídas por ciliados sésseis, *Operculária* e ciliados nadadores (Sasahara & Ogawa, 1983).

2.3.1.3 Ciliados Sésseis (>80%)

Os ciliados sésseis são normalmente co-dominantes em lamas activadas. No entanto, em ocasiões de condições transitórias da instalação, em que existe a redução da eficiência depurativa, estes ciliados podem aumentar rapidamente e a sua densidade pode representar mais de 80% da microfauna total (Drakides, 1978; Madoni, P., 1981). Tais condições transitórias podem ser: i) rápido aumento da F/M devido à perda ou extracção de lamas; ii) variação da carga orgânica de forma descontínua.

Os ciliados sésseis desenvolvem-se num amplo espectro de valores de F/M. Dominam a microfauna, quando os valores de F/M estão compreendidos entre 0.3 e 0.6 Kg de CBO₅/Kg SSV.d; com valores entre 0.6 e 0.9 Kg de CBO₅/Kg SSV.d, tornam-se co-dominantes juntamente com os flagelados (Curds & Cockburn, 1970b). A melhor qualidade do efluente final obtém-se para razões ciliados móveis de fundo/sésseis superiores a 0.5 (Bedogni *et al.*, 1991).

Entre os ciliados sésseis existem algumas espécies, como *Vorticella microstoma* e *Operculária spp.*, que podem sobreviver e crescer em lamas activadas expostas a condições ambientalmente críticas (carência de O₂, entrada de substâncias tóxicas etc). Quando estas espécies estão presentes em elevada densidade, devem ser consideradas separadamente das outras formas sésseis.

2.3.1.4 *Operculária spp.*

É comum observar uma pequena quantidade de *Operculária spp.* nas lamas activadas. Este ciliado é um indicador biológico válido, no sentido que o seu número aumenta quando a lama activada está em determinadas condições (Esteban *et al.*, 1991). Está associada a efluentes com elevada CBO e é a espécie mais observada em lamas com alta carga (Klimowicz, 1970). *Operculária spp.* é capaz de sobreviver melhor que outros protozoários em ambientes desfavoráveis. Por isso, é observado grande concentração de *Operculária* em instalações de tratamento de efluentes de origem industrial contendo substâncias tóxicas, (Antonietti *et al.*, 1982; Becares, 1991; Cardinaletti & Zitelli, 1991). Pode ser o único componente da microfauna em instalação que tratam efluentes contendo sais metálicos (Madoni, P., 1996).

2.3.1.5 *Vorticella microstoma*

A presença desta espécie é frequente nas lamas activadas durante a primeira fase da colonização, sendo posteriormente substituída por outra espécie *Vorticella convallária*, que deve dominar na fase de estabilidade. Em caso de drástica e prolongada redução da concentração de oxigénio no tanque de arejamento, observa-se a alternância entre estas duas espécies devido à sua diferente capacidade de tolerância à carência de oxigénio (Madoni & Antonietti, 1984). *Vorticella microstoma* é um válido indicador da carência de oxigénio no tanque de arejamento, devido à grande resistência desta espécie às condições anóxicas (Bick, 1972; Toman & Rejic, 1988). O crescimento massivo deste ciliado sésil é observado em tanques de arejamento, nas ocasiões de grande fluxo e de escassa qualidade de efluente (Esteban, *et al.*, 1990) e em condições de baixo valor de OD, SSV, altos valores de F/M e SVI no licor misto (Poole, 1984; Esteban *et al.*, 1991).

2.3.1.6 *Ciliados nadadores*

Os ciliados nadadores bacteriófagos são normalmente muito abundantes no efluente e colonizam o tanque de arejamento durante a fase inicial de arranque da instalação, quando as bactérias formadoras de flocos são ainda escassas. Os flocos começam a formar-se e os ciliados sésseis começam a ganhar a competição pelas bactérias dispersas na fracção líquida, uma vez que são filtradores mais eficientes do que os ciliados nadadores. Assiste-se assim a uma substituição gradual destes últimos pelos ciliados sésseis (Madoni, P., 1994a).

Quando os ciliados nadadores são dominantes, a qualidade do efluente produzido é geralmente má (Curds & Cockburn, 1970b). Pequenos ciliados nadadores (*Colpidium*, *Cyclidium*, *Tetrahymena* e *Uroma*) dominam a microfauna de instalações que operam com idade de lamas muito baixa ou com altos valores de F/M (0.6 – 0.9 Kg CBO₅/Kg SSV.d) (Curds & Cockburn, 1970b) e com ineficiente de oxigenação (Madoni, P., 1994a). Estes ciliados bacteriófagos requerem alta concentração de bactérias dispersas para se desenvolverem, mas resistem melhor que os outros componentes da microfauna aos efluentes tóxicos e à falta de oxigênio. Os pequenos ciliados nadadores observam-se sempre juntamente com os pequenos flagelados e, por vezes, estes dois grupos dominam a microfauna. Deve ser sublinhado que a este grupo pertencem somente os ciliados bacteriófagos; formas nadadoras carnívoras tais como *Amphileptus*, *Litonotus*, *Spathidium* não devem ser inseridos neste grupo (Madoni, P., 1994a).

2.3.1.7 Flagelados

Os pequenos flagelados heterotróficos como *Bodo*, *Polytoma* e *Tretamitus*, denominam normalmente a microfauna durante a fase de arranque, quando as bactérias formadoras de flocos estão ausentes. Alimentam-se de bactérias dispersas e com o tempo são substituídos por ciliados bacteriófagos (Madoni, P., 1994a).

A presença maciça destes protozoários em lamas maduras é associada a um mau desempenho biológico da instalação devido a deficiente arejamento, carga demasiado elevada e à entrada de substâncias em fermentação (Drakides, 1978; Madoni, P., 1986).

Os flagelados podem ser os únicos protozoários presentes em lamas fortemente carregadas (>0.9 KgCBO₅/Kg SSV.d) (Curds & Cockburn, 1970b). Os flagelados entram continuamente na instalação através do efluente, onde se encontram em elevada quantidade. Normalmente, em lamas activadas, estes protozoários sofrem a competição por parte dos ciliados bacteriófagos e são fortemente expostos à predação por parte de outros ciliados. Assim, a sua presença nas lamas activadas é limitada a poucos indivíduos (<10 indivíduos na diagonal da câmara de Fucks-Rosenthal). A dominância de flagelados torna-se evidente, quando estes atingem a densidade de 100 indivíduos ao longo da câmara de Fuchs Rosenthal. Neste último caso deve-se considerar os flagelados como grupo dominante da microfauna. (Madoni, P., 1994a).

2.3.2 Índice biótico de lamas

O índice biótico de lamas (IBL) surgiu com Madoni (Madoni, P., 1994a), inspirado no “Extended Biotic Index” de Woodiwiss (1980). Tem sido a base de muitos resultados obtidos em várias investigações sobre a microfauna de lamas activadas, durante os últimos vinte anos (Madoni, P. *et al.*, 1996; Nicolau *et al.*, 1999; Nicolau *et al.*, 2001).

O método baseia-se na abundância e na diversidade específica da comunidade e nas diferentes sensibilidades reveladas por parte de alguns grupos da microfauna, aos factores físico-químicos prevaletentes no sistema.

O IBL tem em consideração os seguintes pontos (Madoni, P., 1994a): i) a riqueza em espécies tende a alterar-se normalmente com a carga orgânica. O maior número de espécies é observado em cargas compreendidas entre 0.2 e 0.3 Kg CBO₅/Kg MLSS.d (Curds & Cockburn, 1970 b); ii) a densidade da microfauna diminui com o decréscimo da carga mássica. No tanque de arejamento de uma instalação com remoção de azoto, é esperada uma microfauna menos abundante do que nas lamas activadas convencionais.

O método para a determinação deste índice é referido no capítulo 2 (Materiais e Métodos).

2.4 Métodos moleculares

2.4.1 Ecologia Molecular

Ecologia é a ciência que estuda as interacções dos organismos com o seu ambiente biótico e abiótico. No caso da microecologia, estas interacções determinam a ocorrência e distribuição das espécies microbianas, assim como as suas actividades. Isto requer uma identificação segura através de métodos objectivos. Para a descrição da estrutura de comunidades, a hibridização com sondas de ácidos nucleicos é rápida e segura quando comparada com os métodos dependentes de cultura (Amann *et al.*, 2000). Existem duas técnicas básicas. Uma delas é a identificação através de hibridização “slot” ou “dot-blot”, em que a totalidade dos ácidos nucleicos, DNA ou RNA ou os dois, são isolados da amostra e subsequentemente hibridizados com sondas de ácidos nucleicos (Stahl *et al.*, 1998; Sahm *et*

al., 1999). Outra forma é através da hibridização *in situ* da totalidade das células fixadas (DeLong *et al.*, 1989, Amann *et al.*, 1990a). Ambas as técnicas são potencialmente quantitativas e também podem ser utilizadas em microrganismos ainda não cultivados. Uma vantagem da técnica de hibridização *in situ* é a capacidade de obter informações acerca da localização das células, da sua distribuição espacial e tamanho, dados significativos a nível da microecologia (Amann *et al.*, 2000).

A técnica desenvolvida no presente trabalho é a hibridização *in situ* com sondas de ácidos nucleicos, utilizada para identificação de bactérias filamentosas do processo de lamas activadas de uma ETAR municipal.

2.4.2 Hibridização *in situ* de fluorescência

2.4.2.1 A molécula de rRNA e a sua utilização em filogenia microbiana

Todas as células necessitam de sintetizar proteínas para crescerem, sendo os métodos por elas utilizados muito semelhantes (Alberts *et al.*, 1997). As principais diferenças surgem entre células procariontas ou eucariontas. Na síntese de proteínas, a informação genética encontra-se armazenada nas sequências nucleotídicas que compõem as moléculas do DNA genómico. Esta informação é inicialmente transcrita para uma sequência de bases, chamada de RNA mensageiro (mRNA), sob acção da enzima RNA polimerase, sendo posteriormente traduzida numa sequência de aminoácidos que constituem uma proteína. As estruturas no interior da célula, onde se processa a tradução e síntese de proteínas são os ribossomas. Estes são constituídos por proteínas e outras moléculas de RNA chamadas de RNA ribossomal (rRNA) (Saviour *et al.*, 1999).

Cada ribossoma é constituído por duas subunidades ribossomais e cada uma destas integra moléculas de rRNA de diferentes tamanhos, que podem ser definidas pelas suas propriedades de sedimentação, designadas de unidades Svedberg (S). Em ribossomas procariontas são encontradas as moléculas 5S rRNA e 23S rRNA, que constituem a subunidade grande (LSU) e as moléculas 16S rRNA que constituem a subunidade pequena (SSU) (Alberts *et al.*, 1997; Saviour *et al.*, 1999; Lechner *et al.*, 1994).

O RNA é sempre sintetizado a partir da cópia de regiões específicas e bem delimitadas do DNA. Os genes ribossomais do DNA possuem a informação genética, que codifica a

síntese das diferentes moléculas de rRNA (Lechner *et al.*, 1994). Devido à tradução do mRNA a proteínas ou ribossomas ser tão importante para todas as células, é provável que o sistema para a tradução tenha surgido uma única vez na evolução, e não tenha sido alterado subsequentemente. Por outras palavras, como é um processo conservativo no sentido evolucionário, as sequências de bases das unidades 5S, 16S e 23S rRNA podem ser consideradas conservadas, assim como os genes que as codificam.

Segundo Woese (1987) a sequência de gene 16S rDNA pode ser utilizado como “molécula relógio”, para o estudo da forma como os procariotas têm evoluído ao longo do tempo (Saviour *et al.*, 1999).

O rRNA e os seus genes correspondentes (rDNA) são actualmente muito usados como marcas biológicas de evolução. Várias são as razões para esta aplicação (Olsen *et al.*, 1986): i) o rRNA está presente no mecanismo de síntese proteica e tem a mesma função em todos os organismos; ii) toda a estrutura do rRNA é conservada sendo a taxa de mutação durante a evolução relativamente baixa, comparando com outros genes. Isto faz do rRNA uma espécie de relógio evolucionário, fornecendo informação filogenética segura; iii) os rRNA e seus genes são facilmente acessíveis, em parte devido às técnicas de PCR e sequenciação; iv) as moléculas 16S rRNA e 23S rRNA contêm suficiente informação, para permitir comparações significativas e satisfatórias; v) parece não haver transferência de genes de rRNA entre organismos; relações entre rRNA reflectem relações de evolução.

Nos últimos anos, o gene 16S rDNA, com aproximadamente 1500 bases de desoxiribonucleótidos de comprimento, tem sido sequenciado em milhares de bactérias (Maidak *et al.* 1996). Muitas das regiões conservadas são muito semelhantes entre diferentes bactérias, e dentro destas, pequenas sequências podem ser reconhecidas como únicas, para uma bactéria em particular (Wheller *et al.*, 1996). Estas sequências, de facto, fornecem-nos a “impressão digital” molecular para um determinado organismo, e são estas sequências únicas de oligonucleotidos que podem ser utilizadas para a identificação individual de células bacterianas (Amann *et al.*, 1990b; Schleifer *et al.*, 1993; Amann, 1995a,b; Stackebrandt & Rainey, 1995).

É possível comparar a sequência 16S rDNA de diferentes bactérias, e uma vez conhecida a sequência 16S rDNA de um isolado desconhecido, esta pode ser comparada com outras sequências 16S rDNA bacterianas e a sua posição taxonómica pode ser determinada.

Desta forma poderá ser atribuído um nome biológico próprio e válido (Trüper & Schleifer, 1992; Stackebrandt & Liesack, 1993). Análises comparativas das sequências 16S rDNA estão a conduzir à reconstrução das árvores filogenéticas universais (Woese, 1987).

Antes de ser conhecida a informação contida na sequência do 16S rRNA, os organismos vivos eram divididos em Eucariotas, (os que continham núcleo) e em Procariotas, (os que não tinham núcleo). Árvores filogenéticas baseadas em sequências parciais de 16S rRNA revelaram que os procariotas deveriam ser divididos em dois grupos distintos, que foram inicialmente designados de Eubacteria e Archaeobacteria (Woese, 1987). Quando mais informações foram obtidas, a partir da análise completa de sequências de 16S rRNA, os três reinos foram reclassificados em três domínios: Eucarya, Archaea e Bactéria (Figura 2.18) (Woese *et al.*, 1990; Winker & Woese, 1991).

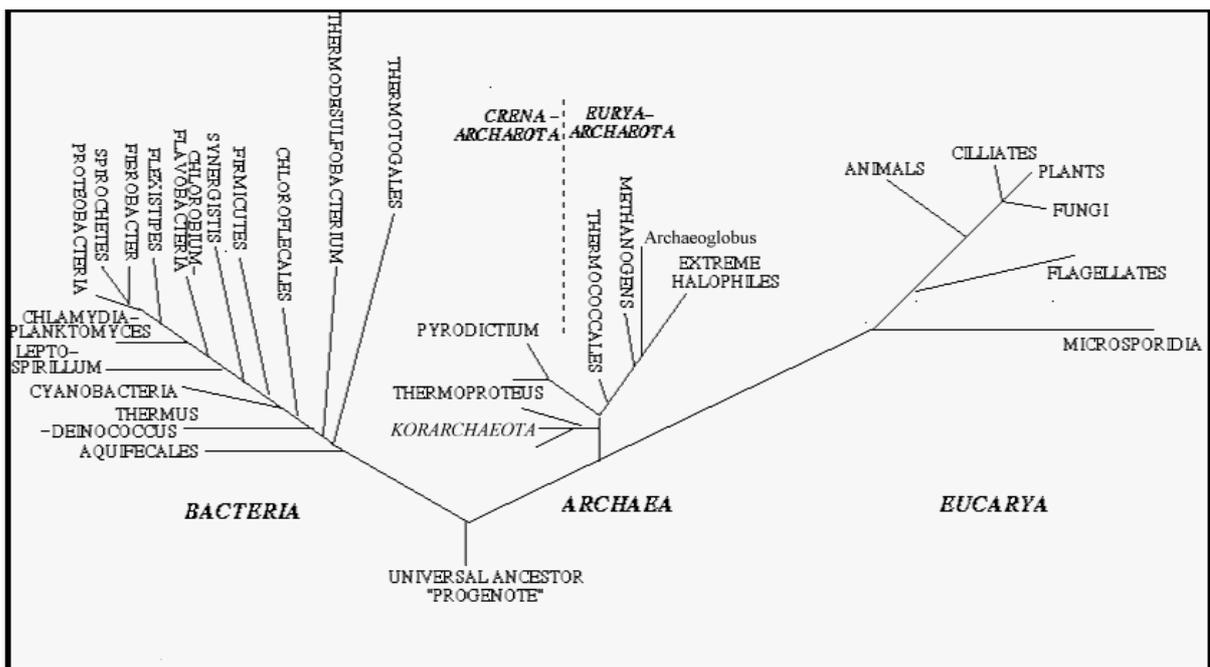


Figura 2.18 – Árvore filogenética dos três domínios: Bactéria, Archaea e Eucarya, adaptado de Woese *et al.*, (1990).

2.4.3 Construção de sondas de ácidos nucleicos

Actualmente, o maior desafio da utilização do FISH em amostras ambientais já não é a técnica de coloração em si, mas antes a construção e aplicação de novas sondas num grupo

desconhecido de microrganismos. Este procedimento faz do FISH uma das mais promissoras e poderosas técnicas em biologia molecular (Amann *et al.*, 1995).

A construção de uma sonda passa inicialmente pela caracterização molecular de comunidades microbianas naturais. Começa-se pela extracção dos ácidos nucleicos, directamente da amostra ambiental de um determinado habitat ou a partir de uma cultura pura, através dos procedimentos habituais, nomeadamente através de técnicas de diluição (Schut *et al.*, 1993). Depois da extracção dos ácidos nucleicos DNA/RNA podem seguir-se duas vias, com vista à construção de clones de rDNA.

Usando a técnica de PCR, fragmentos do rDNA podem ser selectivamente amplificados de um DNA misto (Saiki *et al.*, 1988), a partir de “primers” específicos da região 16S do rDNA. Outra via passa pela transcrição reversa do 16S rRNA do ecossistema a partir da enzima transcriptase reversa, obtendo-se o cDNA (DNA complementar), recuperando selectivamente a informação útil contida na sequência de rRNA (Weller *et al.*, 1989). Uma variação deste procedimento envolve um passo de reacção PCR com “primers” específicos do rDNA, imediatamente a seguir à transcrição reversa (Amann *et al.*, 1992). Estudos usando este procedimento revelam que muitas das sequências recuperadas do ecossistema continuam ainda desconhecidas, demonstrando uma homologia limitada com sequências 16S rRNA de estirpes existentes em culturas de colecções (Giovannoni *et al.*, 1990).

A partir de uma destas duas vias obtêm-se uma série de clones de rDNA, em que as suas sequências podem ser determinadas. Analisando comparativamente as sequências obtidas com as bases de dados existentes, poder-se-ão realizar estudos de filogenia e construção de sondas (Figura 2.19).

Na construção de uma sonda estão envolvidos quatro passos fundamentais (Amann *et al.*, 1995): i) alinhamento do rRNA (ou seu gene rDNA); ii) identificação da sequência alvo; iii) síntese e marcação da sonda; iv) avaliação experimental e optimização da especificidade da sonda e determinação da temperatura de dissociação. Para facilitar os dois primeiros passos, foram desenvolvidos nos últimos anos várias aplicações informáticas de apoio (Strunk *et al.*, 1995). O terceiro passo envolve a síntese de DNA, que pode ser efectuada automaticamente, e a marcação dos oligonucleótidos, por ligação enzimática (com

radionucleótidos ou dioxigenina) ou por ligação química (com dioxigenina ou marcação fluorescente).

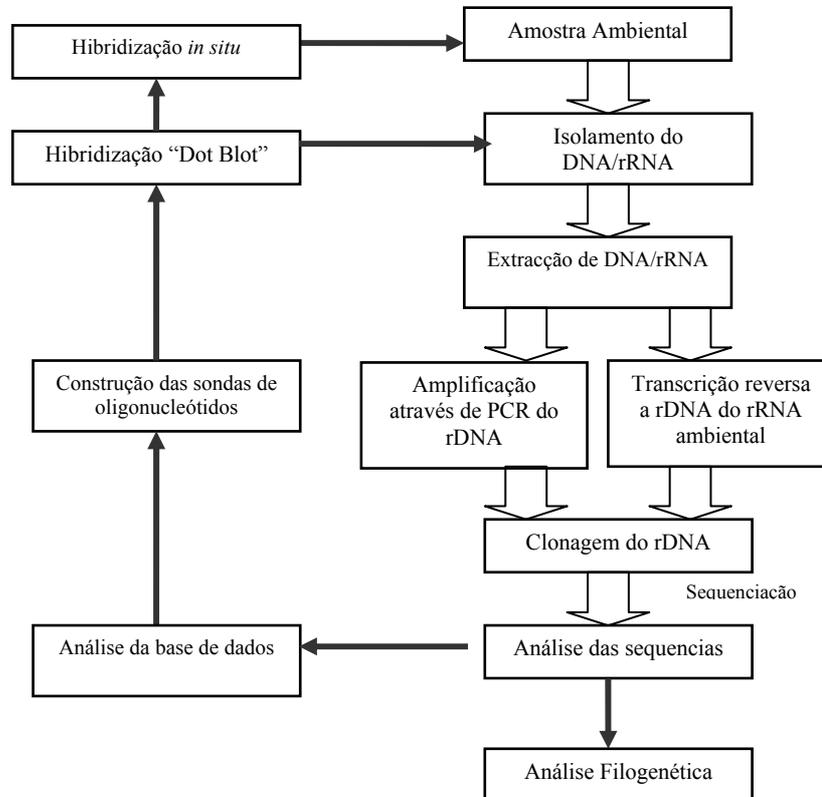


Figura 2.19 – Etapas da construção de sondas de ácidos nucleicos e sua aplicação (Amann *et al.*, 1995)

O último passo é o mais difícil e laborioso, uma vez que, o resultado muitas vezes não é o esperado, em consequência do bloqueio espacial da estrutura secundária ou devido à temperatura de melting ser muito baixa (Stahl & Amann, 1991; Zarda *et al.*, 1991).

2.4.4 A técnica de FISH

2.4.4.1 Princípios

A técnica designada de “Fluorescent *in situ* hybridization” (FISH) (Amann *et al.*, 1995), tem sido utilizada com sucesso, para a rápida identificação de bactérias, sendo uma das técnicas de identificação mais directa. Esta técnica foi aplicada na identificação *in situ* de bactérias filamentosas de lamas activadas, tendo o seu procedimento sido revisto por Amann *et al.*, (1995).

A técnica de FISH aplicada à identificação de bactérias filamentosas, de lamas activadas, consiste na utilização de sondas de oligonucleótidos, usualmente com 15 a 30 nucleótidos de comprimento (Figura 2.20 a), complementares às regiões 16S rRNA do alvo (Figura 2.20 b.).

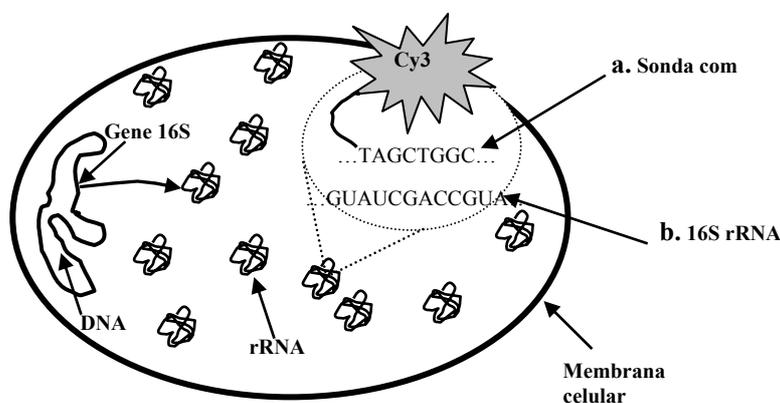


Figura 2.20 – Hibridização *in situ* com sondas de oligonucleótidos.

Estas regiões 16S rRNA possuem um grau intermédio de conservação característico das entidades filogenéticas como: o género, famílias e subclasses. As sondas são capazes de entrar nas células bacterianas fixadas e, uma vez dentro, podem formar ligações estáveis (híbridos via pontes de hidrogénio entre nucleótidos complementares), com a região 16S rRNA nos ribossomas. Se não existir complementaridade entre a sequência de oligonucleótidos da sonda e a região 16S rRNA do ribossoma, não ocorre hibridização estável e os oligonucleótidos são lavados da célula. (Lindrea *et al.*, 1999).

De forma a permitir a observação, quando a hibridização ocorre, são acopladas à sonda moléculas marcadoras. Vários marcadores podem ser utilizados sendo o procedimento mais comum a ligação de um marcador fluorescente, na extremidade 5' da sonda (Amann *et al.*, 1990b; 1992c; 1995; Schleifer *et al.*, 1993). São vários os fluorocromos existentes, nomeadamente: fluoresceína (FLUOS), tetrametilrodamina, texas red, Cy3, Cy5 e Cy7 (Amann *et al.*, 1995). Devido à sua relativa estabilidade, o fluorocromo Cy3 tornou-se o marcador mais usual, melhorando as gamas de detecção de FISH em amostras ambientais (Glöckner *et al.*, 1996). As células em que os oligonucleótidos marcados hibridizam com o rRNA alvo podem ser directamente visualizadas a partir de um microscópio de epifluorescência. Em situações em que seja necessário visualizar mais pormenores ou ver as células dentro dum floco, poderá ser utilizado o microscópio confocal.

2.4.4.2 *Parâmetros que afectam a hibridização in situ de fluorescência*

A hibridização ocorre quando existe o emparelhamento entre a sequência de oligonucleótidos da sonda e o rRNA alvo. Isto acontece sob certas condições que permitem a formação de pontes de hidrogénio entre nucleótidos complementares, com a formação de duas pontes de hidrogénio, (entre a adenina e a timina) ou três pontes de hidrogénio (entre a guanina e a citosina). No entanto, as pontes de hidrogénio formadas entre a sonda e o rRNA alvo são relativamente fracas, estando sujeitas a dissociação, sob certas condições. O processo de emparelhamento é reversível e influenciado pelo ambiente químico e físico. Este ambiente pode ser manipulado, no sentido de aumentar ou diminuir a extensão e estabilidade dos dupletos formados. O termo “stringency” é usado para definir as condições químicas e físicas que determinam o grau de dupletos formados (Nakatsu *et al.*, 1996). Não se encontrando uma tradução adequada para este termo, ele será usado em inglês ao longo desta tese. A quantidade de híbrido sonda-alvo formado é determinada pela taxa de formação de híbrido e da estabilidade dos mesmos. A taxa de formação do híbrido depende da frequência das colisões entre cadeias simples de ácidos nucleicos, que tenham pares de bases complementares (Wetmur *et al.*, 1968). A reassociação das cadeias de ácidos nucleicos segue uma cinética de 2ª ordem, uma vez que é dependente da colisão das duas cadeias complementares presentes em igual concentração (Nakatsu *et al.*, 1996).

Os ecologistas microbianos usam, geralmente, métodos de hibridização em fase mista. Os factores que influenciam a taxa de hibridização em fase mista são os mesmos que influenciam a hibridização em solução. Considera-se fase mista quando uma cadeia de ácidos nucleicos (o Alvo) está aderida a um suporte sólido e a segunda cadeia (a sonda) está em solução. Dentro destas condições, a hibridização de ácidos nucleicos segue uma cinética de pseudo-primeira ordem, desde que uma das concentrações, da sonda ou do alvo, esteja em excesso, não se alterando consideravelmente durante a formação do híbrido (Yung *et al.*, 1985).

Um dos parâmetros que influencia a taxa de formação de híbridos sonda-alvo é o tempo de hibridização. Se a sonda for de cadeia única o tempo necessário de hibridização diminui com o aumento da concentração da mesma. Em geral, o tempo requerido para hibridização, aumenta com o comprimento da sonda. Isto é devido à taxa de difusão através

do alvo ser reduzida, com o aumento do comprimento da sonda (Meinkoth *et al.*, 1984). Este problema pode ser parcialmente ultrapassado através do uso de sondas mais curtas.

A temperatura de “melting” (T_m) é outro dos parâmetros que influenciam a hibridização. Para um determinado oligonucleótido, a temperatura de melting é definida como a temperatura de equilíbrio em que metade dos dupletos formados, entre a sonda e o alvo, estão dissociados. (Stahl *et al.*, 1991, Tijssen, 1993). A T_m para um oligonucleótido é dependente da concentração, pois as reacções de associação e de dissociação são intermoleculares, mas independente do tempo, uma vez que, a T_m é definida para um equilíbrio (Tijssen, 1993). A temperatura de dissociação (T_d) é definida como a temperatura em que 50% dos dupletos permanecem intactos, durante um período específico de lavagem (Tijssen, 1993). A T_d não corresponde a condições de equilíbrio e pode ser diferente da T_m . A T_d é muito importante, podendo ser usada para distinguir entre dupletos estáveis e não estáveis, e desta forma avaliar a especificidade da sonda. Normalmente, são feitas lavagens depois da hibridização, à temperatura de dissociação sendo esta determinada para híbridos perfeitos (sem dupletos desemparelhados entre sonda e alvo). A esta temperatura, os híbridos com um ou mais pares desemparelhados, geralmente são 100% dissociados, o que resulta na especificidade esperada. Têm sido desenvolvidas várias equações empíricas para estimar a T_d de um oligonucleótido. No entanto, se estas equações não incorporarem todos os factores que afectam a estabilidade dos dupletos, é recomendado fazerem-se estudos experimentais, para cada nova sonda. Desta forma, poder-se-á determinar a T_d para as condições inerentes a uma determinada hibridização (Raskin *et al.*, 1994, Stahl *et al.*, 1991). As três pontes de hidrogénio entre a guanina e a citosina são mais estáveis, do que as duas pontes de hidrogénio entre a adenina e a timina. Como resultado, a T_m aumenta com o aumento da fracção de guanina e citosina (Marmur *et al.*, 1962). Por outro lado, a presença de agentes destabilizantes de ácidos nucleicos, como é o caso da formamida, decresce o valor de T_m (MacConaughy *et al.*, 1969).

Para além da utilização da T_d como temperatura de lavagem, existe um outro método alternativo de controlar a “stringency” da hibridização. Este consiste em manter a temperatura de hibridização constante e incluir uma concentração adequada de formamida. É assumido que, a formamida ajuda no aumento da acessibilidade da sonda (Pernthaler *et al.*, 2001), visto que enfraquece o efeito das pontes de hidrogénio entre nucleótidos (Amann *et al.*, 1992 b).

Na hibridização são utilizados tampões, com pH entre 6.8 e 7.4, e a estabilidade do híbrido aumenta com o aumento da concentração de sal. Esta relação não é linear e o efeito diminui com concentrações superiores a 1 M de NaCl (Britten *et al.*, 1985) sendo a concentração ótima entre 0.4 e 1 M (Wahl *et al.*, 1987).

Para além dos vários parâmetros que influenciam a hibridização em si, o passo prévio de fixação das células pode condicionar o resultado final. A fixação permite preservar a morfologia das células, mas também permeabilizar as mesmas, de forma a facilitar a entrada da sonda. Os agentes fixantes são divididos em duas classes: i) os precipitantes, como o etanol e o metanol e ii) os agentes “crosslinking”, como os aldeídos (Haase *et al.*, 1984). Os primeiros são os mais adequados para o caso das bactérias Gram positivas, uma vez que estas possuem uma parede celular resistente constituída de péptidoglicano, e os segundos para as bactérias Gram negativas com uma parede menos resistente.

2.4.5 Desenvolvimento de sondas para microrganismos de lamas activadas e implicações taxonómicas

A hibridização *in situ* tem mostrado ser muito útil na detecção de microrganismos não cultivados e na identificação de bactérias em ambientes complexos, como é o caso das lamas activadas. Durante os últimos anos têm sido construídas e testadas muitas sondas universais, específicas de grupos, géneros e de espécies de bactérias relevantes em processos de tratamento de águas residuais. Algumas dessas sondas são apresentadas na Tabela 2.4. Estes tipos de organismos, na sua maioria, apresentam taxas de crescimento baixas e ciclos de vida complexos, o que os tornam difíceis de isolar e cultivar. Tem sido de particular relevância, para as bactérias filamentosas, o desenvolvimento deste tipo de técnica, uma vez que torna possível o reconhecimento das sequências alvo específicas, não necessitando de uma cultura prévia de bactérias (ex. Amann & Ludwig, 1994; Amann, 1995a,b; Amann *et al.*, 1995)

Através do FISH, os microrganismos são identificados e a sua distribuição espacial analisada (Amann *et al.*, 1995). Através de múltiplos marcadores podem estudar-se várias subpopulações em simultâneo.

Tabela 2.4 - Principais sondas utilizadas em tratamento de águas residuais. Fonte (Loy, *et al.*, 2003).

Sondas	Alvo
ACA652 (ACA23A)	Acinetobacter
EUB338 (Bact338) (bactérias)	Maioria das bacterias
EUB338 II (SBACT P 338)	Planctomycetales
EUB III (SBACT V 338)	Verrucomicrobiales
21N	Eikelboom Tipo 021N
CHL 1851	Eikelboom Tipo 1851
DLP	Nocardioforme actinomycete sp.
G.am1-439	Gordona amarae grupo 1
G.am205	Gordana amarae
G.am2-439	Gordona amarae grupo 2
GIB	Eikelboom Tipo 021N grupo I
G2M	Eikelboom Tipo 021N grupo II
G3M	Eikelboom Tipo 021N grupo III
Gam 1019	Bactérias acumuladoras de fosfato (Gamaproteobactéria)
Gam 1278	Bactérias acumuladoras de fosfato (Gamaproteobactéria)
GLPL1	Gordona sp. SMKN27, Gordona sp. SMKN12, Gordona sp. SMKN17, Gordona sp. SMKN14, (nocardioformes actinomicetes)
GLPL2	Gordona sp. SMKN29, Gordona sp. SMKN15, (nocardioformes actinomicetes)
GLPL3	Nocardioformes actinomicete sp.
Goam192	Gordona amarae
Gor596	Gordonia (Gordona)
HHY	Haliscomenobacter hydrossis
Kst157	Candidatus "Kuenenia stuttgartiensis"
MNP1	Nocardioformes actinomicetes
MLP	Mycobacterium sp. SMKN23, Mycobacterium sp. SMKN22, (nocardioformes actinomicetes)
NB1000	Nitrobacter spp.
NEU	Maioria das halofílicas e halotolerantes nitrosomonas spp.
NIT3	Nitrobacter sp.
Nmo254	Nitrosomonas
Nmo254a	Nitrosomonas
Nso1225	Betaproteobactéria oxidante de amónia
Nso190	Betaproteobactéria oxidante de amónia
Nsp436	Nitrospira
NSR447	Nitrospira spp.
Nsv443	Nitrospira spp.
SNA	Sphaerotilus natans
TNI	Thiothrix nivea
ZAL	Zoogloea ramigera ATCC 19623
ZBE	Zoogloea ramigera ATCC 25935
ZORAM211	Zoogloea ramigera
ZORAM441	Zoogloea ramigera

Potencialmente, o FISH permite a identificação de células individuais, uma vez que a técnica é muito sensível (Amann, 1995a, b; Amann *et al.*, 1995). É também possível quantificar o sinal emitido pelos marcadores e a partir daí obter algumas informações acerca da taxa de crescimento *in situ* de células individuais, muito útil na detecção em fase inicial de desenvolvimento de bactérias filamentosas.

A aplicação desta técnica tem conduzido à alteração da posição taxonómica de alguns filamentos (Tabela 2.5). Em relação à *Microthrix parvicella* é agora sabido ser um *Actinomicete* pouco vulgar (Blackall *et al.*, 1994); o Tipo 0092, o Tipo 0411 e alguns Tipo 1863 são membros do grupo *Cytophaga*, ao passo que outros são *Actinobacter spp.*, o Tipo 0803 é membro da β -Proteobacteria (Blackall *et al.*, 1996b; Bradford *et al.*, 1996) e *Nostocoida limicola* II é membro do grupo *Arthrobacter*, com elevado conteúdo em G + C e *Actinomicete* Gram positivo (L. Blackall *et al.*, não publicado).

Tabela 2.5 - Exemplos de bactérias filamentosas de lamas activadas, em que a sequência 16S rRNA foi determinada. Os Nocardioformes não estão incluídos. Adaptado de Seviour *et al.*, (1999).

Tipo de Filamento	Implicações taxonómicas	Referencia
<i>Haliscomenobacter hydrossis</i>	Membro da <i>Cytophaga-Flavobacterium</i> – Grupo dos bacterioides	Wagner <i>et al.</i> , 1994
<i>Microthrix parvicella</i>	Membro atípico dos <i>Actinomycetes</i>	Blackall <i>et al.</i> , 1994 Rosetti <i>et al.</i> , 1997 a, b
<i>Nostocoida limicola</i> II	Membro do grupo <i>Arthrobacter</i> dos <i>Actinomycetes</i> próximo do <i>Terrabacter</i>	L. Blackall não publicado
<i>Sphaerotilus natans</i>	Membro da β -Proteobacteria próximo do <i>Leptothrix</i> e Tipo 1701	Corstjens e Muyzer, 1993 Wagner <i>et al.</i> , 1994c
<i>Zoogloea ramigera</i>	Membro da β -Proteobacteria	Shin <i>et al.</i> , 1993 Roselló-Mora <i>et al.</i> , 1995
Tipo 021N	Membro da Y-Proteobacteria	Wagner <i>et al.</i> , 1994a
Tipo 0092	Membro da <i>Cytophaga-Flavobacterium</i>	Bradford <i>et al.</i> , 1996
Tipo 0411	Membro da <i>Cytophaga-Flavobacterium</i>	Bradford <i>et al.</i> , 1996
Tipo 0803	Membro da β -Proteobacteria	Bradford <i>et al.</i> , 1996
Tipo 1863	Membro da Y-Proteobacteria pertencente a <i>Acinetobacter</i> e <i>Moraxella</i>	Seviour <i>et al.</i> , 1997
<i>Nostocoida limicola</i> I	Bactéria ácido-lactea baixo conteúdo em G+C, gram positiva	J. R. Liu <i>et al.</i> não publicado

2.4.6 Aplicação do FISH na identificação de algumas bactérias filamentosas

No presente trabalho foi dada especial importância à identificação através da técnica de FISH, das seguintes bactérias filamentosas: Nocardioformes, *Microthrix parvicella* e *Haliscomenobacter hydrossis*.

2.4.6.1 *Nocardioformes*

Devido ao primeiro Actinomicete ramificado, isolado de espumas de lamas activadas ter sido *Nocardia amarae* (actualmente *Gordona amarae*) (Lechevalier & Lechevalier, 1974; Klatté *et al.*, 1994), estas espumas são normalmente referidas como “*Nocardia foams*”(Lemmer & Kroppenstedt, 1984).

Muitos destes Actinomicetes são morfológicamente semelhantes e por essa razão são muitas vezes denominados de NALO (*Nocardia amarae* like organisms), para distinguir de outro tipo morfológico formador de espumas *Nocardia pinensis* (Blackall *et al.*, 1989), actualmente designada de *Skermania piniformis*, por vezes designada por PTLO (Pine tree like organisms) (Chun *et al.*, 1997). Para além da sua semelhança morfológica, possuem uma baixa taxa de crescimento e os seus ciclos de vida são complexos (Stackebrandt *et al.*, 1981), tornando a sua identificação e enumeração difíceis, através de técnicas tradicionais. Esta identificação pode conduzir a erros, associando incorrectamente certos problemas operacionais à presença de uma determinada população microbiana (Manz *et al.*, 1994; Soddell & Seviour, 1990; Wagner *et al.*, 1993), uma vez que depende muito do observador. Estes erros têm contribuído para a dificuldade em prescrever soluções para os problemas de foaming e bulking em ETAR's.

Hernandez *et al.*, (1994) propôs para a identificação de filamentos Actinomicetes, para além dos métodos baseados na morfologia e em culturas, a utilização de sondas imunofluorescentes específicas da *Nocardia* e concluiu que ao serem utilizados os métodos tradicionais de coloração se subestimava a representatividade de *Nocardia*.

Uma sonda de oligonucleótidos específica para a identificação de Nocardioformes actinomicetes (MNP1), presentes em lamas activadas, foi desenvolvida por Schuppler *et al.* (1995) (Tabela 2.6). O mesmo autor, mais tarde, define Nocardioformes como o conjunto dos seguintes géneros: *Corynebacterium*, *Dietzia*, *Gordona*, *Mycobacterium*, *Nocardia*,

Rhodococcus, *Tsukamurella* tendo desenvolvido uma série de sondas, através da comparação da sequência 16S rRNA de actinomicetes nocardioformes (Figura 2.21) (Schuppler *et al.*, 1998).

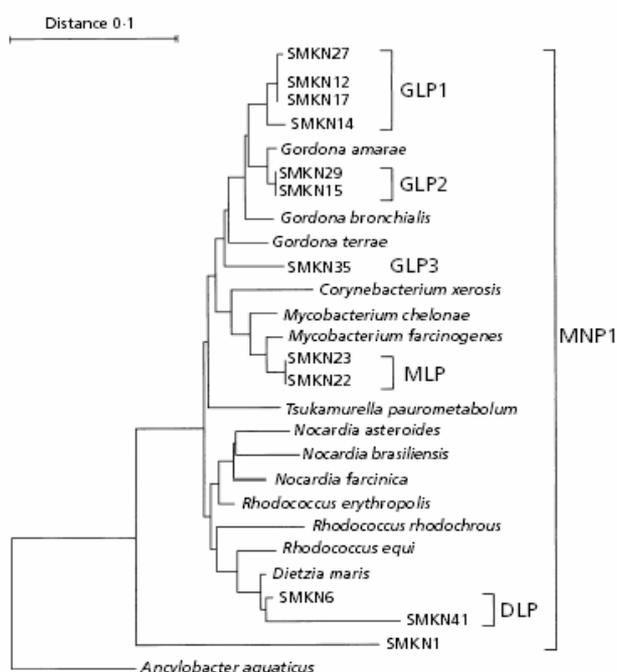


Figura 2.21– Especificidade da sonda MNP1, MLP, DLP, GLP1, GLP2 e GLP3. O diagrama é baseado nas sequências parciais da subunidade 16S rRNA e indica a relação filogenética das bactérias Gram positivas seleccionadas e as sequencias dos clones SMKN originários da análise da sequência 16S rRNA de uma amostra de lamas activadas. Schuppler *et al.*, (1995). A barra de escala representa 10% de diferença em sequência de nucleotídeos. Adaptado de Schuppler *et al.*, (1998).

Uma série de sondas de oligonucleótidos complementares à região 16S rRNA, do grupo Mycolata (Actinomicetes contendo ácidos micólicos), do género *Gordona* e da espécie *Gordona (Nocardia) amarae* (Tabela 2.6) foram desenvolvidas por de los Reyes *et al.* (1997) (Figura 2.22). Estas sondas permitiram a identificação e enumeração *in situ* destes microrganismos pertencentes a diferentes níveis filogenéticos, através da técnica de FISH. No entanto, *Gordona amarae* demonstrou grande variabilidade da resposta à sonda desenvolvida, devido à heterogeneidade da sequência da pequena subunidade de rDNA (de los Reyes *et al.*, 1998a). Estes autores propuseram uma nova sonda para a identificação da *Gordona amarae* e outras duas sondas para a distinção de dois grupos presentes nesta espécie (Tabela 2.6) (de los Reyes *et al.*, 1998b).

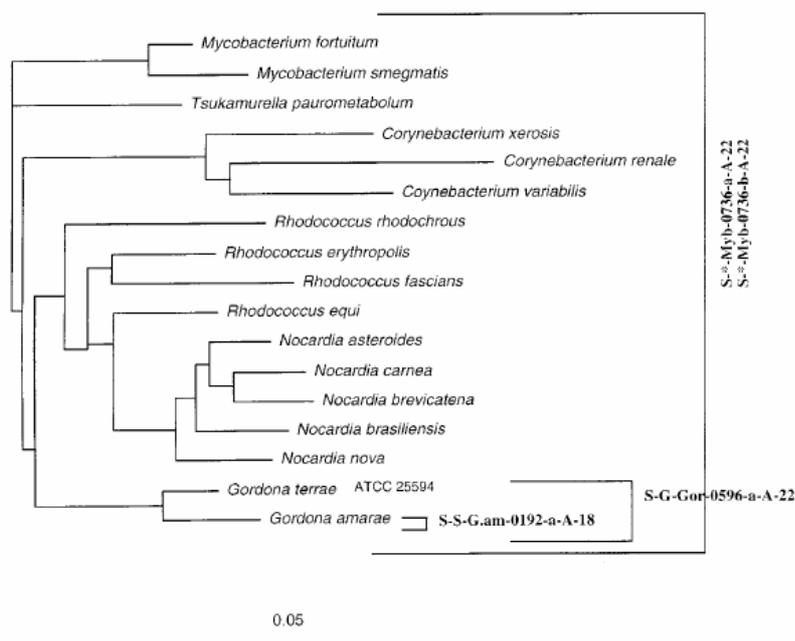


Figura 2.22 - Árvore filogenética mostrando os Actinomicetes mais representativos construída a partir da comparação das sequências de rRNA da pequena subunidade ribossomal. A barra representa 5 alterações estimadas por 100 nucleótidos. As sondas de oligonucleótidos estão assinaladas com o respectivo grupo alvo. Adaptado de de los Reyes *et al.* (1997).

Relativamente à filogenia do grupo Mycolata esta tem sido muito estudada através da análise da sequência da pequena subunidade do rRNA. Klattec *et al.*, (1994) propôs a reclassificação da *Nocardia amarae*, desde há muito associada ao foaming, ao género *Gordona* como *Gordona amarae*.

Tabela 2.6 - Principais sondas para Nocardioformes

Sondas	Grupo alvo	Referencias
MNPI	<i>Nocardioformes actinomicetes</i>	Schuppler <i>et al.</i> , 1995
S-*-Myb-0736-a-A-22	<i>Mycolata</i>	De los Reyes <i>et al.</i> , 1997
S-*- Myb-0736 -b-A22	<i>Mycolata</i>	De los Reyes <i>et al.</i> , 1997
S-G-Gor-0596-a-A-22	Género <i>Gordona</i>	De los Reyes <i>et al.</i> , 1997
S-S-G.am-0191-a-A-19	<i>Gordona amarae</i>	De los Reyes <i>et al.</i> , 1998a
S-S-G.am-0205-a-A-19	<i>Gordona amarae</i>	De Los Reyes <i>et al.</i> , 1998b
S-*-G.am1-0439-a-A-19	<i>G. amarae</i> grupo 1	De Los Reyes <i>et al.</i> , 1998b
S-*-G.am2-0439-a-A-19	<i>G. amarae</i> grupo 2	De Los Reyes <i>et al.</i> , 1998b

Goodfellow e colaboradores (Chun *et al.*, 1997, 1996) distinguiram duas linhagens supragenéricas e propuseram que a Mycolata pode ser agrupada em duas famílias a família

Corynebacteriaceae que contém os gêneros *Corynebacterium*, *Dietzia* e *Turicella* e a família *Mycobacteriaceae* que contém os gêneros *Gordona*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Tsukamurella* e *Skermania*.

Stackebrantl *et al.*, (1997) propôs uma subordem dentro da ordem *Actinomycetales*, a subordem *Corynebacterineae* que inclui as famílias *Nocardiaceae*, *Gordoniaceae*, *Mycobacteriaceae*, *Dietziaceae*, *Tsukamurellaceae* e *Corynebacteriaceae*. Propuseram ainda que o gênero *Gordona* deveria ser denominado de *Gordonia*.

2.4.6.2 *Microthrix parvicella*

Microthrix parvicella foi descrita pela primeira vez por Pasveer (1969). Mais tarde, van Veen (1973), atribuiu-lhe o nome e descreveu algumas das suas características incluindo a sua morfologia, dimensões do tricoma, propriedades face a colorações e a presença de inclusões intracelulares. Como a maioria das bactérias filamentosas são difíceis de isolar e de crescer em cultura pura, pouco é sabido do seu metabolismo e por isso, *Microthrix parvicella* foi recentemente designada de *Candidatus Microthrix parvicella*. Esta designação foi criada para englobar as bactérias sobre as quais ainda não existe informação suficiente para validar o nome (Bradford *et al.*, 1998).

A sua posição filogenética foi determinada através da análise comparativa da sequência 16S rRNA, concluindo-se pertencer ao sub-filo das bactérias Gram positivas, com grande conteúdo em G+C (Actinomicetes) (Blackall *et al.*, 1994).

Várias sondas de oligonucleótidos complementares à sequência 16s rRNA (MPA60, MPA223, MPA645) foram desenvolvidas, permitindo a sua identificação em lamas activadas através de hibridização *in situ* (Erhart *et al.*, 1997).

2.4.6.3 *Haliscomenobacter hydrossis*

Utilizando as técnicas clássicas de coloração para a identificação de bactérias alguns filamentos, entre os quais a *Haliscomenobacter hydrossis*, membro do grupo dos bacterioides *Flavobacterium cytophaga* (Gherna & Woese, 1992), foram descritos por van Veen *et al.*, (1973), como formas filamentosas. A *Haliscomenobacter spp.*, assim como, as bactérias *Sphaerotilus spp.*, *Thiothrix spp.*, Eikelboom Tipo 021N, entre outras, representam uma grande parte das bactérias filamentosas Gram negativas das lamas activadas.

Wagner e seus colaboradores desenvolveram uma série de sondas específicas (Tabela 2.7) para a identificação *in situ* destas bactérias filamentosas (Wagner *et al.*, 1994).

Tabela 2.7 - Sondas para as principais bactérias filamentosas Gram negativas

Sonda	Alvo	Referência
HHY	<i>Haliscomenobacter hydrossis</i>	Wagner <i>et al.</i> , 1994
TNI	<i>Thiothrix nivea</i>	
SNA	<i>Sphaerotilus natans</i>	
21N	Eikelboom Tipo 021N	

2.4.7 O futuro do FISH em lamas activadas

Ainda existe um longo caminho a percorrer no que se refere à técnica de FISH aplicada à identificação de bactérias filamentosas em lamas activadas. Provavelmente os principais desenvolvimentos terão a ver com a automatização do método de hibridização. Com a tecnologia de chips de microrrays/DNA (Ehrmann *et al.*, 1994; Guschin, *et al.*, 1997) as amostras ambientais poderão ser hibridizadas com centenas de milhares de diferentes sondas em simultâneo.

Outro desenvolvimento será a combinação da análise da composição microbiana de comunidades, através de sondas, com a avaliação *in situ* da sua função. Recentes estudos têm combinado o FISH com microsensores (ex. Schramm *et al.*, 1996, 1999) e microautoradiografia (Lee, *et al.*, 1999, Ouverney, *et al.*, 1999). Nestes estudos é possível obter informação ecológica importante a partir do ambiente físico-químico, sendo identificadas as células microbianas e os respectivos substratos.

Estudos combinando a estrutura e função de uma comunidade, aplicando estas ou outras técnicas, promoverão no futuro o entendimento das interacções das espécies microbianas com o seu ambiente.

No caso das lamas activadas, em particular, os métodos moleculares irão certamente provider os microbiologistas de ferramentas apropriadas, para o estudo da ecologia e da dinâmica de populações.

3. Materiais e Métodos

Neste capítulo são descritos os métodos clássicos de identificação de bactérias filamentosas, assim como, o método de hibridização *in situ* de fluorescência (FISH). Também se apresenta a descrição do método utilizado para o cálculo do Índice Biológico de Lamas.

3.1 Amostragem

Período de amostragem

A fim de estudar a biodiversidade microbiológica do processo de lamas activadas de uma ETAR municipal, foram recolhidas amostras dos tanques de arejamento, no período compreendido entre Janeiro e Junho de 2003, completando um total de 18 pontos de amostragem.

Amostragem e preservação de amostras

As amostras foram recolhidas e seguidamente transportadas para o laboratório, sendo o espaço de tempo compreendido entre a recolha e a chegada ao laboratório inferior a 15 minutos. Por essa razão, não foi necessário arejamento e refrigeração no seu transporte. No laboratório, as amostras destinadas à observação de protozoários foram arejadas e as destinadas à identificação de filamentosas foram refrigeradas a 4°C, até ao momento da sua fixação para FISH e da realização das colorações.

3.2 Métodos clássicos de identificação de bactérias filamentosas

Aplicaram-se métodos clássicos de identificação de bactérias filamentosas, tendo como base as características morfológicas, bioquímicas e de coloração. Foram visualizadas amostras de lama fresca em contraste de fase, para determinação de algumas características morfológicas, e visualizadas amostras coradas, em campo claro, para completar a identificação.

A aplicação de corantes como auxiliares da análise microscópica de lamas activadas permite identificar organismos ou porções desses organismos, facilitando a observação de características que ajudam na diferenciação e identificação. Existem inúmeras colorações utilizadas em análises microbiológicas, mas na avaliação da biomassa dos sistemas de lamas activadas só algumas são relevantes. Neste trabalho foram utilizadas as colorações de Gram e de Neisser.

3.2.1 Coloração de Gram

Princípio

A coloração de Gram é considerada uma coloração diferencial, que se baseia na permeabilidade da membrana celular, sendo esta maior nas bactérias Gram negativas e menor nas bactérias Gram positivas. Neste tipo de coloração, o corante cristal violeta entra dentro da célula e complexa-se com o iodo. Devido à maior permeabilidade das Gram negativas, o complexo cristal violeta/iodo é extraído da célula devido à ação de um descolorante, permitindo por sua vez, a admissão do segundo corante a safranina, resultando numa coloração final em tons de vermelho. No caso das bactérias Gram positivas o complexo cristal violeta/iodo é retido, resultando uma coloração azul escura.

Material

Solução 1 - Preparar separadamente Solução 1A e Solução 1B e juntá-las;

Solução 1A - Dissolver 2g Cristal violeta em 20 ml de etanol 95%;

Solução 1B - Dissolver 0.8 g oxalato de amónio em 80 ml de água destilada;

Solução 2 - Dissolver 1 g iodo e 2 g de iodeto de potássio em 300 ml de água destilada;

Solução 3 – Juntar 10 ml de safranina a 100 ml de água destilada.

Método Hucker modificado (Spigoni, *et al.*, 1992)

- 1- Numa lâmina, colocar uma pequena quantidade de lama fresca e deixar secar ao ar;
- 2- Depois de seca, mergulhar na solução 1 durante 1 minuto e em seguida lavar com água;
- 3- Mergulhar na solução 2 durante 1 minuto e em seguida lavar com água;
- 4- Lavar a lâmina com solução descolorante ou álcool a 95% à gota durante 25 segundos e seguidamente enxaguar com papel absorvente;
- 5- Mergulhar na solução 3 durante 1 minuto e lavar com água;

- 6- Enxaguar com papel absorvente.

3.2.2 Coloração de Neisser

Princípio

A identificação da presença de grânulos intracelulares de reserva energética em algumas espécies bacterianas, pode ser valorizada como uma forma de diferenciação. Esta reserva energética pode consistir em grânulos de polifosfato, não visíveis sem tratamento com um corante, que reage selectivamente com os químicos presentes. O corante principal é o azul-de-metileno que é catiónico e liga-se a locais aniônicos das cadeias poliméricas de polifosfato, corando-os de lilás, originando uma reacção Neisser positiva (Lindrea, *et al.*, 1999). Com esta coloração, cujo mecanismo biológico não é completamente conhecido, os filamentos são distinguidos entre Neisser positivo, Neisser negativo e com grânulos Neisser positivos (Madoni, *et al.*, 1996).

Material

Solução 1 - Preparar separadamente a Solução 1A e Solução 1B e no momento da utilização misturar 2 partes da Solução 1A e 1 parte da Solução 1B;

Solução 1A – Dissolver 0.1 g de azul de metileno em: 5 ml de etanol 95%, 5 ml de ácido acético glacial e 100 ml de água destilada;

Solução 1B – Misturar 3.3 ml de cristal violeta, 6.7 ml de etanol 95% e 100 ml de água destilada;

Solução 2 – Misturar 33.3 ml de castanho de bismarque com 66.7 ml de água destilada.

Método (Jenkins *et al.*, 1986)

- 1- Numa lâmina, colocar uma pequena quantidade de lama fresca e deixar secar ao ar;
- 2- Mergulhar na solução 1 durante 30 segundos e lavar com água;

- 3- Mergulhar na solução 2 durante 1 minuto e lavar com água;
- 4- Enxaguar com papel absorvente

3.2.3 Observação microscópica e aquisição de imagens

Depois da observação das características gerais de lama com baixa ampliação, passa-se à identificação dos organismos filamentosos, através da sua reacção à coloração Gram e Neisser. Observando-se as características morfológicas como: ramificações, forma do filamento, localização do filamento, dimensão, eventual crescimento sésil, presença ou ausência de bainha, forma das células, visualização do septo e grânulos de reserva.

A abundância relativa é avaliada qualitativamente, de acordo com as seis categorias propostas por Jenkins *et al.*, (1986) (Tabela 3.1). Depois da observação de um certo número de flocos das lamas é atribuída a categoria mais adequada à situação em questão.

Tabela 3.1 - Categorias de abundância dos organismos filamentosos em lamas activadas. Adaptado de Jenkins *et al.*, (1986).

Classe	Abundância	Observação
0	Nenhum	Completa ausência de filamentos
1	Poucos	Filamentos observados só em alguns flocos ocasionalmente
2	Alguns	Filamentos presentes mas não em todos os flocos
3	Moderado	Filamentos observados em todos os flocos, mas com baixa densidade (1 a 5 filamentos por floco)
4	Frequente	Filamentos observados em todos os flocos, com média densidade (5 a 20 filamentos por floco)
5	Abundante	Filamentos observados em todos os flocos, com alta densidade (no mínimo 20 filamentos por floco)
6	Excessivo	Filamentos presentes em todos os flocos, existem mais filamentos que flocos, os flocos invadem quase completamente o espaço entre flocos.

As lâminas são examinadas usando o microscópio Laborlux S (Leitz, Germany), sendo a observação realizada em campo claro e em contraste de fase, com ampliações de 400x e 1000x.

As imagens são capturadas a partir de uma câmara Axio-Cam HRC (Carl Zeiss, West Germany) e adquiridas através do software de análise de imagem Axiovision 3.1 (Carl Zeiss).

3.3 Estudo da Comunidade de Protozoários

3.3.1 Cálculo de IBL (Índice Biótico de Lamas)

O cálculo do índice biótico de lamas, teve como base o método desenvolvido por Madoni, (1994).

Princípio

Este método é baseado, quer na diferente sensibilidade mostrada por alguns grupos da microfauna aos principais parâmetros físicos, químicos prevalentes no sistema, quer na abundância e diversidade específica da comunidade de microfauna. Isto permite definir a qualidade biológica das lamas, mediante valores numéricos convencionados (índice biótico) (Madoni, *et al*, 1996).

Método

- 1- Numa lâmina colocar 25 µl de lama fresca,
- 2- Fazer a montagem com lamela, de forma a não produzir bolhas de ar;
- 3- Proceder à identificação das espécies existentes de protozoários e sua quantificação.

O índice é atribuído à lama activada, mediante o uso de uma tabela de duas entradas (Tabela 3.2).

Forma de utilização da tabela de duas entradas

No lado esquerdo da tabela temos as considerações relativas ao grupo dominante ou prevalente e a densidade total de microfauna (em indivíduos por litro). À medida que se desce na tabela está associada uma qualidade biológica decrescente. No lado direito da tabela estão representadas quatro classes, conforme o número total de espécies que constituem a

microfauna (excluindo flagelados) da lama e a densidade de flagelados (F), contabilizados na diagonal da câmara de Fucks-Rosenthal.

Para a determinação do IBL é necessário seleccionar a linha correspondente ao grupo dominante de microfauna e ter em atenção a densidade total da microfauna (maior ou menor a 10^6 ind./l ou 1 ind./ μ l). No caso de haver dois grupos dominantes, escolhe-se o grupo que ocupa a posição mais baixa.

A coluna é seleccionada tendo em conta o número total de unidades sistemáticas que compõem a microfauna, da nossa lama e a densidade total de pequenos flagelados.

O valor de IBL é determinado pela intercepção da linha e da coluna seleccionadas.

Tabela 3.2 - Tabela de duas entradas para cálculo do IBL

Grupo dominante ou prevalente	Dens. (ind./l)	>10		8-10		5-7		<5	
		F<10	10<F<100	F<10	10<F<100	F<10	10<F<100	F<10	10<F<100
Ciliados móveis+ sésseies* e/ou amiba c/ teca	$\geq 10^6$	10	8	9	7	8	6	7	5
	$< 10^6$	9	7	8	6	7	5	6	4
Ciliados sésseies* >80%	$\geq 10^6$	9	7	8	6	7	5	6	4
	$< 10^6$	8	6	7	5	6	4	5	3
Operculária spp.	$\geq 10^6$	7	5	6	4	5	3	4	2
	$< 10^6$	6	4	5	3	4	2	3	1
Vorticella microstoma	$\geq 10^6$	6	4	5	3	4	2	3	1
	$< 10^6$	5	3	4	2	3	1	2	0
Cilados nadadores	$\geq 10^6$	5	3	4	2	3	1	2	0
	$< 10^6$	4	2	3	1	2	0	1	0
Pequenos Flagelados (>100)Y	$\geq 10^6$	4		3		2		1	
	$< 10^6$	3		2		1		0	

* Operculária e Vorticella microstoma não abundante

Y – n.º de flagelados na diagonal da câmara de Fuchs-Rosenthal

A tabela de duas entradas permite atribuir valores entre 0 e 10 à qualidade biológica da lama, tendo como base dois critérios:

- a diferente sensibilidade mostrada pelos grupos de microfauna às condições ambientais;
- o efeito que tais condições produzem, quer na sua densidade, quer na riqueza em espécies da microfauna.

Por fim, os valores de IBL são agrupados em quatro classes de qualidade, designadas por um número romano (Tabela 3.3). Estas classes permitem representar a qualidade biológica das lammas, mediante quatro classes mais amplas e de valor fidedigno.

Tabela 3.3 - Conversão do valor de IBL em classes de qualidade biológica das lammas e avaliação da eficiência depuradora do tratamento

Valores IBL	Classe	Avaliação
8 – 10	I	Lamas bem colonizadas e estáveis; actividade biológica óptima; elevada eficiência depuradora
6 – 7	II	Lamas bem colonizadas e estáveis; actividade sub-optimal; eficiencia de puradora suficiente
4 – 5	III	Actividade biológica insuficiente, eficiência depuradora medíocre
0 – 3	IV	Actividade biológica muito baixa; eficiência depuradora baixa

3.3.2 Observação microscópica e aquisição de imagens

As lâminas são examinadas usando o microscópio Laborlux S (Leitz, Germany) sendo a observação realizada em campo claro com ampliação de 250x e 400x. As imagens são capturadas a partir de uma câmara Axio-Cam HRC (Carl Zeiss, West Germany) e adquiridas através do software de análise de imagem Axiovision 3.1 (Carl Zeiss).

3.4 Métodos Moleculares – Hibridização *in situ* de Fluorescência

3.4.1 Fixação de células

Princípio

Durante a hibridização, as células são expostas a elevadas temperaturas, detergentes e gradientes osmóticos. Por esta razão, a fixação é essencial para a manutenção da integridade morfológica das células. Normalmente usa-se uma solução 4% de paraformaldeído em PBS (“phosphate buffered saline”) como fixante, no caso de bactérias Gram negativas. As bactérias Gram positivas possuem a parede celular mais espessa apresentando menor permeabilidade à sonda, quando fixadas com paraformaldeído. Neste caso faz-se uma fixação com etanol/PBS.

A autofluorescência da matéria orgânica pode ser reduzida, se a fixação for realizada num período inferior a 24 horas após a recolha.

Soluções

Solução de PBS (100 ml) - Adicionar: 0.8 g de NaCl, 0.02 g de KCl, 0.144 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.024 g de KH_2PO_4 . Perfazer o matraz com 100 ml de água Milli-Q, ajustar o pH a 7.4. Filtrar com acrodisco estéril e esterilizar a 121°C, durante 15 min.

4 % Paraformaldeído (50 ml) - Adicionar 2 g de paraformaldeído a 30 ml de água Milli-Q, num tubo de greiner esterilizado. Adicionar 100 μl de 1M NaOH. Aquecer em banho-maria, no microondas à potência mínima 240W (a +/- 50°C), por curtos períodos, dissolvendo suavemente com toques suaves no fundo do tubo. Adicionar 16.6 ml de PBS 3x concentrado, com pipeta esterilizada e ajustar o pH a 7.2 com HCl fumante. Perfazer até 50 ml com água Milli-Q e filtrar com acrodisco estéril. Guardar a 4°C no máximo durante 5 dias.

Solução de PBS 3x concentrada (100 ml) - Adicionar: 2.4 g de NaCl, 0.06 g de KCl, 0.43 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.072 g de KH_2PO_4 . Perfazer o matraz com 100 ml de água Milli-Q e ajustar o pH a 7.4. Filtrar com acrodisco estéril e esterilizar a 121°C durante 15 min.

Procedimento para Gram negativas, segundo Amann, *et al* (1990a)

- 1- Centrifugar as células durante 2 min, a 5000g;
- 2- Lavar e ressuspender em 1 ml de PBS;
- 3- Centrifugar de novo e verter o sobrenadante;
- 4- Adicionar 330 μl de PBS e ressuspender;
- 5- Adicionar 1 ml de Paraformaldeído a 4%;
- 6- Incubar a 4°C durante a noite;

- 7- Centrifugar as células durante 2 min à velocidade máxima;
- 8- Remover o sobrenadante;
- 9- Lavar com 1 ml de PBS;
- 10- Centrifugar de novo e ressuspender com 500 µl de PBS;
- 11- Adicionar 500 µl de etanol 96% e guardar a -20°C.

Procedimento para Gram positivas, segundo Roller *et al.* (1994)

- 1- Centrifugar as células durante 2 min, a 5000g;
- 2- Lavar e ressuspender em 1 ml de PBS;
- 3- Centrifugar de novo e verter o sobrenadante;
- 4- Ressuspender com 500 µl de etanol e 500 µl de PBS
- 5- Guardar a -20°C.

3.4.2 Preparação das lâminas

Princípio

São utilizadas lâminas de teflon com 10 poços. Estas lâminas são as recomendadas pois possuem uma superfície hidrofóbica de teflon que previne a mistura de sondas aplicadas em poços diferentes.

Soluções

Solução de gelatina - Adicionar 0.1% de gelatina e 0.01% CrK(SO₄)₂, dissolver num banho a 70°C e filtrar de seguida.

Procedimento

- 1- Colocar as lâminas limpas na solução de gelatina durante 1 minuto;
- 2- Escorrer e deixar secar durante a noite à temperatura ambiente.

3.4.3 Hibridização

O princípio do método foi desenvolvido em pormenor no capítulo I desta tese, uma vez que a optimização deste método, aplicado à identificação de bactérias filamentosas de lamas activadas é parte fundamental deste trabalho.

Soluções

Solução stock das sondas – No eppendorf onde se encontra a sonda, adicionar água Milli-Q de forma a obter-se uma concentração de 100 pmol/ μ l.

Solução de trabalho das sondas – Num eppendorf, colocar 90 μ l de água Milli-Q e 10 μ l de solução stock, de forma a obter uma solução com a concentração de 10 pmol/ μ l.

Solução de sulfato dodecil de sódio (SDS) a 10% (p/v) – Dissolver 10 g de SDS em 100 ml de água Milli-Q.

Solução de 4',6-diamidino-2-fenilindole (DAPI) a 0.1% (p/v) – Dissolver 0.1 g de DAPI em 100 ml de PBS.

Solução de hibridização – Adicionar num eppendorf 180 μ l de NaCl 5 M e 20 μ l de Tris/HCl 1 M pH 8.0. Adicionar formamida e água Milli-Q de acordo com a Tabela 3.4, e adicionar 2 μ l de SDS a 10 % (p/v).

Tabela 3.4 - Percentagem de formamida na solução de hibridização.

% Formamida (v/v)	Formamida (µl)	Milli-Q (µl)
0	0	800
5	50	750
10	100	700
15	150	650
20	200	600
25	250	550
30	300	500
35	350	450
40	400	400
45	450	350
50	500	300
55	550	250
60	600	200
65	650	150
70	700	100
80	800	0

Solução de lavagem – Adicionar 1 ml de Tris/HCl 1 M pH 8.0, e NaCl 5 M de acordo com a Tabela 3.5.

Tabela 3.5 - Volume de NaCl a adicionar à solução de lavagem de acordo com a percentagem de formamida.

% Formamida no tampão de hibridização	Concentração final NaCl (mol/l)	Volume de NaCl 5 M (µl)*
0	0.900	9000
5	0.636	6300
10	0.450	4500
15	0.318	3180
20	0.225	2150
25	0.159	1490
30	0.112	1020
35	0.080	700
40	0.056	460
45	0.040	300
50	0.028	180
55	0.020	100
60	0.008	40
70	0.000	Não adicionar NaCl **
80	0.000	Não adicionar NaCl ***

* A partir de 20% de formamida adicionar 500µl de EDTA 5M a pH 8.0

** Adicionar 350 µl de EDTA 5M a pH 8.0

*** Adicionar 175 µl de EDTA 5M a pH 8.0

Adicionar opcionalmente 50 µl de 10% (p/v) SDS, perfazer o volume de 50 ml com água Milli-Q. Pré-aquecer o tampão de lavagem à temperatura de lavagem.

Solução de lisozima (1 ml) - Adicionar 5 mg de lisozima em Tris/HCl 100 mM a pH 7.5 e EDTA 5 mM.

Solução de mutanolisina (1 ml) – Adicionar 5000 U de mutanolisina em 1 ml de solução de fosfato de potássio 0.1M a pH 6.8

Procedimento segundo Amann *et al.* (1990 b)

- 1- Colocar 10 µl de amostra fixada nos poços das lâminas de Teflon revestidas a gelatina e secar durante 10 min a 46°C;
- 2- Preparar o tampão de hibridização e mantê-lo à temperatura ambiente;
- 3- No caso de haver necessidade de aumentar a permeabilidade das células adicionar 10 µl de solução de lisozima ou mutanolisina e deixar 10 – 20 min a 37°C;
- 4- Desidratar, passando as lâminas por soluções de etanol com concentrações de 50, 80, 96% (v/v), durante 3 min em cada solução;
- 5- Secar e deixar à temperatura ambiente até ao máximo de um mês.

* *No escuro*

- 1- Descongelar as sondas de oligonucleótidos, de forma a não apanharem luz;
- 2- Colocar 10 µl de tampão de hibridização nos poços;

- 3- Adicionar 1 μl de cada sonda (a solução de trabalho tem concentração de 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ para as sondas com marcador Cy3 e FLUOS) sem tocar na superfície da lâmina.

A hibridização é feita numa caixa escura apropriada de forma a prevenir a evaporação da solução de hibridização, caso contrário poderia provocar a ligação não específica da sonda às células.

- 4- Preparar a caixa de hibridização, colocando no fundo um pouco de papel embebido no resto do tampão de hibridização. Colocar a lâmina imediatamente na caixa e incubar à temperatura e durante o tempo ideal de hibridização;

A temperatura de hibridização depende da temperatura de dissociação (T_d) dos oligonucleotídeos e tem de ser empiricamente otimizada. Temperaturas muito altas danificam as células fixadas.

- 5- Entretanto, preparar o tampão de lavagem (ter em atenção que não pode apanhar luz, colocar papel de alumínio à volta do tubo de greiner) e pré aquecê-lo no banho, à temperatura ideal de lavagem;

A “stringency” da lavagem pode ser aumentada baixando a concentração de cloreto de sódio.

- 6- Lavar rapidamente as lâminas, com tampão de lavagem, para retirar a solução de hibridização, e incubá-las no tampão de lavagem, com 50 μl de 0.1% de 4',6-diamidino-2-fenilindole (DAPI), durante 5-20 min, num banho pré-aquecido à temperatura ideal de lavagem;
- 7- Remover o tampão de lavagem com água destilada a 4°C, tentando não retirar as células e secar a lâmina rapidamente, com ar comprimido;

- 8- Colocar quatro gotas de meio de montagem para fluorescência (Vectashilde) e cobrir com a lamela cuidadosamente e de forma a espalhar o Vectashilde;
- 9- Pincelar os bordos com verniz das unhas;
- 10- Se não utilizar de imediato, armazenar a -20°C no escuro.

Sondas

Na identificação das bactérias filamentosas, através de FISH, foram utilizadas as seguintes sondas de oligonucleótidos: MPA645, GOR596, HHY MNP1, CHL1851, EUB338. Estas sondas são complementares à região 16S do rRNA das seguintes bactérias filamentosas, respectivamente: *Microthrix parvicella*, *Gordonia*, *Haliscomenobacter hydrossis*, Nocardioformes, Tipo 1851 e domínio bactéria (Tabela 3.6).

As condições de hibridização foram determinadas para cada sonda e a integridade das células foi comprovada através da coloração com DAPI.

Tabela 3.6 - Descrição das sondas de oligonucleótidos utilizadas nas hibridizações.

SONDA	SEQUÊNCIA	% GC	ALVO	Referências
MPA645	5' – CCG GAC TCT AGT CAG AGC – 3'	61.1	<i>Microthrix parvicella</i>	Erhart <i>et al.</i> , (1997)
GOR596	5' – TGC AGA ATT TCA CAG ACG ACG C – 3'	50	.Gordonea	De los Reyes <i>et al.</i> , (1997)
HHY	5' – GCC TAC CTC AAC CTG ATT – 3'	50	<i>Haliscomenobacter hydrossis</i>	Wagner <i>et al.</i> , (1994)
MNP1	5' – GCT GCC TCC CGT AGG AGT – 3'	52.4	<i>Nocardioformes sp.</i>	Schuppler <i>et al.</i> , (1995)
CHL1851	5' – AAT TCC ACG AAC CTC TGC CA – 3'	50	Tipo 1851	Beer <i>et al.</i> , (2002)
EUB338	5' – TTA GAC CCA GTT TCC CAG GCT – 3'	66.7	Domínio bactéria	Sthal & Amann, (1991)

Temperatura de hibridização e lavagem

A temperatura de hibridização depende da temperatura de dissociação (Td) dos oligonucleotidos, e tem de ser empiricamente otimizada. A utilização de temperaturas muito altas danifica as células fixadas.

Nas hibridizações efectuadas, optou-se por usar a temperatura de hibridização de 46°C, e a temperatura de lavagem de 48°C, fazendo variar a percentagem de formamida, para aumentar a “stringency” de cada sonda.

3.4.4 Observação microscópica e aquisição de imagens

As lâminas foram observadas através de um microscópio de fluorescência Zeiss Axioskope (Carl Zeiss, West Germany), dotado de lâmpada de mercúrio com potência de 50 W. As observações foram realizadas com ampliação de 1000x. Foram utilizados filtros específicos para DAPI (filtro Zeiss n.º 01), fluoresceína (FLUOS) (filtro Zeiss n.º 09) e Cy3 (filtro Zeiss n.º 15) (Tabela 3.7).

Tabela 3.7 - Comprimentos de onda de excitação emissão dos vários fluorocromos.

FLUOROCROMO	λ EXCITAÇÃO (nm)	λ EMISSÃO (nm)
Fluoresceína	488	525
Cy3	540	575
DAPI	372	456

As imagens foram capturadas, a partir de uma câmara Axio-Cam (Carl Zeiss, West Germany) e com o software de análise de imagem Axiovision 3.1 (Carl Zeiss).

Algumas amostras foram também observadas em microscópio confocal LSM 510 Meta (Carl Zeiss, Germany).

4. Resultados e Discussão

Neste capítulo são apresentados os resultados obtidos com a utilização dos métodos clássicos e o com método de hibridização *in situ* de fluorescência, na identificação de algumas bactérias filamentosas. São descritas limitações destes dois métodos. São também apresentados os resultados da monitorização da comunidade de protozoários e as suas limitações.

4.1 Métodos clássicos de identificação de bactérias filamentosas

Durante o período de monitorização da biodiversidade microbiana, do processo de lamas activadas de uma ETAR municipal, foram identificadas várias bactérias filamentosas, através das colorações de Gram e Neisser.

4.1.1 Coloração de Gram

As principais bactérias Gram positivas identificadas foram: *Microthrix parvicella* e Nocardioformes (Figura 4.1e Figura 4.2).



Figura 4.1 - Nocardioformes C.C. Barra = 5 μ m

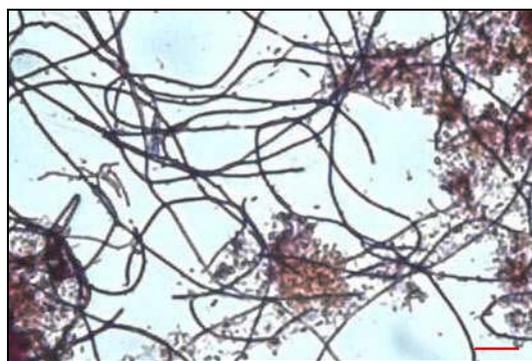


Figura 4.2 - *Microthrix parvicella* C.C. Barra = 10 μ m

As principais bactérias filamentosas Gram negativas identificadas foram: *Haliscomenobacter hydrossis*, Tipo 411, Tipo 0961 e *Nostocoida limicola II* (Figura 4.3, Figura 4.4, Figura 4.5 e Figura 4.6). Também foi frequente a identificação de uma bactéria possivelmente Tipo 1863.

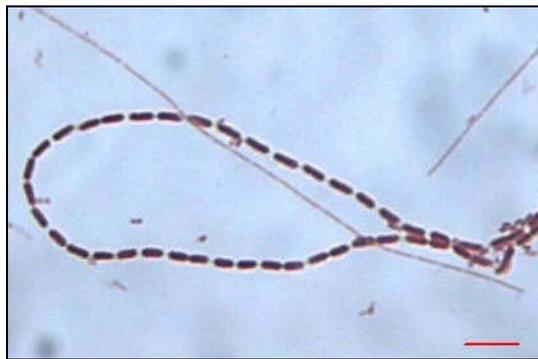


Figura 4.3 - Tipo 1863 C.C. Barra = 5 μm



Figura 4.4 - Tipo 411 C.C. Barra = 5 μm



Figura 4.5 - *Haliscomenobacter hydrossis* C.C.
Barra = 5 μm



Figura 4.6 - Tipo 0961 C.C. Barra = 5 μm

4.1.2 Coloração de Neisser

Uma das espécies Neisser positiva identificada foi *Nostocoida limicola* II (Figura 4.7).



Figura 4.7 - *Nostocoida limicola* II C.C. Barra = 5 μm

Alguns dos organismos Neisser negativos, com grânulos positivos identificados foram *Microthrix parvicella* e Nocardioformes (Figura 4.8 e Figura 4.9).

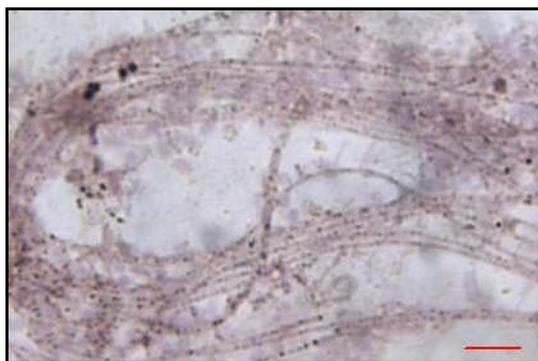


Figura 4.8 - *Microthrix parvicella* C.C. Barra = 5 μ m



Figura 4.9 – Nocardioformes C.C. Barra = 5 μ m

4.1.3 Evolução da abundância das bactérias filamentosas ao longo do tempo de amostragem

Relativamente à abundância de bactérias filamentosas podemos considerar três períodos distintos. O período compreendido entre 31 de Janeiro e 30 de Abril é caracterizado por uma abundância elevada de bactérias filamentosas, onde predominam as bactérias Gram positivas *Microthrix parvicella* e Nocardioformes (Tabela 4.1). O crescimento excessivo destas bactérias está associado a baixos valores de F/M (0.05 – 0.2 Kg CBO₅/Kg SSV.d), a baixa concentração de oxigénio dissolvido e a elevado conteúdo em óleos, gorduras ou substâncias tensioactivas no efluente.

Ao longo deste período houve um aumento gradual das bactérias Gram negativas *Halicomenobacter hydroxsis* e Tipo 411. As bactérias Gram negativas *Nostocoida limicola* I e II, Tipo 961 e Tipo 803 estiveram também presentes com uma abundância moderada e de uma forma irregular ao longo do tempo (Figura 4.11).

Em particular, a bactéria *Microthrix parvicella* apresentava-se com uma disposição em feixes pouco habitual, facto que suscitou algumas dúvidas quanto à sua identificação (Figura 4.10). O mesmo aconteceu com os Tipos 914 e 961 devido à sua grande semelhança.

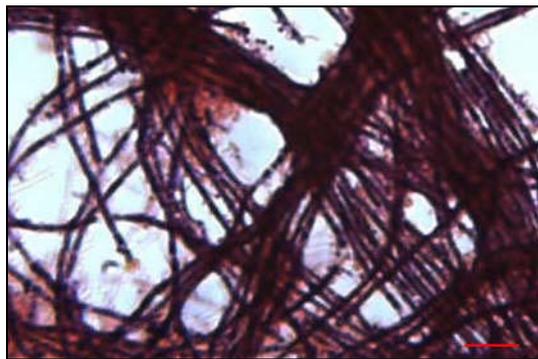


Figura 4.10 - Disposição não descrita da *Microthrix parvicella* C.C. Barra = 5 µm

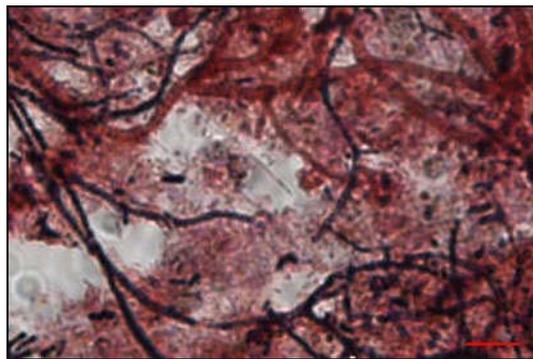


Figura 4.11 - Aspecto geral da lama C.C. Barra = 10 µm

Tabela 4.1 – Abundância relativa das bactérias filamentosas na 1ª fase de amostragem.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Espécie	30-Jan	07-Fev	13-Fev	20-Fev	27-Fev	06-Mar	13-Mar	20-Mar	27-Mar	10-Abr
<i>Microthrix parvicella</i>	*****	*****	****	***	**	***	****	****	***	***
<i>Nocardioformes</i>	**	***	****	*****	****	****	****	****	*****	*****
<i>Nostocoida l. II</i>	*	*	*	*	**	**	**	***	**	**
<i>Haliscomenobacter hydrossis</i>	*	**	***	***	***	***	***	***	***	****
Tipo 803	*	**	*	*	*	*	*	*	**	***
Tipo 961	*	0	0	0	**	0	0	0	0	0
Tipo 411	*	**	***	***	**	***	***	**	***	****
Tipo 1851	0	*	*	0	0	0	0	0	*	*
<i>Thiothrix</i>	0	0	0	*	*	0	0	0	0	0

0 Nenhum; *Pouco abundante; **Alguns; *** Medianamente abundante; ****Frequente; *****Abundante; *****Muito abundante

O índice volumétrico de lamas (IVL) neste período apresentou valores excessivamente altos (Figura 4.12), acima de 150 ml/g Sólidos Suspensos Totais (SST). Os valores de IVL mais elevados coincidiram com o período em que a *Microthrix parvicella* se apresentava muito abundante. No período de 30 de Janeiro a 20 de Março, os sedimentadores apresentaram uma película superficial gigantesca e houve saída de lamas com o efluente final.

Os tanques de arejamento, a partir de 20 de Fevereiro, apresentaram espuma superficial, coincidindo com o período de grande abundância de bactérias filamentosas, principalmente de *Nocardioformes*, *Haliscomenobacter hydrossis* e do Tipo 411.

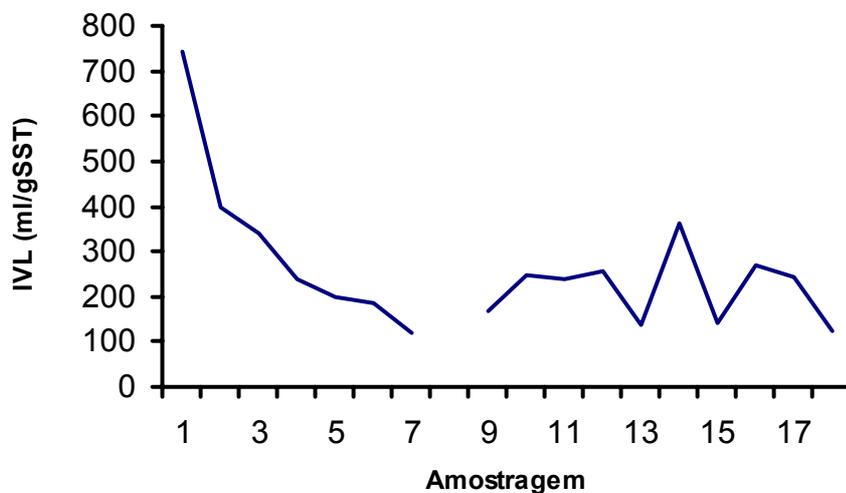


Figura 4.12 – Evolução do IVL ao longo do período de amostragem

O segundo período, compreendido entre 22 de Abril a 2 de Junho, é caracterizado por uma diminuição muito pronunciado das bactérias filamentosas Gram positivas (Tabela 4.2). Existe uma dominância das bactérias Gram negativas: *Haliscomenobacter hydrossis*, do Tipo 411, do Tipo 803 e do Tipo 961 (Figura 4.14 e Figura 4.14).

Estas bactérias, em geral estão associadas a condições de insuficiente oxigenação, a baixo F/M e a efluentes com carência de nutrientes ou com elevada concentração de substâncias rapidamente biodegradáveis.

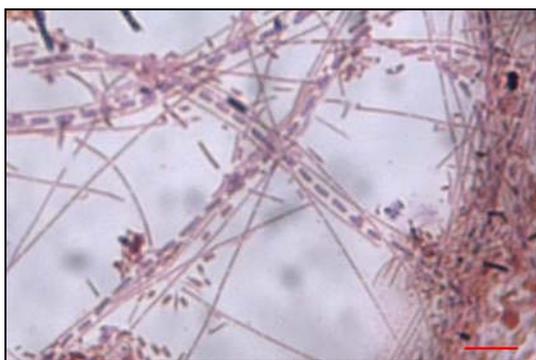


Figura 4.13– Dominância das bactérias Gram negativas
C.C. Barra = 5 μ m



Figura 4.14– Dominância das bactérias Gram negativas
C.C. Barra = 5 μ m

Tabela 4.2 – Abundância relativa das bactérias filamentosas na 2ª fase de amostragem

	11	12	13	14	15
Espécie	22-Abr	30-Abr	13-Mai	19-Mai	02-Jun
<i>Microthrix</i>	*	*	*	*	*
<i>Nocardioformes</i>	***	**	*	*	*
<i>Nostocoida l. II</i>	**	***	**	*	*
<i>Haliscomenobacter hydrossis</i>	****	*****	****	****	****
Tipo 803	****	****	****	***	***
Tipo 914/961	***	**	***	**	****
Tipo 411	****	****	****	****	****
Tipo 1851	*	0	0	0	0
<i>Thiothrix</i>	*	*	0	0	0
<i>Nostocoida l. I/Tipo 1863</i>	0	*	*	**	*

0 Nenhum; *Pouco abundante; **Alguns; *** Medianamente abundante; ****Frequente; *****Abundante; *****Muito abundante

Neste período, os valores de IVL mantiveram-se acima de 150 ml/g SST, os sedimentadores apresentaram alguma película superficial e o efluente final, no início deste período, apresentava-se turvo, tendendo a melhorar ao longo do tempo. Os tanques de arejamento apresentaram alguma espuma.

De uma forma geral, durante estes dois períodos, houve um excesso de bactérias filamentosas nos tanques de arejamento. Como consequência houve o desenvolvimento de espumas e deficiente sedimentação das lamas, originando um efluente final turvo e de fraca qualidade.

O último período, compreendido entre 12 a 30 de Junho, é caracterizado pela quase ausência de bactérias filamentosas (Figura 4.15 e Figura 4.16), tendo contudo sido observado alguma *Haliscomenobacter hydrossis* e Tipo 961 (Tabela 4.3).

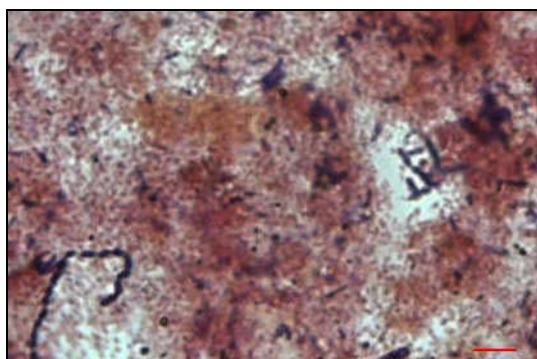


Figura 4.15– Aspecto geral da lama. Coloração Gram C.C. Barra = 10 µm

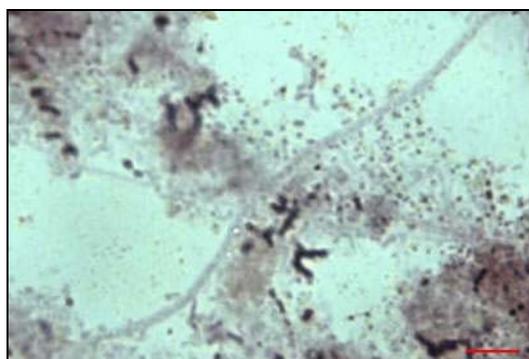


Figura 4.16– Aspecto geral da lama. Coloração Neisser C.C. Barra = 10 µm

Tabela 4.3 – Abundância relativa das bactérias filamentosas durante a 3ª fase de amostragem

Espécie	16	17	18
	12-Jun	17-Jun	30-Jun
<i>Microthrix parvicella</i>	0	0	*
<i>Nocardioformes</i>	*	*	**
<i>Nostocoida l. II</i>	0	*	0
<i>Haliscomenobacter hydrossis</i>	**	**	**
Tipo 803	*	*	*
Tipo 914/961	**	**	**
Tipo 411	*	*	*
<i>Nostocoida l. I/Tipo 1863</i>	0	*	*

0 Nenhum; * Pouco abundante; ** Alguns; *** Medianamente abundante; **** Frequente; ***** Abundante; ***** Muito abundante

Durante este período, os valores de IVL apresentaram uma diminuição. Nos sedimentadores foi observada pouca película superficial, e nos tanques de arejamento pouca espuma. O efluente final, no início deste período, apresentava-se um pouco turvo, aumentando de qualidade ao longo do tempo, coincidindo com a diminuição de bactérias filamentosas.

4.1.4 Limitações do método

A técnica clássica de colorações revelou-se de fácil aplicação e de rápida implementação, no entanto, foram detectadas algumas limitações.

Uma das limitações tem a ver com a subjectividade associada ao observador visto que filamentos que possam parecer iguais, podem efectivamente não o ser a um “olho experiente”. O mesmo pode acontecer quando a mesma amostra é observada por dois observadores diferentes.

Por vezes, também existem problemas de ilusão de óptica. Quando numa amostra existem bactérias Gram negativas e Gram positivas, existe a tendência para subestimar a representatividade das bactérias Gram negativas, uma vez que a cor das Gram positivas são mais visíveis.

Por outro lado, a forma como os filamentos reagem à coloração, e a própria morfologia, variam com as condições ambientais. Alguns filamentos como a *Microthrix*

parvicella e o Tipo 1863 podem apresentar reacções variáveis à coloração, o que dificulta muito a sua identificação.

Outro facto, que dificulta a identificação das bactérias filamentosas de lamas activadas, tem a ver com os próprios manuais de identificação. Manuais de diferentes autores apresentam, por vezes, diferentes descrições para o mesmo tipo morfológico. Em alguns casos, apresentam-se incompletos, não descrevendo alguns filamentos mencionados na literatura, como causadores de bulking e foaming.

4.2 Estudo da comunidade de protozoários

A avaliação da performance do processo foi complementada com o estudo da comunidade de protozoários, calculando para o efeito o Índice Biótico de Lamas (IBL). A identificação dos protozoários foi baseada em Foissner *et al.*, (1996) e Madoni *et al.*, (1996).

De seguida são apresentados os principais protozoários observados durante o período de amostragem.

4.2.1 Principais protozoários observados

4.2.1.1 Ciliados Nadadores



Figura 4.17 – *Cylindium* sp. C. C. Barra = 10 µm



Figura 4.18 – Telotroco de *Vorticella* C.C. Barra = 10 µm

4.2.1.2 *Ciliados Sésseis*



Figura 4.19 – *Carchesium* sp. C. C. Barra = 10 μ m



Figura 4.20 – *Epistylis* sp. C.C. Barra = 10 μ m



Figura 4.21 – *Opercularia* sp. C. C. Barra = 10 μ m



Figura 4.22 – *Vorticella convallaria* C.C. Barra = 10 μ m



Figura 4.23– *Vorticella microstoma* C. C. Barra = 10 μ m



Figura 4.24– *Vorticella aquadulcis* C.C. Barra = 10 μ m

4.2.1.3 Ciliados Móveis de Fundo



Figura 4.25– *Acineria* sp. C. C. Barra = 10 µm



Figura 4.26– *Aspidisca* sp. C.C. Barra = 10 µm



Figura 4.27 – *Chilodonella uncinata* C. C. Barra = 10 µm



Figura 4.28 - *Drepanomonas* sp. C.C. Barra = 10 µm

4.2.1.4 Ciliados carnívoros



Figura 4.29 – *Litonotus* sp. C. C. Barra = 10 µm



Figura 4.30 – *Podophrya* sp. C.C. Barra = 10 µm

4.2.1.5 Flagelados



Figura 4.31 – Pequenos Flagelados C. C. Barra = 10 μ m

4.2.2 Evolução do IBL ao longo do tempo de amostragem

Durante o período de amostragem, compreendido entre 6 de Março a 30 de Junho, foi estudada a comunidade de protozoários através do cálculo do IBL.

O período, compreendido entre 6 de Março e 20 de Março, foi caracterizado por um IBL de 2, correspondendo à classe IV (Tabela 4.4). Esta classe é caracterizada por uma actividade biológica muito baixa, e por uma fraca eficiência depuradora.

O grupo mais abundante foi o dos flagelados (em alguns casos a sua abundância foi superior a 100 indivíduos, observados na diagonal da câmara de Fluchs Rosenthal). A grande abundância deste grupo numa lama madura, está associada a uma má performance biológica da instalação, associado o deficiente arejamento, cargas elevadas, e à entrada de substâncias em fermentação (Drakides, 1978; Madoni, P., 1986).

O período entre 27 de Março a 17 de Junho, foi caracterizado por valores de IBL variáveis entre 2 e 3, correspondendo à classe IV (Tabela 4.4). Esta classe é caracterizada por uma actividade biológica muito baixa e eficiência depuradora fraca.

Este período difere do anterior, unicamente por apresentar menor abundância de Flagelados ($10 < F < 100$). Foram observados bastantes ciliados sésseis como: *Operculária*, *Vorticela microstoma*, *Vorticela convalária* e *Carchesium*. Foram também observados alguns ciliados móveis de fundo como: *Aspidisca* e *Acinéria*, assim como alguns ciliados nadadores.

Tabela 4.4 - Resultados de cálculo de IBL e classes correspondentes.

Data	IBL	Classe
06-Mar	2	IV
13-Mar	2	IV
20-Mar	2	IV
27-Mar	3	IV
10-Abr	3	IV
22-Abr	3	IV
30-Abr	2	IV
13-Mai	2	IV
19-Mai	3	IV
02-Jun	2	IV
12-Jun	2	IV
17-Jun	2	IV
30-Jun	4	III

No final do período de amostragem, mais especificamente no final do mês de Junho o valor de IBL alcançou o valor 4, correspondendo à classe III (Tabela 4.4). Esta classe é caracterizada por uma actividade biológica insuficiente e uma eficiência depuradora medíocre.

Durante este período, houve uma diminuição generalizada da quantidade de protozoários. Observaram-se alguns ciliados sésseis como: *Operculária* e *Vorticella Convalária*, sendo a quantidade de flagelados menor que 10 indivíduos, observados na diagonal da câmara de Fluchs Rosenthal.

4.2.3 Limitações do método

O Índice Biótico de Lamas avalia somente a actividade biológica e a eficiência depuradora, ao nível dos tanques de arejamento. Este método, não permite inferir sobre a qualidade do tratamento ao nível dos sedimentadores secundários. Embora os problemas a esse nível possam causar variações na estrutura da microfauna, este método, não permite avaliar este tipo de problemas.

4.3 Identificação de bactérias filamentosas através de hibridização *in situ* de fluorescência

Antes de se proceder à aplicação da técnica de hibridização *in situ* de fluorescência (FISH) foi necessário escolher quais as sondas a utilizar. A aplicação das técnicas clássicas de identificação permitiu, com as limitações inerentes, ter uma ideia geral sobre a dominância de possíveis bactérias filamentosas na ETAR em estudo durante o período de amostragem. Isto permitiu seleccionar as bactérias alvo para realizar os estudos de identificação recorrendo à técnica de FISH. Após estarem escolhidas as bactérias alvo a identificar, houve necessidade de seleccionar as sondas correspondentes. Este procedimento foi efectuado tendo por base um trabalho de pesquisa profundo. No entanto, após este estudo, muitas dúvidas subsistiram, tendo o processo de selecção sido dificultado pelo facto de existirem várias sondas diferentes referenciadas por diferentes autores para as mesmas bactérias.

Por outro lado, o grande desenvolvimento ocorrido nos últimos anos, relativamente ao estudo das sequências 16S rRNA, levou a que vários microrganismos fossem reclassificados, e a que novas sondas fossem construídas tornando ainda mais difícil a sua escolha. Além disso muitos microrganismos estão ainda em estudo. Esta evolução não tem sido, em geral, acompanhada pela actualização dos manuais de identificação baseados nas características morfológicas e nas colorações.

Inicialmente utilizaram-se cinco sondas (HHY, GOR0596, MPA645, CHL1851 e EUB338) referidas como específicas respectivamente para as bactérias *Haliscomenobacter hydrossis*, *Gordona*, *Microthrix parvicella*, Tipo 1851 e todo o domínio bactéria. Mais tarde, devido á inexistência de resultados com a sonda GOR0596 foi utilizada outra sonda a MNP1 referida como específica para a maior parte dos Nocardioformes.

A aplicação da técnica de hibridização *in situ* de fluorescência passou também pela optimização das condições de hibridização específicas para cada sonda escolhida. Várias condições de hibridização foram testadas, estando descritas, no presente capítulo, as que conduziram a melhores resultados.

4.3.1 *Haliscomenobacter hydrossis*

Foi testada a sonda HHY, específica para a bactéria *Haliscomenobacter hydrossis* spp., membro do grupo de bacteroides *Flavobacterium cytophaga*.

A fixação das células efectuou-se de acordo com o método standard do paraformaldeído (4%, p/v, em PBS). As condições de hibridização utilizadas encontram-se indicadas na Tabela 4.5.

Tabela 4.5- Parâmetros de hibridização para HHY

Sonda	HHY*
Marcador	Fluoreceína
Temperatura de hibridização (°C)	46*
Tempo de hibridização (horas)	2 – 4
Temperatura de lavagem (°C)	48*
Tempo de lavagem (min)	15
Formamida (%)	20*

* De acordo com o descrito em Wagner et al. (1994)

Foram testados vários tempos de hibridização, entre 2 a 4 horas, tendo sido 4 horas, o tempo que apresentou melhores resultados, em relação ao sinal emitido (Figura 4.32 a e b).

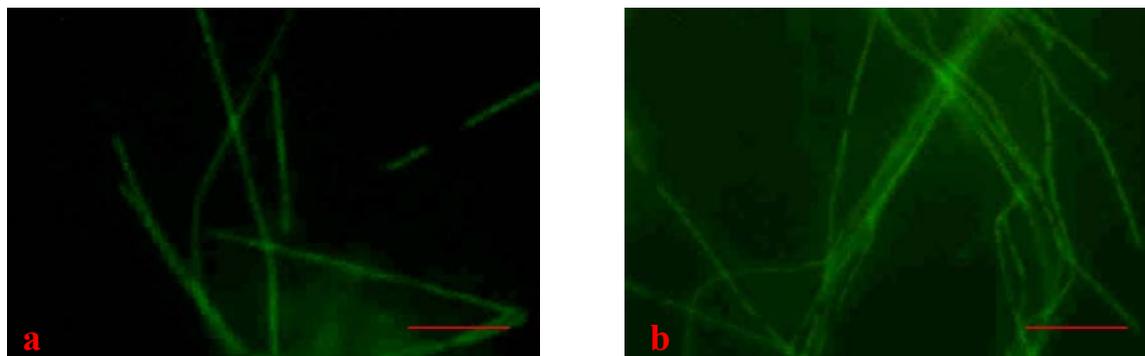


Figura 4.32a e b – *Haliscomenobacter hydrossis* hibridizada com HHY Barra = 10 µm

Haliscomenobacter hydrossis é uma bactéria Gram negativa, facilitando por isso a sua hibridização, não suscitando qualquer problema relacionado com a permeabilização das células.

4.3.2 Nocardioformes

O foaming tem sido associado à presença de actinomicetes pertencentes à família *Nocardiaceae*, assim como a outros organismos filamentosos. Em particular, o actinomicete *Gordona amarae* (normalmente designada de *Nocardia amarae*) tem sido considerado, através de análises microscópicas e fisiológicas, a espécie dominante em episódios de foaming (De los Reyes *et al.*, 1997). Por esta razão, numa primeira fase, optou-se por testar a sonda GOR0596 específica do género *Gordona*.

A fixação das células foi feita, inicialmente, de acordo com o método standard do paraformaldeído (4%, p/v, em PBS) e foram utilizadas as condições de hibridização descritas na (Tabela 4.6). Testou-se também a sonda EUB338, específica para todo o domínio bactéria, estando as condições de hibridização descritas na (Tabela 4.7).

Com estas condições de hibridização não foram visualizados filamentos de Nocardioformes, em ambas as hibridizações. Da utilização da sonda EUB338 resultou a visualização de bactérias que não possuíam a morfologia ramificada característica dos Nocardioformes (Figura 4.33 a e b).

Os Nocardioformes possuem invólucros celulares rígidos, contendo ácidos micólicos, com cadeias alifáticas muito longas. Consequentemente, a parede celular destas bactérias é muito difícil de permeabilizar e, desta forma, o alvo não está acessível à sonda (Schuppler *et al.*, 1998). Por esta razão procedeu-se à potencialização da permeabilidade das células.

Tabela 4.6 - Parâmetros de hibridização para a GOR0596

Sonda	GOR 0596
Marcador	CY3
Temperatura de hibridização (°C)	46
Tempo de hibridização (horas)	2 – 4
Temperatura de lavagem (°C)	48
Tempo de lavagem (min)	15 - 20
Formamida (%)	20* – 30**

* Segundo De Los Reyes *et al.* (1997)

** Segundo De Los Reyes *et al.* (1998c)

***Stahl & Amann, 1991

Tabela 4.7 - Parâmetros de hibridização para a EUB338

Sonda	EUB 338
Marcador	Fluoresceína
Temperatura de hibridização (°C)	46
Tempo de hibridização (horas)	3 – 4
Temperatura de lavagem (°C)	48
Tempo de lavagem (min)	15 – 20
Formamida (%)	15***

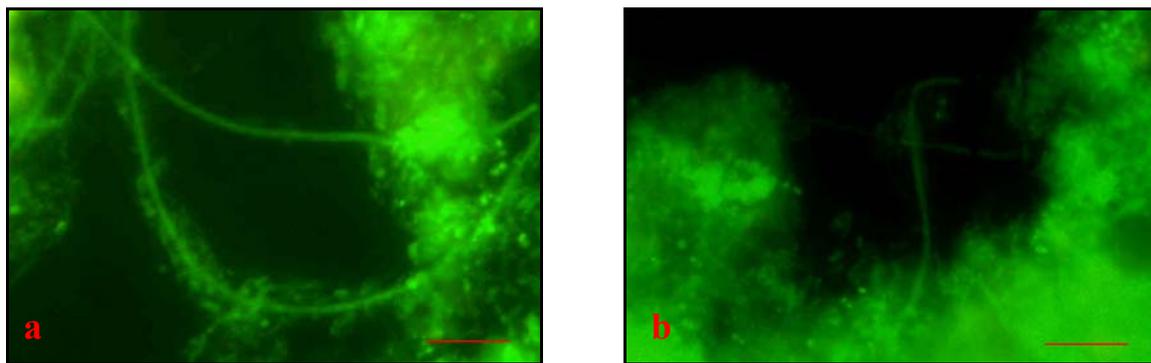


Figura 4.33 a e b – Bactérias hibridizadas com EUB338 Barra = 10 μ m

Foram testadas várias formas de aumentar a permeabilidade da parede celular, destas bactérias, nomeadamente através de:

- fixação com paraformaldeído durante 1 minuto;
- fixação com PBS/Etanol (1/1, v/v);

- pré-tratamento com lisozima (5 mg/ml em TE) durante 10 minutos a 37°C (Hahn et al., 1992) e utilização de uma série de desidratação (50, 80, 96% etanol), antes e depois do tratamento com lisozima.

A hibridização foi efectuada de acordo com as condições indicadas na Tabela 4.6. Mesmo com a utilização dos vários métodos de permeabilização da parede celular, não foram visualizados filamentos que hibridizassem com esta sonda, em nenhum dos casos, apesar da sua visualização com a coloração DAPI (Figura 4.34) e com a sonda EUB338 (não existe imagem disponível).

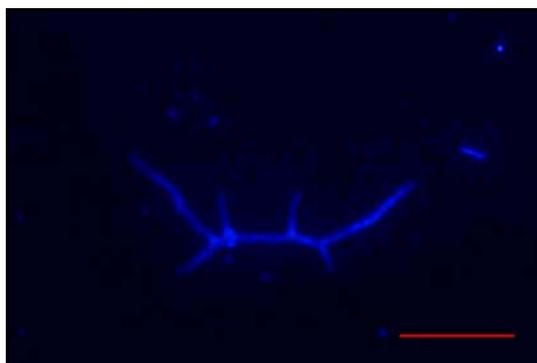


Figura 4.34 – Nocardioforme. Coloração DAPI. Barra = 10 μ m

Conclui-se que as bactérias filamentosas identificadas nas amostras, através dos métodos clássicos, talvez não sejam do género *Gordona*, uma vez que não foi visualizado sinal, aquando da utilização da sonda GOR0596, específica para este género.

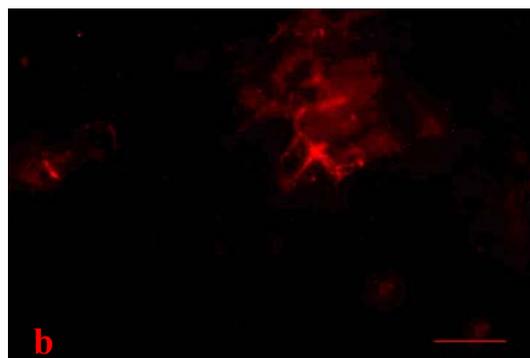
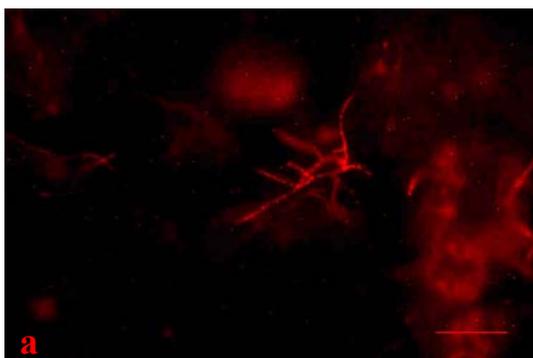
Numa outra fase, foi testada a sonda MNP1 (Schuppler *et al.*, 1998), específica para a maior parte dos Nocardioformes.

A fixação foi feita com PBS/Etanol (1/1, v/v), e de forma a aumentar a permeabilidade da parede celular efectuou-se um pré-tratamento com lisozima (5 mg/ml em TE). As amostras foram também submetidas a uma série de desidratação (50%, 80% e 96% de etanol), antes e depois do tratamento com lisozima. As condições de hibridização estão indicadas na Tabela 4.8. Com a utilização da sonda MNP1 foram visualizados filamentos de Nocardioformes, com um sinal razoável (Figura 4.35 a, b, c e d).

Tabela 4.8 – Parametros de hibridização com a MNP1

Sonda	MNP1*
Marcador	CY3
Temperatura de hibridização (°C)	46*
Tempo de hibridização (horas)	2
Temperatura de lavagem (°C)	48
Tempo de lavagem (min)	15
Formamida (%)	50*

* De acordo com Schuppler *et al.* (1998)



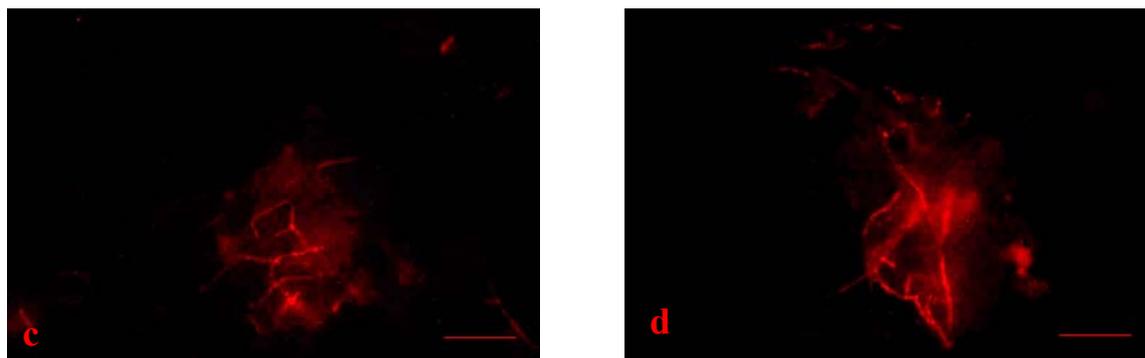


Figura 4.35 a, b, c e d – Nocardioformes hibridizados co MNP1 Barra = 10 μ m

Verificou-se que o sinal de fluorescência distribui-se de uma forma irregular ao longo dos filamentos. As partes que não apresentam sinal podem corresponder a células mortas ou com baixa actividade metabólica, ou a deficiente permeabilização. Os filamentos que se encontram dentro dos flocos foram difíceis de visualizar (Figura 4.36).

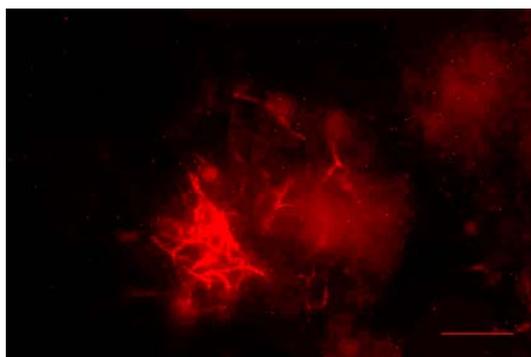


Figura 4.36 – Nocardioformes hibridizados com MNP1 dentro de floco Barra = 10 μ m

Para além disso, as imagens adquiridas não foram de grande qualidade devido à fluorescência desfocada provocada pela matéria orgânica autofluorescente. Além disso, a fonte luminosa de fluorescência do microscópio utilizado era de 50 W, sendo aconselhável usar uma fonte de 100 W para este tipo de observação.

4.3.3 *Microthrix parvicella*

Para a identificação da bactéria *Microthrix parvicella* foi utilizada a sonda MPA645, específica para *Microthrix parvicella* (Erhart *et al.*, 1997). As células foram fixadas com etanol/PBS (1/1, v/v), estando as condições de hibridização indicadas na Tabela 4.9.

Tabela 4.9 - Parâmetros de hibridização para a MPA645

Sonda	MPA 645
Marcador	Fluoresceína
Temperatura de hibridização (°C)	46
Tempo de hibridização (horas)	3 - 4
Temperatura de lavagem (°C)	48
Tempo de lavagem (min)	15 - 20
Formamida (%)	20 - 35

Não foram visualizados filamentos que hibridizassem com a sonda MPA645 e foi posta a hipótese de existir um problema de permeabilização das células. Comparou-se o mesmo campo microscópico, de uma amostra observada em campo claro, contendo aparentemente *Microthrix parvicella*, e a mesma hibridizada com a sonda EUB338, específica para todo o domínio bactéria, e comprovou-se a ausência de sinal (Figura 4.37 a e b).

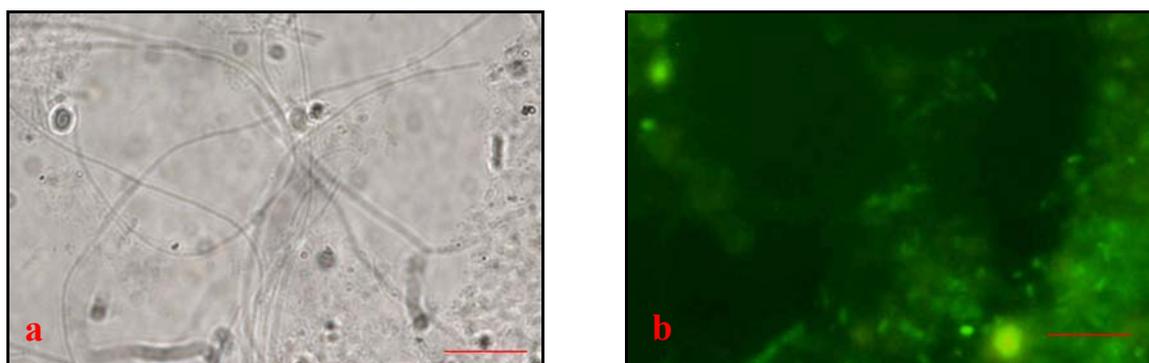


Figura 4.37 a e b – *Microthrix parvicella* em C.C. e hibridizada com EUB338 antes do pré-tratamento com lisozima
Barra = 10 μ m

Para melhorar a permeabilidade das células, foram testados dois pré-tratamentos. Um dos pré-tratamentos é baseado na aplicação de lisozima (5 mg/ml em TE) durante 10 min, a 37°C. Outro pré-tratamento pode ser com mutanolisina (5000 U/ml em fosfato de potássio) durante 20 min a 37°C. Tanto num como noutro pré-tratamento é necessária a realização de uma série de desidratação com etanol (50%, 80%, 96%), antes e depois dos pré-tratamentos.

Do tratamento com lisozima resultou, em relação à sonda EUB338, a visualização de filamentos (Figura 4.38 a e b). Desta forma o problema de permeabilização foi aparentemente superado. No entanto, em relação à hibridização com a sonda MPA645, não foi visualizado sinal.

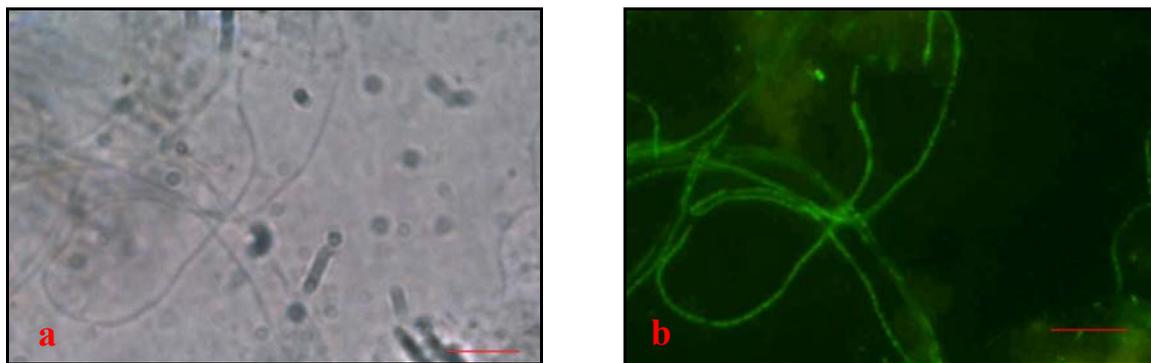


Figura 4.38 a e b – *Microthrix parvicella* em C.C. e hibridizada com EUB338 após pré-tratamento com lisozima

Barra = 10 μ m

Com a utilização do pré-tratamento com mutanolisina, não foi observado qualquer filamento, aquando da utilização da sonda MPA645. Com a utilização da sonda EUB338 foram observados filamentos, aparentemente de *Microthrix parvicella*, mas com um sinal muito fraco.

Algumas amostras previamente sujeitas ao pré-tratamento com lisozima e outras ao pré-tratamento com mutanolisina foram hibridizadas com a sonda MPA645 e observadas em microscópio confocal, não tendo sido visualizado qualquer sinal. Concluiu-se que a sonda MPA645 talvez não seja adequada para a identificação da *Microthrix parvicella* presente nas amostras. Em trabalhos futuros recomenda-se a utilização de outras sondas para *Microthrix parvicella*, nomeadamente as sondas MPA60, MPA223 e MPA650 também desenvolvidas por Erhart *et al.* (1997). Poder-se-á também utilizar uma mistura das várias sondas mencionadas anteriormente.

4.3.4 Tipo 1851

Foi utilizada a sonda CHL1851, específica da bactéria filamentosa Eikelboom Tipo 1851 (Beer *et al.*, 2002). As células foram fixadas de acordo com o método standard do paraformaldeído (4%, p/v, em PBS). As condições utilizadas na hibridização estão descritas na Tabela 4.10.

Tabela 4.10 - Parâmetros de hibridização para a CHL1851

Sonda	CHL1851
Marcador	Fluoresceína
Temperatura de hibridização (°C)	46
Tempo de hibridização (horas)	3 - 4
Temperatura de lavagem (°C)	48
Tempo de lavagem (min)	15 - 20
Formamida (%)	20 - 30

A sonda CHL1851 não permitiu a visualização de filamentos. Actualmente, esta é a única sonda para este Tipo 1851, não podendo ser possível concluir acerca da sua presença nas amostras analisadas.

4.3.5 Limitações do método

As sondas

O facto da diversidade do rRNA apenas estar parcialmente descrita, é obviamente uma limitação deste método (Amann *et al.*, 1995, Olsen *et al.*, 1986). Mesmo que uma sonda tenha sido construída para ser específica, tendo em conta, a mais completa base de dados até à data, esta pode hibridizar com uma série de organismos. Estes organismos são filogeneticamente membros do grupo alvo da sonda, mas não possuem um local perfeito de emparelhamento com esta (Amann *et al.*, 2000). Nestes casos, pode resultar um sinal muito ténue, ou até mesmo a ausência deste.

Uma forma de aumentar a especificidade das sondas pode ser conseguida através da utilização de oligonucleótidos competidores. Estes competidores são desenhados para emparelharem perfeitamente com sequências não alvo e são sintetizados sem marcador fluorescente. Durante a hibridização, o competidor é adicionado à solução de hibridização, na mesma concentração que a sonda marcada e liga-se preferencialmente a sequencias não alvo (Manz *et al.*, 1992).

É difícil encontrar sondas perfeitas. A construção de uma sonda representa um compromisso entre vantagens e desvantagens. Sondas com 15 a 30 nucleótidos são tão seguras como a base de dados a partir da qual foram construídas. O fluxo de informação de

novas sequências de rRNA, nas bases de dados, talvez requeira uma reavaliação da especificidade e mesmo a reconstrução de algumas sondas. Para a detecção segura de linhagens bacteriológicas ou tipos filogenéticos sem representantes em cultura, é vantajoso construir, no mínimo, duas sondas paralelas para diferentes posições do alvo 16S rRNA (Pernthaler *et al.*, 2001)

É aconselhável a identificação de uma população a partir de mais que uma sonda (Amann *et al.*, 1994, Amann, 1995a,b). De acordo com este conceito de sondas múltiplas (Ludwig *et al.*, 1998), poder-se-á utilizar um conjunto de sondas específicas para o género, espécie e sequência de interesse, ou então, utilizar duas ou três sondas específicas para o mesmo alvo. Simultaneamente, o FISH, com duas ou três sondas, permite identificar a existência de hibridização cruzada entre populações, na mesma amostra (Amann *et al.*, 1996).

Molécula alvo

A molécula alvo 16S rRNA pode constituir uma limitação do método. A molécula 16S rRNA talvez seja muito conservada, para permitir o discernimento entre duas populações muito próximas filogeneticamente. Diferentes espécies podem possuir sequências 16S rRNA muito idênticas (Fox *et al.*, 1992). Nestes casos, a molécula 23S rRNA pode ser útil, uma vez que tem o dobro do comprimento e possui mais regiões variáveis (Amann *et al.*, 2000).

Intensidade da hibridização

A intensidade da hibridização não pode ser correlacionada directamente com o número de células, uma vez que o conteúdo celular de DNA e RNA depende do estado fisiológico da célula. A detecção das células por FISH pode ser subestimada, quando o conteúdo de rRNA está abaixo do limite de detecção, ou a permeabilidade da célula for factor limitante (Amann *et al.*, 2000).

Na hibridação *in situ* de bactérias filamentosas Gram positivas, os sinais de fluorescência distribuem-se de uma forma irregular. Algumas partes apresentam sinal forte, outras partes do mesmo filamento não apresentam sinal. As partes que não apresentam sinal podem corresponder a células mortas ou com baixa actividade metabólica, ou a deficiente permeabilização.

Acessibilidade da sonda

A acessibilidade da sonda até ao alvo é outro factor limitante. Neste caso, a periferia da célula fixada limita a difusão da sonda, através da mesma, resultando numa baixa intensidade do sinal ou mesmo ausência. Este problema ocorre principalmente, no caso das bactérias Gram positivas.

A questão crucial, em FISH, é a fixação da amostra. Esta não pode preservar unicamente a morfologia celular, mas deve também maximizar a difusão da sonda através da matriz citoplasmática. Verifica-se que as condições de fixação, normalmente utilizadas para hibridização *in situ* de bactérias Gram negativas (Paraformaldeído 4% em PBS) não são as adequadas para bactérias Gram positivas. A fixação com etanol/PBS é mais eficiente para bactérias Gram positivas.

São várias as formas de melhorar a permeabilização da parede celular, nomeadamente através da diminuição do tempo de fixação, da permeabilização com etanol ou da fixação com etanol/PBS. Outra forma de permeabilizar as células já fixadas é através de um pré-tratamento com uma enzima lítica, como a lisozima (Beimforh, *et al.*, 1993).

A utilização de SDS (sulfato dodecil de sódio) em concentrações superiores a 1%, também promove a penetração da sonda na célula e em certos casos, pode aumentar a intensidade do sinal e/ou diminuir o ruído de fundo. Por vezes é difícil encontrar um bom compromisso entre uma suficiente permeabilização, para uma hibridização eficiente e a preservação da morfologia das células.

Qualidade das imagens

As amostras de lammas activadas contêm matéria orgânica e células que autofluorescem (De Los Reyes *et al.*, 1997), levando a uma subjectividade na identificação das células alvo. Por vezes, bactérias filamentosas que se encontram dentro de flocos autofluorescentes são difíceis de identificar.

Para além disso, a fluorescência desfocada interfere na qualidade das imagens adquiridas. A qualidade das imagens pode ser melhorada através do aumento da intensidade do sinal. Isto pode ser conseguido utilizando uma fonte de luz de maior potência, ou através do uso de microscopia confocal.

5. Conclusões Gerais

Neste trabalho a técnica molecular de hibridização in situ de fluorescência (FISH) foi otimizada para a identificação de algumas bactérias filamentosas, que se sabe serem causadoras de episódios “bulking” e “foaming” em Estações de Tratamento de Águas Residuais. A informação obtida a partir da técnica de FISH foi comparada com as técnicas clássicas de identificação, baseadas em descrições morfológicas e resposta a colorações de Gram e Neisser. Foram avaliadas as limitações inerentes a cada uma das técnicas com vista à sua potencial aplicação de uma forma rotineira em ETAR's. Os dados de operação da ETAR foram relacionados com a biodiversidade microbiana e calculou-se o Índice Biológico de Lamas (IBL), de forma a complementar a informação a nível da actividade biológica e eficácia depuradora da ETAR.

Concluiu-se que as técnicas clássicas baseadas nas colorações eram de fácil aplicação e de rápida implementação, apesar das limitações encontradas, a nível da subjectividade da observação e das variações de reacção à coloração originadas pelos factores ambientais inerentes. Constataram-se ainda algumas imprecisões nos manuais de identificação, verificando-se que estes diferem em alguns casos de autor para autor.

De entre as sondas testadas na técnica de FISH (HHY, GOR0596, MPA645, CHL1851, EUB338 específicas respectivamente das bactérias *Haliscomenobacter hydrossis*, *Gordona*, *Microthrix parvicella*, Tipo 1851 e maior parte do domínio bactéria), obtiveram-se resultados inequívocos apenas com a sonda HHY. Devido à ausência de resultados com a sonda GOR0596, foi testada uma nova sonda (MNP1), específica para a maior parte dos Nocardioformes e que permitiu a identificação deste grupo de bactérias. A utilização da MPA645 não permitiu a visualização dos filamentos de *Microthrix parvicella*, mesmo depois de aumentada a permeabilidade das células, tendo-se concluído que esta sonda não é indicada para a identificação da bactéria filamentosa semelhante a *Microthrix parvicella* existente nas amostras analisadas. A sonda CHL1851 também não permitiu a identificação da bactéria Tipo

1851 não tendo sido possível concluir acerca da sua presença nas amostras analisadas, dado que, actualmente, esta é a única sonda existente para este tipo bacteriano.

Conclui-se que muito trabalho necessita ainda ser desenvolvido a nível da identificação e classificação filogenética das bactérias filamentosas, para posterior desenvolvimento de novas sondas mais específicas. A possibilidade de quantificar comunidades complexas de populações microbianas está directamente dependente da oferta de meios, que vão desde a manutenção e alargamento da qualidade das bases de dados de rRNA até ao desenvolvimento contínuo de ferramentas para facilitar a construção de sondas e controlo específico das mesmas (Amann *et al.*, 2000).

Neste momento, a utilização da técnica de FISH na identificação de bactérias filamentosas requer uma metodologia não muito fácil de aplicar, de uma forma rotineira, em sistemas de tratamento de água residuais. É necessário uma maior confiança no método para que se torne mais fácil a sua aplicação de uma forma sistemática.

O custo da microscopia de fluorescência é um factor que dificulta a implementação da técnica de FISH como análise de rotina em ETAR's.

Desta forma, a identificação das bactérias filamentosas causadoras de foaming e bulking deverá passar pela complementaridade dos métodos utilizados. As técnicas clássicas de identificação dão-nos a informação das possíveis espécies presentes na amostra ambiental. Com a utilização da técnica de FISH a identificação é inequívoca, podendo confirmar ou não a identificação efectuada pelos métodos clássicos.

6. Referências Bibliográficas

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. e Watson, J. D. 1997. Molecular Biology of the cell, 3rd ed., Garland Publishing, New York.

Amann, R.I., Binder, B.J., Olson, R.J., Chisholm, S.W., Devereux R., e Stahl, D.A. 1990a. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. Appl. Environ. Microbiol. 56:1919-1925.

Amann, R. I., Krumholz, L. e Stahl, D.A. 1990b. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. J. Bacteriol. 172:762-770.

Amann, R. I., Zarda, B., Sthal, D. A., e Schleifer, K. H. 1992a. Identification of individual prokaryotic cells with enzyme-labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes. Appl. Environ. Microbiol. 58:300-3011.

Amann, R. I., Stromley, J., Devereux, R., Key, R. e Sthal, D. A. 1992b. Molecular and microscopic identification of sulphate-reducing bacteria in multispecies biofilms. Appl. Environ. Microbiol. 58: 64-623.

Amann, R. I., Ludwig, W. e Schleifer. K. H. 1992c. Identification and *in situ* detection of individual bacterial cells. FEMS Micobiol. Lett., 100: 45-50.

Amann, R. I., Ludwig, W. 1994. Typing in situ with probes. Em: *Bacterial Diversity and Systematics*, Priest, F. G., Ramos-Cormenzana, A. e Tindall, B. J., (ed), Plenum, New York, pp. 115-135.

Amann, R.I. 1995a. Fluorescently labelled rRNA-targeted oligonucleotide probes in the study of microbial ecology. *Mol. Ecol.* 4: 543-554.

Amann, R. I. 1995b. In situ identification of microorganisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes, Em: *Molecular Microbial Ecology Manual*, A.D.L. Akkermans, J. D. van Elsas e F. J. de Bruin (ed), Kluwer , Dordrecht, part 3.3.6.

Amann, R. I., Ludwig, W., e Schleifer, K. H. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Micobiol. Rev.* 59:143-169

Amann, R., Snaidr, J., Wagner, M., Ludwig, W., e Schleifer, K. H. 1996. *In situ* visualization of high genetic diversity in a natural microbial community. *J. Bacteriol.* 178:3496-3500.

Amann, R. Ludwig, W. 2000. Ribossomal RNA-targeted nucleic acid probes for syudies in microbial ecology. *FEMS Microbiol. Rev.* 24: 555-565.

Amaral., A.L.P. 2003. *Image Analysis in Biotechnological Processes: Applications to Wastewater Treatment*. Tese de doutoramento, Universidade do Minho.

Antonietti R., Broglio P. Madoni, P. 1982. Valutazione di parametri biologici come indici di efficienza di depurazione in impianti a fanghi attivi. *Ingegn. Ambientale* 11: 472-477.

Becares, E. 1991. Microfauna of an activated sludge pilot plant treating effluents from a pharmaceutical industry. Em: Biological Approach to Sewage Treatment Process: Current Status and Perspectives, Madoni P. (ed.), Centro Bazzucchi. Perugia, pp. 105-108.

Bedogni, G., Falanelli, A. Pedrazzi R. 1991. Evaluation of the abundance ratio between crawling and attached ciliates in the management of an activated sludge sewage treatment plant. Em: Biological Approach to Sewage Treatment Plant Process: Current Status and Perspectives Madoni P. (ed.), Centro Bazzucchi. Perugia, pp. 229-233.

Beer, M., Seviour, E. M., Kong, Y., Cumingham, M., Blackall, L. L., Seviour, R. J. 2002. Phylogeny of the filamentous bacterium Eikelboom type 1851 and design and application of a 16S rRNA targeted oligonucleotide probe for its fluorescence *in situ* identification in activated sludge. FEMS Microbiol 207: 170-183.

Beimfohr, C., A. Krause, R. Amann, W. Ludwig, e K. H. Schleifer. 1993. In situ identification of lactococci, enterococci and streptococci. System. Appl. Microbiol. 16: 450-456.

Bick, H. 1972. Ciliated protozoa. P. 198. World Health Organization, Geneve

Blackall, L. L., Parlett, J. H., Hayward, A. C., Minnikin, D. E., Greenfield, P. F. e Harbers, A. E. 1989. *Nocardia pinensis* sp. nov. an actinomycete found in activated sludge foams in Australia. J. Gen. Microbiol. 135: 1547-1558.

Blackall, L. L., Seviour, E. M., Cunningham, M. A., Seviour, R. J., e Hugenholtz, P. 1994. “*Microthrix parvicella*” is a novel, deep branching member of actinomycetes subphylum. System. Appl. Microbiol., 17: 513-518.

Blackall, L. L., Seviour, E. M., Bradford, D., Stratton, H. M., Cunningham, M. A., Hugenholtz, P. e Seviour, R. J. 1996a. Towards understanding the taxonomy of some of the filamentous bacteria causing bulking and foaming in activated sludge plants. *Water Sci. Technol.* 34: 137-144.

Blackall, L. L., Stratton, H. M., Bradford, D., Del Dot, T., Sjørup, C., Seviour, E. M. e Seviour, R. J. 1996b. “*Candidatus Microthrix parvicella*” a filamentous bacteria from activated sludge sewage treatment plants. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 46: 344-346.

Bradford, D., Hugenholtz, P., Seviour, E. M., Cunningham, M. A., Stratton, H. M., Seviour, R. J. e Blackall, L. L. 1996. 16S rRNA analysis obtained from gram negative filamentous bacteria micro-manipulated from activated sludge. *Syst. Appl. Microbiol.*, 19: 334-343.

Bradford, D., Christensson, C., Jakab, N. e Blackall, L. 1998. Molecular biological methods to detect “*Microthrix parvicella*” and to determine its abundance in activated sludge. *Wat. Sic. Tech.* 37: 37-45.

Britten, R. J., Davidson, E. H. 1985. Hybridization strategy. Em: *Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach*, Hames B. D., Higgins, S. J. (eds), Oxford: IRI Press, pp 3-15.

Cardinaletti, M e Zitelli, A. 1991. Taxonomic distribution of microfauna in a joint urban-industrial activated sludge bench-scale unit. Effect of zinc addition. Em: *Biological Approach to Sewage Treatment Process: Current Status and Perspectives* Madoni P. (ed), Centro Bazzucchi. Perugia, pp. 59-74.

Casey, J., Davidson N. 1977. Rates of formation and thermal stabilities of RNA:DNA and DNA:DNA duplexes at high concentrations of formamide. *Nucl. Acids Res.* 4:1539-1552.

Chierici, E. e Madoni, P. 1991. Comparative analysis of the activated sludge microfauna in small municipal plants. Em: Biological Approach to Sewage Treatment Process: Current Status and perspectives, Madoni P.(ed) Centro Bazzucchi, Perugia, pp. 83-87.

Chudoba, J. 1985. Control of activated sludge filamentous bulking VI. Formulation of basic principles. Wat. Res., 19: 1017-1022.

Chun, J. e Goodfellow, M. 1995. A phylogenetic analysis of the genus *Nocardia* with 16S rRNA gene sequences. Int. J. Syst. Bacteriol. 45:240-245.

Chun, J., Kang, S. O., Hah, Y. C. e Goodfellow, M. 1996. Phylogeny of mycolic acid-containing actinomycetes. J. Ind. Microbiol. 17:205-213.

Chun, J., Blackall, L. L., Kang, S. O., Hah, Y. C. e Goodfellow, M. 1997. A proposal to reclassify *Nocardia pinensis* Blackall et al., 1989 as *Skermania piniformis* gen nov., comb. nov. Int. J. System. Bact. 47: 127-131.

Cruds C. R., Cockburn A. e Vandyke J. M. 1968. An experimental study of the role of the ciliated protozoa in the activated sludge process. Wat. Pollut. Control 67: 312-329.

Cruds, C. R. e Cockburn, A. 1970a. Protozoa in biological sewage-treatment processes. I. A survey of the protozoan fauna of British percolating filters and activated sludge plants. Wat. Res. 4: 225-236.

Cruds, C. R. e Cockburn, A. 1970 b. Protozoa in biological sewage-treatment processes. II. Protozoa as indicators in the activated-sludge process. Wat. Res. 4; 237-249.

Cruds, C. R. 1975. Protozoa. Em: Ecological Aspects of used Water treatment, Cruds C. R. e Hawkes H. A. (ed.), Academic Press. London, pp. 203-268.

DeLong, E. F., Wickham, G. S., Pace, N. R. 1989. Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single microbial cells. *Science* 243: 1360-1363.

de los Reyes, F., Ritter, W. e Raskin, L. 1997. Group-specific small-subunit rRNA hybridization probes to characterize filamentous foaming in activated sludge systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 1107-1117.

de los Reyes, M. F., de los Reyes, F. L., Hernandez M. e Raskin, L. 1998a. Identification and quantification of *Gordona amarae* strains in activated sludge systems using comparative rRNA sequence analysis and phylogenetic hybridization probes. *Wat. Sci. Tech.* 37: 521-525.

de los Reyes, M. F., de los Reyes, F. L., Hernandez M. e Raskin, L. 1998b. Quantification of *Gordona amarae* strains in foaming activated sludge and anaerobis digester oligonucleotide hybridization probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2503-2512.

de los Reyes, F. L., D. B. Oerther, de los Reyes, M. F., Hernandez M. e Raskin, L. 1998c. Characterization of filamentous foaming in activated sludge systems using oligonucleotide hybridization probes and antibody probes. *Water Sci. Technol.* 37: 485-493.

Doig, C., Gill, M. J. e Church, D. L. 1991. *Rhodococcus equi* – an easily missed opportunistic pathogen. *Scand. J. Infect. Dis.*, 23: 1-6.

Drakides, C. 1978. L'observation microscopique des boues activées appliquée à la surveillance des installations d'épuration : technique d'étude et interprétation. *T.S.M. Léau.* 73: 85-98.

Drakides, C. 1980. La microfaune des boues activées. Etude d'une méthode d'observation et application au suivi d'un pilote en phase de démarrage. Wat. Res. 14: 1199-1207.

Ehrmann, M., Ludwig, W. Schleifer, K. H. 1994. Reverse dot.blot hybridization: a useful method for the direct identification of lactic acid bacteria in fermented food. FEMS Microbiol. Lett. 1:143-150.

Eikelboom D. H., Van Buijsen, H.J.J. 1983. Microscopic Sludge Investigation Manual. TNO Report A 94A, 2nd Edition.

Eikelboom D. H. Process Control of Activated Sludge Plants by Microscopic Investigation. IWA Publishing.

Erhart, R., Bradford, D., Seviour, R. J., Amann, R., Blackall, L. 1997. Development and use of fluorescent in situ hybridization probes for detection and identification of *Microthrix parvicella* in activated sludge. System. Appl. Microbiol. 20:310-318.

Esteban G., Tellez C., Bautista L. M. 1990. Effects of habitat quality on ciliated protozoa communities in sewage treatment plants. Environ. Technol., 12: 381 – 386.

Esteban, G., Tellez C. e Bautista L. M. 1991. Dynamic of ciliated protozoa communities in activated sludge process. Wat. Res. 25: 967-972.

Fox, G. E., Wisotzkey, J. D. e Jurtshuk, Jr., P. 1992. How close: 16S rRNA sequences identity may not be sufficient to guarantee species identity. Int. J. Syst. Bacteriol. 42:166-170.

Gherna R., Woese, C. R. 1992. A partial phylogenetic analysis of the *Flavobacter-Bacteroides* phylum: Basis for taxonomic restructuring. *System. Appl. Microbiol.* 15: 513-521.

Giovannoni, S. J., T. B. Britschgi, C. L. Moyer, e K. G. Field. 1990. Genetic diversity in Sargasso sea bacterioplankton. *Nature*, 345:60-62.

Glöckner, F. O., Amann, R., Alfreider, A., Pernthaler, J., Psenner, R., Trebesius, K. Schleifer K. H. 1996. An in situ hybridization protocol for detection and identification of planktonic bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* 19: 403-406.

Goodfellow, M 1991. Identification of some mycolic acid containing actinomycetes using fluorogenic probes based on 7-amino-4-methyl-coumarin and 4-methyl-1-umbelliferone. *Actinomycetes*, 2: 36-42.

Goodfellow, M., Stainsby, F. M., Davenport, R., Chun, J., e Curtis, T. 1998. Activated sludge foaming: the true extent of actinomycete diversity. *Wat. Sci. Tech.* 37: 511-519.

Guschin, D. Y., Mobarry, B. K., Proudnikov, D., Stahl, D. A. Ritmann, B. E. e Mirzabekov, A. D. 1997. Oligonucleotide microchips as genosensors for determinative and environmental studies in microbiology. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2397-2402.

Haase, A., Brabic, M., Stowring, L., Blum, H. 1984. Detection of viral nucleic acids by in situ hybridization methods. *Virol.* 7: 189-226.

Hahn, D., R. I. Amann, e J. Zeyer. 1993. Whole-cell hybridization of Frankia strain with fluorescence or digoxigenin-labeled, 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1709-1716.

Hernandez M., Jenkins, D. e Beaman, B. 1994. Mass and viability estimations of *Nocardia* in activated sludge and anaerobic digesters using conventional stains and immunofluorescent methods. *Wat. Sci. Tech.* 29: 249-259.

Jenkins D., Richard MG, Daigger G.T. 1984. Manual on the causes and control of activated sludge bulking and foaming. Water Research Commission. PO Box 824. Pretoria 0001.

Jenkins D., Richard MG, Daigger G.T. 1986. Manual on the causes and control of activated sludge bulking and foaming. Water Research Commission. Pretoria e U.S.E.P.A. Cincinnati.

Jenkins, D., M. G. Richard, e G. T. Daigger. 1993. Manual on the causes and control of activated sludge bulking and foaming. 2nd Edition, Lewis Publishers, Inc. Michigan.

Kampfer, P., Erhart, R., Beimfohr, C. Böhringer, J., Wagner, M. e Amann, R. 1996. Characterisation of bacterial communities from activated sludge: culture-dependent numerical identification versus in situ identification using group-specific rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Microbial Ecol.* 32: 101-121.

Klatte, S., Rainey, F. A. e Kroppenstedt, R. M. 1994. Transfer of *Rhodococcus aichiensis* Tsukamura 1982 and *Nocardia amarae* Lechevalier and Lechevalier 1974 to the Genus *Gordona* as *Gordona aichiensis* comb. nov. and *Gordona amarae* comb. nov. *Int. J. Systematic Bact.* 44: 769-773.

Klimowicz, H. 1970. Microfauna of activated sludge. Part I. Assemblage of microfauna in laboratory models of activated sludge. *Acta Hydrobiol.* 24: 357-376.

La Riviér, J. W. M., Eikelboom D. H. 1986. Role of specific microbial groups in wastewater treatment: filamentous organisms as an example. Em *Perspectives in microbial ecology*, Megusar, F., Ganter, M., (ed.) Ljubljana, pp 59-65.

Lechner, M., Telhada, M. 1994. Expressão dos genes. Transcrição. Em *Biologia celular*. Azevedo, C., (ed.) Lidel – Edições técnicas, pp 159-172.

Lechevalier, M. P. e Lechevalier, H. A. 1974. *Nocardia amarae* sp. Nov., an actinomycete common in foaming activated sludge. *Int. J. System. Bact.* 24: 278-288.

Lee, N., Nielsen, P. H., Andreasen, K. H., Juretschko, S., Nielsen, J. L., Schleifer, K. H. e Wagner, M. 1999. Combination of fluorescent in situ hybridization and microautoradiography – a new toll for structure-function analyses in microbial ecology. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1289-1297.

Lemmer, H., e Kroppenstedt, R. M. 1984. Chemotaxonomy and physiology of some actinomycetes isolated from scumming activated sludge. *System Appl. Microbiol.*, 5: 124-135.

Lindrea, K.C., Seviour, E. M., Seviour, R. J. Blackall, L. I., Soddell, J. A. 1999. Practical methods for the examination and characterization of activated sludge. Em: *The microbiology of activated sludge*, Seviour, R. J., Blackall, L. L., Kluwer (ed.) Academic Publishers, pp.257-300.

Loy, A., Hora, M., Wagner, M. 2003. ProbeBase- an online resource for rRNA-targated oligonucleotide probes. *Nucleic Acids Res.* 31: 514-516.

Madoni, 1981. I protozoi Ciliati degli Impianti Biologici di Depurazione, pp 1-34. CNr. AQ/1/167, Rome.

Madoni, P. e Antonietti, R. 1984. Colonization dynamics of ciliated protozoa populations in an activated sludge plant. Proc. IV Italian Symposium on Population Dynamics, pp. 105-112.

Madoni, P. 1986. Protozoa in waste treatment systems. Em: Perspectives in Microbial Ecology, Megusar F. and Gantar, M. (ed.), Slovene Society of Microbiologists, Ljubljana, pp. 86-90.

Madoni, P. 1994a. A sludge biotic index (SBI) for the evaluation of the biological performance of activated sludge based on the microfauna analysis. Wat. Res. 28; 67-75.

Madoni, P. 1994b. La microfauna nell'analisi di qualità biologica dei fanghi attivi. Indice Biotico del Fango: SBI. Azienda Gas Acqua Consorziale de Reggio Emilia. Università degli Studi di Parma.

Madoni, P. 1996. The Sludge Biotic Index for evaluation of the activated-sludge plant performance: the allocation of the ciliate *Acineria uncinata* to its correct functional group. Acta Protozoa 35: 000-000.

Madoni, P., Davoli, D., Guglielmi, L. Stefanini, C. 1996. Atlante Fotografico: Guida all'analisi microscópica del fango attivo. AGAC Reggio Emilia. Università degli Studi di Parma.

Maidak, B. I., Olsen, G. J., Larsen, N., Overbeck, R., McCaughey, M. J. e Woese, C. L. 1996. The ribosomal database project (RDP) Nucleic Acids Res., 24: 82-85.

Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Wagner, M., Schleifer, K. H. 1992. Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions. Syst. Appl. Microbiol. 15: 593-600.

Manz, W., Wagner, M., Amann, R. e Scheleifer, K. H. 1994. In situ characterization of the microbial consortia active in two wastewater treatment plants. *Wat. Res.* 28: 1715-1723.

Marmur, J., Doty, P. 1962. Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. *J. Mol. Biol.* 5: 109-118.

McConaughy, B. L., Laird, C. D., McCarthy, B. I. 1969. Nucleic acid reassociation in formamide. *Biochem.* 8: 3289-3295.

Meinkoth, J., Wahl, G. 1984. Hybridization of nucleic acids immobilized on solid supports. *Anal. Biochem* 138: 267-284.

Mobarry, B. K., Wagner, M., Urbain, W., Rittmann, B. e Stahl, D. 1996. Phylogenetic probes for analysing abundance and special organization of nitrifying bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2156-2162.

Nakatsu, C. H. e Forney, L. J. 1996. Parameters of nucleic acid hybridization experiments. *Molec- Microbiol. Ecolo.Manual.* 2.1.2: 1-12.

Nicolau, A., Martins M. J., Mota M. e Lima, N. 1999. Estudo da comunidade de Protozoários exposta a tóxicos em estações de tratamento de águas residuais. Em: 6ª Conferência Nacional sobre Qualidade do Ambiente, Lisboa (Ed.) Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Plátano Editora, Lisboa 2: 659-668.

Nicolau, A., Dias, N., Mota, M., e Lima, N. 2001. Trends in the use of protozoa in the assecement of waste water treatment. *Res. Microbiol.* 152: 621-630.

Olsen, G. J., D. J. Lane, S. J. Giovannoni, N. Pace, e D. A. Stahl. 1986. Microbial ecology and evolution: A ribosomal RNA approach. *Ann. Rev. Microbiol.* 40:337-365

Ouverney, C. C., Fuhrman, J. A. 1999. Combined microautoradiography-16S rRNA probe technique for determination of radioisotope uptake by specific microbial cell types in situ. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1746-1752.

Pagnotta, R., Tommasi, M. 1979. Applicazione di parametric biologici allo studio del fenomeno del bulking. *Inquinamento.* 21: 27-32.

Pasveer, A. 1969. A case of filamentous activated sludge. *J. Wat. Poll. Cont. Fed.* 41: 1340-1352.

Pernthaler, J., Glöckner, F. O., Schönhuber, W. e Amann, R. 2001. Fluorescence *in situ* hybridization. Em: *Methods in Microbiology: Marine Microbiology*, J. Paul (ed.), Academic Press Ltd, London, vol.30.

Pons, M. N. 1999. Aide ou diagnostic des stations d'épuration par l'observation microscopique des bues activées, Cemagref Éditions.

Poole, J. E. 1984. A study of relationship between the mixed liquor fauna and plant performance for a variety of activated sludge sewage treatment works. *Wat. Res.* 18; 281-287.

Prescott, J. F. 1991. *Rhodococcus equi*: an animal and human pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* 4:20-34.

Rainey, F. A., Burghardt, J., Kroppenstedt, R. M., Klatte, S., Stackebrandt, E. 1995. Phylogenetic analysis of the genera *Rhodococcus* and *Nocardia* and evidence for the

evolutionary origin of the genus *Nocardia* from within the radiation of *Rhodococcus* species. *Microbiology*, 141:523-528.

Raskin, L., L.K. Poulsen, D. R. Noguera, B. E. Rittmann e D. A. Stahl. 1994a. Quantification of methanogenic groups in anaerobic biological reactors by oligonucleotide probe hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 1241-1248.

Raskin, L., J. M. Stromley, B. E. Rittmann e D. A. Stahl. 1994b. Group specific 16S rRNA hybridization probes to describe natural communities of methanogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 1232-1240.

Richard, M. 1989. *Activated sludge microbiology.* The water pollution control federation. Virgínia

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

Sahm, K., Knoblauch, C., Amann, R. 1999. Phylogenetic affiliation and quantification of psychrophilic sulphate-reducing isolates in marine arctic sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3976-3981.

Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, R., Mullis, K. B. Ehlich. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.

Sasahara, T. e Ogawa, T. 1983. Treatment of brewery effluent. Part VIII: protozoa and metazoa found in the activated sludge for Brewery effluent. *Monats. Brauwiss.* 11; 443-448.

Scheleifer, K. H., Ludwig, W. e Amann, R. 1993. Nucleic acid probes, Em: Handbook of new bacterial systematics, M. Goddellow e A. G. O'Donnell (ed.), Academic Press, New York, pp. 464-510.

Schramm, A., Larsen, L. H., Revsbech, N. P., Ramsing, N. B., Amann, R. e Schleifer K. H. 1996. Structure and function of a nitrifying biofilm as determined by in situ hybridization and microelectrodes. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 4641-4647.

Schramm, A., De Beer, D., van den Heuvel, J. C., Ottengraf, S., Amann, R. 1999. Microscale distribution of populations and activities of *Nitrosospira* and *Nitrospira spp.* along a macroscale gradient in a nitrifying bioreactor: quantification by in situ hybridization and the use of microsensors. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3690-3696.

Schut, F., De Vries, E.J., Gottschal, J.C., Robertson, Harder, B.R., Prins, W. R.A. e Button, D.K. 1993. Isolation of typical marine bacteria by dilution culture: growth, maintenance, and characteristics of isolates under laboratory conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:2150-2160.

Seviour, R. J., Blackall, L. L. 1999. Current taxonomic status of filamentous bacteria found in activated sludge plants. Em *The microbiology of activated sludge*, Seviour, R. J., Blackall, L. L. (ed), Kluwer Academic Publishers, pp. 122-146.

Seviour, R. J. 1999. The normal microbial communities of activated sludge plants. Em *The microbiology of activated sludge*, Seviour, R. J., Blackall, L. L. (ed.), Kluwer Academic Publishers, pp. 76-98.

Sezgin, M., Karr, P. R. 1986. Control of actinomicete scum on aeration basins and clarifiers. *J.W.P.C.F.* 58:972-977.

Shuppler, M., F. Mertens, G. Schon, e U. B. Gobel. 1995. Molecular characterization of nocardioform actinomycetes in activated sludge by 16S rRNA analyses. *Microbiol.* 141: 513-521.

Shuppler, M., M. Wagner, G. Schon, e U. B. Gobel. 1998. In situ identification of nocardioform actinomycetes in activated sludge using fluorescent rRNA target oligonucleotide probes. *Microbiolog.* 144: 249-259.

Slijkhuis, H., Deinema, M. H. 1982. The physiology of *Microthrix parvicella* a filamentous bacterium isolated from activated sludge. Em *Bulking of activated sludge: Preventive and remedial methods*, Chambers, B., Tomlinson, E. J. (ed.), Chichester.

Snaidr, J., Amann, R., Huber, J., Ludwig, W. e Scheleifer, K. H. 1997. Phylogenetic analysis and *in situ* identification of bacteria in activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2884-2896.

Soddell, J. A., e R. J. Seviour. 1990. A review: microbiology of foaming in activated sludge plants. *J. Appl. Bacteriol.* 69: 145-176.

Spigoni, G., Davoli, C., Dovali, D. 1992. I principali microrganismi filamentosi del fango attivo. Quaderni tecnici dell'AGAC.

Stackebrandt, E. e Woese, C. R. 1981. Towards a phylogeny of the actinomycetes related organisms. *Curr. Microbiol.* 5: 197-202.

Stackebrandt, E. e Goodfellow, M. 1991. *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, J. Wiley, Chichester.

Stackebrandt, E. e Liesack, W. 1993. Nucleic acids and classification, Em: Handbook of New Bacterial Systematics, M. Godfellow e A.G. O'Donnell, (ed.), Academic Press, London, pp. 152-194.

Stackebrandt, E. e Rainey, F. A. 1995. Partial and complete 16S rDNA sequences, their use in generation of 16S rDNA phylogenetic trees and their implications in molecular ecological studies, Em: Molecular Microbial Ecology Manual. A.D.C.Akkermans, J.D. van Elsas and F. J. de Bruijn (ed), vol. 3.1.1, Kluwer, Dordrecht, pp. 1-17.

Stackebrandt, E., F. Rainey, e N. Ward-Rainey. 1997. Proposal for a new hierarchic classification system. *Actinobacteria* classis nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 47:470-491.

Stahl, D. A., Flesher, B., Mansfield, H. R., Montgomery, L. 1988. Use of phylogenetically based hybridization probes for studies of ruminal microbial ecology. Appl. Environ. Microbiol. 54: 1079-1084.

Stahl, D. A., Amann, R. I. 1991. Development and application of nucleic acid probes p. 205-248. Em: Nucleic acid techniques in bacterial systematics, E. Stackebrandt and M Goodfellow (ed.), John Wiley & Sons, Inc. New York.

Strunk, O., e W. Ludwig. 1995. The ARB program package.

Strunk, O., Gross, O., Reichel, B., May, M., Hermann, S., Stuckman, N., Nonhoff., B., Lenke, M., Ginhart, A., Vilbig, A., Ludwig, T., Bode, A., Schleifer, K. H. e Ludwig, W. 2000 [on line] ARB: a software environment for sequence data. <http://www.mikro.biologie.tu-muenchen.de> Department of Microbiology, Technische Universität München, Munich, Germany

Tijssen, P. 1993. Hybridization with nucleic acid probes. part 1. Theory and nucleic acid preparation, p. 268. Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam.

Toman, M. e Rejic, M. 1988. The effects of low concentrations and short period lack of dissolved oxygen upon the organisms of the cocominant biocenosis in activated sludge. *Z. Wass. Abwass. Forsch.* 21: 189-193.

Trüper, H. J. e Schleifer, K. H. 1992. Prokaryote characterization and identification, Em: the Prokaryotes, 2nd edn, A. Balows, H.C. Trüper, M. Dworkin, W. Harder e K.H. Scheleifer (eds), Springer-Verlag, New York, pp. 126-148.

Van Veen, W. L. 1973. Bacteriology of activated sludge, in particular the filamentous bacteria. *Antoine van Leeuwenhoek.* 39: 189-205.

Wagner, M., Amann, R., Lemmer, H. e Scheifler, K. H. 1993. Probing activated sludge with oligonucleotides specific for proteobacteria: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:1520-1525.

Wagner, M., Erhart, R., Manz, W., Amann, R., Lemmer, H., Wedi, D., Scheifler, K. H. 1994. Development of an rRNA-targeted oligonucleotide probe specific for the genus *Acinetobacter* and its application for in situ monitoring in activated sludge *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 792-800.

Wahl, G. M., Berger, S. L., Kimmel, A. R. 1987. Molecular hybridization of immobilized nucleic acids: theoretical concepts and practical considerations. Em: *Methods of enzymology* 152. Guide to Molecular Cloning Techniques, Berger S. L., Kimmel A. R. (ed), San Diego Academic Press, pp 399-406.

Wanner, J., Otavva, V., Grau, P. 1987. Effect of an anaerobic zone on settleability of activated sludge. Em *Biological phosphate removal from wastewater*, Ramadori (ed), London.

Wanner, J. 1993. Kinetic and metabolic selection in controlling the filamentous organisms in activated sludge systems. Em *Prevention and control of bulking activated sludge*. D. Jenkins, R. Ramadori e L. Cingolani (ed), Centro Luigi Bazzuchi, Perugia, pp. 17-42.

Wanner, J. 1994. Activated sludge population dynamics. *Wat. Sci. Technol.*, 30:159-169.

Weller, R., e D. M. Ward. 1989. Selective recovery of 16S rRNA sequences from natural microbial communities in the form of cDNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1818-1822.

Weller, Alm., E., Oether, D. B., Larsen, N., Stahl, D. A. e Raskin, L. 1996. The oligonucleotide probe database. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3557-3559.

Wetmur, J. G., Davidson, N. 1968. Kinetics of renaturation of DNA. *J. Mol. Biol.* 31:349-370.

Winker S., e C. R. Woese. 1991. A definition of the domains Archaea Bacteria, and Eucarya in terms of small subunit ribosomal rRNA characteristics. *System. Appl. Microbiol.* 14:305-310.

Woese, C. R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51:221-271

Woese, C. R., Kandler, O., e Wheelis, M. L. 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria and Eucarya. *Prac. Nat. Acad. Sci. USA* 87: 294-498.

Yamamoto, R. I., Kamori, T., Ohkubo, Y. 1991. Filamentous bulking and hindrance of phosphate removal due to sulphate reduction in activated sludge. *Wat. Sci. Tech.*, 23: 927-935.

Yang, B. D., Anderson M. L. M. 1985. Quantitative analyses of solution hybridization. Em: *Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach*, Hames B. D. Higgins S. J. (ed), Oxford: IRI Press, pp. 47-72.

Zarda, B., R. Amann, G. Wallner, e K. H. Schleifer. 1991. Identification of single bacterial cells using digoxigenin-labelled, rRNA-targeted oligonucleotides. *J. Gen. Microbiol.* 137:2823-2830.

Wastewater Organisms Database, Vítor Santa Cruz Productions, Perris, Califórnia, USA