

**II-130 - UTILIZAÇÃO DE CULTIVOS DE *PARAMECIUM AURELIA* (CILIOPHORA) PARA A CLARIFICAÇÃO DO EFLUENTE DO CENTRO EXPERIMENTAL DE SANEAMENTO AMBIENTAL DA UFRJ**

**Pedro Henrique Campello Nunes**<sup>(1)</sup>

Graduando em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

**Luiggia Girardi Bastos Reis de Araújo**

Licenciada em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual Norte Fluminense (UENF). Graduanda em Engenharia de Produção pela Estácio de Sá. Mestre em Engenharia Ambiental pela Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ). Doutoranda em Ciências (Zoologia) pelo Museu Nacional da UFRJ.

**Tiago Abreu Viana**

Graduado em Ciências Biológicas pela Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ). Mestre em Ecologia e Evolução pela UERJ.

**Inácio Domingos da Silva-Neto**

Graduado em Ciências Biológicas pela Faculdade de Humanidades Pedro II. Mestre em Ciências Biológicas (Zoologia-Protistologia) pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Doutor em Ciências Biológicas pelo Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo e pelo Institute de Protistologie et Zoologie dans l'Université Blaise Pascal de Clermont Ferrand.

**Endereço**<sup>(1)</sup>: Av. Carlos Chagas, 373. CCS – A: 074 - Cidade Universitária - Ilha do Governador - Rio de Janeiro- RJ - CEP: 21941-902- Brasil - Tel: (21) 3938-6363 - e-mail: ph.campello.nunes@hotmail.com

## RESUMO

Os Protistas são um grupo altamente diversificado de organismos eucariontes, em sua maioria, microscópicos. Dentro deste grupo, os Ciliophora, ou ciliados, têm um importante papel ecológico, ocupando uma ampla variedade de nichos em cadeias tróficas aquáticas e terrestres, onde predam ativamente bactérias, outros protistas e pequenos metazoários, criando um fluxo paralelo de energia. Em ambientes aquáticos, participam da formação da chamada alça microbiana. Esses ciliados também desempenham um papel preponderante no tratamento do esgoto, durante o processo de clarificação do efluente, e podem ser utilizados para acelerá-lo quando adicionados ao tratamento. O tratamento adequado do esgoto é de suma importância para o desenvolvimento socioeconômico e tem reflexos diretos sobre as condições de saúde e de bem-estar da população, como controle e prevenção de doenças, aumento da expectativa de vida e da produtividade econômica. O uso de protistas ciliados como biorremediadores na clarificação do esgoto pode contribuir com a melhoria do tratamento biológico. Neste processo, os ciliados se alimentam das bactérias, que se agregam e formam um floco biológico, aglutinando a matéria orgânica do esgoto e fazendo-a precipitar. Desta forma, o esgoto sobrenadante apresenta menor aporte de matéria orgânica particulada e dissolvida, já que 90% ou mais da matéria orgânica é removida, dispensando o tratamento químico excessivo do efluente. O presente estudo tem como objetivo testar uma técnica de biorremediação com o ciliado *Paramecium aurelia* para a clarificação de esgoto doméstico, a fim de otimizar o tratamento de efluentes, de modo que se obtenham melhorias das condições físico-químicas do efluente. Para averiguar a eficiência da técnica, serão medidos os parâmetros turbidez, densidade bacteriana, carbono orgânico dissolvido e pH. O presente estudo pretende contribuir na busca por ferramentas que tragam melhoria no tratamento biológico de esgoto pelo processo de lodos ativados.

**PALAVRAS-CHAVE:** Biorremediação, Ciliados, Clarificação, Efluente, Protistas.

## INTRODUÇÃO

O objetivo do tratamento dos esgotos domésticos é remover as impurezas físicas, químicas e biológicas dos efluentes sanitários. Este tratamento pode ser classificado em função do grau de remoção e do tipo de impureza. Primeiramente há um tratamento preliminar para remover materiais grosseiros a partir de grades e peneiras. Posteriormente, este esgoto passa pelo tratamento primário, com o objetivo de remover o material em suspensão, que flutua ou decanta. Nesta etapa, os decantadores e flotadores produzem o lodo primário, que deve ser removido antes da próxima etapa (JORDÃO & PESSÔA, 1991). No tratamento secundário, o esgoto

ainda possui sólidos tão particulados que não decantam e ficam dissolvidos no meio. Para sua remoção, pode-se usar microorganismos que se alimentem da matéria orgânica particulada e transformem-na em material inorgânico como sais, gases e minerais. Assim, o tratamento secundário ou biológico consegue transformar a matéria orgânica solúvel do esgoto em matéria orgânica insolúvel, que sedimenta em um decantador secundário e pode ser separada do efluente tratado. O tratamento terciário ou avançado é utilizado quando se deseja um esgoto de qualidade superior (JORDÃO & PESSÔA, 2011). No entanto, a utilização de microorganismos pode melhorar muito a qualidade do efluente secundário final, por um processo chamado de clarificação.

Para o tratamento biológico do esgoto podem ser empregadas técnicas como fossas sépticas, lagoas de estabilização, entre outras (JORDÃO & PESSÔA, 2011). Contudo, uma maneira mais eficaz, rápida e barata de reabilitação em grande escala é o tratamento biológico de efluentes através da técnica de lodos ativados. Neste processo, o lodo ativado é formado por flocos em suspensão originados pelo crescimento e agregação de microrganismos oxidantes de matéria orgânica e cicla entre o tanque de aeração e o decantador final, a fim de aumentar a densidade microbiana do meio.

Os microorganismos atuantes no tratamento secundário, ou biológico, e na clarificação apresentam organização celular simples e desempenham importante papel na reciclagem dos nutrientes no meio ambiente. Do ponto de vista biotecnológico, asseguram a degradação de inúmeros poluentes, sendo agentes essenciais dos processos biológicos de tratamento de efluentes (SANT'ANNA-JR, 2010). Durante este processo, não apenas as bactérias são de suma importância, mas também os demais microorganismos que as predam (CURDS, 1992). Neste grupo de organismos estão os protozoários, principalmente os ciliados (filo Ciliophora Doflein, 1901). Os protozoários são organismos unicelulares eucariontes que se nutrem de outros organismos e matéria orgânica particulada, sendo a grande maioria generalista. O filo Ciliophora Doflein, 1901, com mais de 8.000 espécies descritas, representa um grupo amplamente diversificado morfológicamente e com alto grau de especialização organelar, configurando um dos grupos mais homogêneos do Reino Protista (CORLISS, 1979). A maioria das espécies deste grupo é de vida livre, ocupando os mais diversos habitats, sendo algumas consideradas como bioindicadores de qualidade ambiental (CURDS, 1992). Isso porque os ciliados são sensíveis a elevadas cargas de matéria orgânica, estando sujeitos à interrupção na movimentação dos cílios nestas condições (DUBBER & GRAY, 2009).

As bactérias são os maiores agentes de oxidação biológica, representando 30% da massa do efluente. Contudo, uma superpopulação bacteriana não é exatamente o objetivo do tratamento de esgoto. Durante o processo, as bactérias podem estar suspensas no efluente ou aderidas a estruturas inseridas, na forma de biofilme. Quando não suspensas, os organismos encontram-se aglutinados na forma de "foco biológico" (OLIVEIRA et al., 2009). Esta aglutinação é possível graças à secreção de uma matriz extracelular bacteriana ou substância polimérica extracelular (SPE), cujas propriedades aderentes permitem a aglutinação de diversos organismos e partículas suspensas num aglomerado chamado foco (VON SPERLING, 1997; WILÉN et al., 2008). Graças aos protozoários bacteriófagos presentes no meio, o controle populacional das bactérias é feito e a formação dos flocos, ou seja, do biofilme celular, é induzida. Isso ocorre porque os protozoários predam as bactérias livres nadantes, mas não são capazes de predação as imersas na matriz. Sendo assim, a formação do biofilme e, consequentemente, do foco, é uma maneira de evitar a predação por protozoários (CURDS, 1992). Além disso, os protistas detritívoros ainda ajudam as bactérias no processo de clarificação da água, se alimentando de detritos orgânicos. Sendo assim, os ciliados podem interferir direta ou indiretamente no processo de clarificação, dependendo de seu tipo de nutrição, sendo, em todos os casos, indispensável (VON SPERLING, 1997).

O presente estudo tem como objetivo testar uma técnica de biorremediação com o ciliado *Paramecium aurelia* e sua capacidade de melhorar a clarificação do efluente final, a fim de se obter melhorias nas características físico-químicas do efluente. Para averiguar a eficiência do processo serão medidos turbidez, densidade bacteriana, carbono orgânico dissolvido e pH.

## MATERIAIS E MÉTODOS

As amostras para a obtenção dos ciliados para o experimento foram coletadas no dia 12 de junho de 2014 do tanque de aeração da Estação de (Tratamento Experimental) Saneamento Ambiental da UFRJ, na Ilha do Fundão, RJ, Brasil. Foi utilizado para coleta um recipiente de plástico com capacidade de 2L. O material foi levado ao Laboratório de Protistologia do Departamento de Zoologia, no Instituto de Biologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). No laboratório, com a utilização de uma bomba de aquário, a amostra foi submetida à aeração durante 24 horas, a fim de dar continuidade às condições observadas na estação. Antes disso, uma pequena alíquota da amostra homogeneizada foi retirada e posta numa placa de Petri juntamente com um grão de arroz macerado.

Após a proliferação de *Paramecium aurelia* na placa, algumas células foram triadas com micropipetas de vidro e postas em um Erlenmeyer de vidro com capacidade máxima de 500 mL para um cultivo que apresentasse apenas a espécie desejada. Os frascos foram preenchidos por 300 mL de água mineral à temperatura ambiente e receberam os ciliados triados. Os frascos foram vedados por uma rede de plâncton, que permite a passagem do oxigênio, mas não de cistos possivelmente carregados pelo ar. Nos cultivos foram adicionados grãos de arroz macerados e algumas gotas de infusão de alface. Alguns indivíduos triados foram destinados à observação in vivo e técnicas de ciliatologia para a confirmação taxonômica. Para tal foi realizada a técnica do Protargol segundo Dieckmann (1995) e microscopia eletrônica de varredura segundo Silva-Neto *et al.* (2012).

Após o período de aeração, as amostras de esgoto ficaram 30 minutos em repouso, até toda a matéria orgânica mais densa sedimentar. Feito isso, o sobrenadante das amostras de lodo foi transferido para um recipiente de vidro por meio de uma pipeta de vidro de 25 mL. Parte dessa água foi destinada às medições de turbidez, pH, densidade bacteriana e carbono orgânico.

A dosagem de carbono orgânico total (TOC) foi realizada no laboratório de Biogeoquímica, enquanto as medições de turbidez, pH e densidade bacteriana foram feitas no laboratório de Hidrobiologia, ambos integrantes do Instituto de Biologia da UFRJ. Na medição de turbidez, foi utilizado um turbidímetro portátil Orluco-Hellige®, modelo 966 e a medição foi feita segundo protocolo de APHA (2005). Foram feitas três repetições para a obtenção de um resultado de maior confiabilidade.

A determinação da abundância bacteriana foi realizada por meio de citometria em fluxo com a utilização de um citômetro de fluxo FACSCalibur® (BD Biociences) equipado com laser de argônio, a 488 nm. A discriminação de subgrupos de bactérias heterotróficas foi realizada com a utilização de fluorocromos para marcação das células heterotróficas (ANDRADE *et al.*, 2003). Para tal, 1 mL da amostra foi acondicionada em um stub com capacidade de 2 mL, fixada com Paraformaldeído 2% (ANDRADE *et al.*, 2003) e levada ao citômetro para a contagem.

O pH foi medido com o auxílio de pHmetro Orion® modelo 720A+. A calibração do aparelho foi executada a partir de soluções padrão, cujos pHs são conhecidos e possuem valores de 4 e 7. A dosagem de carbono orgânico total foi realizada a partir de um analisador elementar de carbono (TOC) Sievers InnovOx®. Para esta medição, 40 mL da amostra foram filtradas em uma membrana filtrante de 0,1 µm, transferidas para um frasco de vidro e depois fixadas com 50 µL de ácido ortofosfórico, adicionado com micropipeta automática. Em seguida, o frasco foi armazenado na geladeira até ser conduzido ao medidor.

Após a proliferação de *Paramecium aurelia* (figura 1) no cultivo (aproximadamente 40 células/mL), foram adicionados 50 mL do cultivo em 150 mL de efluente em aeração. Além deste foi feito um Erlenmeyer controle de 200 mL, apenas com o efluente em aeração, sem a amostra do cultivo. Por fim, foram utilizadas bombas de aquário para manter os cultivos aerados e induzir o surgimento de mais bactérias e excistamento de alguns protozoários. Os frascos foram mantidos nessa condição de aeração durante 3 dias para verificar a clarificação das amostras com cultivos de ciliados. Após este período, as medições de pH, turbidez, carbono orgânico e bactéria foram repetidas com todos os cultivos, pelos métodos já descritos anteriormente. Após os 3 dias, uma pequena alíquota de cada cultivo foi levada ao microscópio estereoscópico para quantificar e qualificar os organismos presentes.

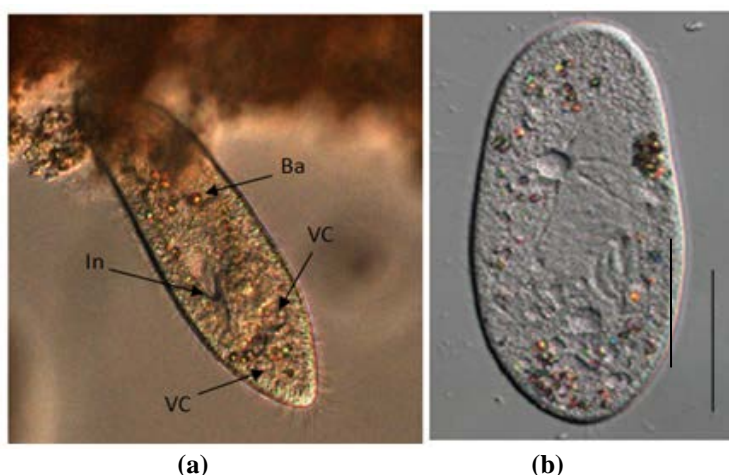


Figura 1. A. *Paramecium aurelia* filtrando bactérias aderidas à matriz de floco biológico. VC: vacúolo contrátil; Ba: bactéria; In: Infundíbulo bucal. B. *Paramecium aurelia*. Escala: 100 µm.

## RESULTADOS

### MEDIÇÕES DA QUALIDADE DO EFLUENTE ANTES DA CLARIFICAÇÃO

Foram obtidos os seguintes valores de turbidez: 30,2; 30,0 e 30,3 UT; totalizando uma média de aproximadamente 30,17 UNT. Este valor já está dentro dos padrões delimitados pela Resolução CONAMA 357/2005 e 430/2011, mas ainda pode ser melhorado pelo processo de clarificação. O pH obtido antes do experimento foi de 8,137; também dentro do padrão estipulado pela resolução. Na análise de densidade bacteriana, foram encontradas 136.859.750 bactérias por ml da amostra inicial. Este número se refere às bactérias livre-natantes do meio. A concentração de carbono orgânico total no sobrenadante retirado foi de 14,7 ppm, valor superior ao máximo estipulado pelo CONAMA.

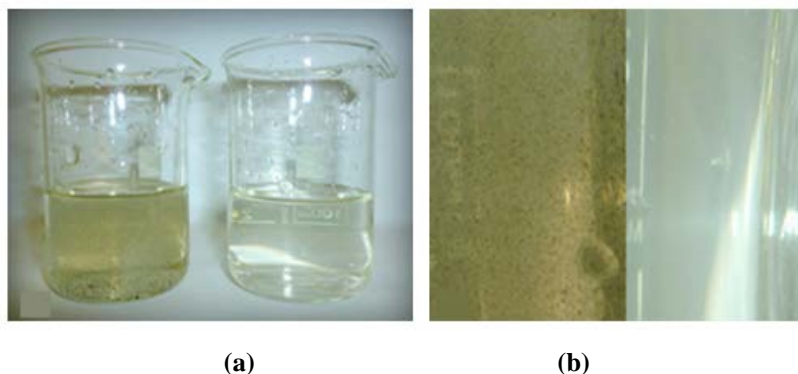
### MEDIÇÕES DA QUALIDADE DO EFLUENTE APÓS A CLARIFICAÇÃO

Após o processo de clarificação com a utilização de protistas ciliados, os valores de turbidez melhoraram substancialmente (figura 2). Enquanto o cultivo controle manteve aproximadamente a mesma turbidez de 28,3 UNT, o cultivo com *Paramecium aurelia* apresentou turbidez de 3,0 UNT. Já o pH não apresentou grandes mudanças antes e depois da clarificação. O pH medido do sobrenadante foi 8,107, enquanto o do cultivo com *P. aurelia* foi 7,800. A quantidade de carbono orgânico dissolvido reduziu substancialmente após o processo de clarificação, graças à oxidação da matéria orgânica por parte dos ciliados. O número de bactérias por mL de cultivo observado ao final do experimento foi menor do que o observado inicialmente. Os resultados obtidos da amostra controle e com o ciliado quanto aos parâmetros analisados estão discriminados na tabela 1.

Tabela 1: Comparação dos valores físico-químicos e biológicos antes e depois do processo de clarificação.

Cultivos	pH		Turbidez (UNT)		Carbono Orgânico Total (mg/l)		Densidade Bacteriana (cel/ml)	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
Controle	8,137	7,421	30,17	28,3	14,7	5,97	136.859,750,00	42.545,129
<i>Paramecium aurelia</i>	8,137	7,800	30,17	3	14,7	1,83	136.859,750,00	29.309,660





**Figura 2. A. Efluente antes e depois do processo de clarificação com protistas ciliados. O recipiente à esquerda contém o esgoto antes da clarificação, enquanto o frasco à direita possui o efluente clarificado. B. Comparação entre as propriedades físicas visíveis (cor real) antes e depois da clarificação.**

## DISCUSSÃO

A redução da turbidez se deu pela predação das partículas orgânicas por parte das bactérias e protozoários, além da aglutinação da matéria e suspensão no biofilme de bactérias, formando flocos biológicos. Os mesmos decantam tornando a água mais límpida e com menos turbidez. Tal parâmetro é diretamente relacionado à quantidade de carbono orgânico dissolvido, uma vez que a aglutinação da matéria orgânica reduz a concentração de carbono orgânico dissolvido no meio.

Apesar dos valores de pH e turbidez estarem dentro dos padrões delimitados pelas resoluções CONAMA 357/2005 e 430/2011, a qualidade do efluente pode ser melhorado pelo processo de clarificação, de tal forma que o despejo do esgoto cause a menor interferência possível. Além disso, um efluente final de melhor qualidade possibilita seu uso para fins não convencionais no país, como sua reutilização como água doméstica não potável.

A diminuição da densidade bacteriana do efluente após a adição dos ciliados é decorrente da predação pelos protozoários e da própria autodefesa das bactérias. Elas se aglomeram em aglutinados de biofilme como maneira de escapar da predação por ciliados, diminuindo a quantidade de bactérias livres natantes no meio (CURDS, 1992). *P. aurelia* é um eficiente predador de bactérias, possuindo um infundíbulo bucal com ciliatura complexa, gerando um fluxo d'água que leva as bactérias até o fundo do infundíbulo, local de formação dos vacúolos digestivos (FOISSNER et al., 1994). No caso de *Paramecium*, esses vacúolos são formados em grande quantidade, sendo produzidos aproximadamente 1 vacúolo a cada 3 a 5 segundos. Além disso, este ciliado é generalista, ou seja, se alimenta tanto de matéria orgânica quanto de bactérias, agindo de todas as maneiras possíveis no processo de clarificação.

## CONCLUSÕES

Os resultados obtidos dos parâmetros analisados sugerem a ação do ciliado *Paramecium aurelia* como potencial predador de bactérias e matéria orgânica, sendo eficiente agente biorremediador para a clarificação. A utilização de ciliados para a clarificação mostrou-se uma eficiente maneira de melhorar a qualidade do efluente. Novos experimentos com outras espécies de ciliados e em maior escala devem ser realizados para ratificar a funcionalidade e aplicabilidade desta técnica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDRADE L.; GONZALEZA A. M.; ARAUJOA F. V.; PARANHOS R. Flow cytometry assessment of bacterioplankton in tropical marine environments. J Microbiol Meth, 55:841–850. 2003.
2. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). Standard Methods For The Examination of Water And Wastewater, 21<sup>st</sup> ed. Washington, D. C.: APHA, 2005. 1368p.

3. BRASIL, Resolução CONAMA n°357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, a vigorar em 2005. *Diário Oficial [da] União*, Poder Executivo, Brasília, DF, 18 mar. 2005.
4. BRASIL, Resolução CONAMA n° 430, de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução no 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio a vigorar em 2011. *Diário Oficial [da] União*, Poder Executivo, Brasília, DF, 16 mai. 2011.
5. CORLISS, J. O. The Ciliate Protozoa: Characterization, Classification and Guide to the Literature, 2 ed. Oxford: Pergamon Press, 1979. 455p.
6. CURDS, C. R. Protozoa and the water industry. New York: Cambridge University Press, 1992.128p.
7. DIECKMANN, J. An Improved Protargol Impregnation for Ciliates Yielding Reproducible Results. *Europ. J. Protistol.*, n. 31, p. 372-382. 1995.
8. DUBBER, D.; GRAY, N. F. Enumeration of protozoan ciliates in activated sludge: determination of replicate number using probability. *Water Research*, Grã- Bretanha, v. 43, [s. n.], p. 3443-3452, 2009.
9. FOISSNER, W.; BERGER, H. & KOHMANN, F. Taxonomische und ökologische Revision der Ciliaten des Saprobien systems – Band III: Hymenostomata, Prostomatida, Nassulida. *Informationsberichte des Bayerischen Landesamtes für Wasserwirtschaft*, 1/94, 1994. 548p.
10. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Síntese de Indicadores Sociais. Uma Análise das Condições de Vida da População Brasileira 2007. *Série Estudos e Pesquisa*, 2008. 252 p.
11. JORDÃO, E. P.; PESSOA, C. A. Tratamento de Esgotos Domésticos. 2. ed. Rio de Janeiro: Associação Brasileira de Engenharia Sanitária - ABES, 1991. 681 p.
12. JORDÃO, E. P. e PESSÔA, C. A. Tratamento de Esgotos Domésticos. 6ª edição. Rio de Janeiro: ABES, 2011. 969p.
13. OLIVEIRA, G. S. S.; ARAÚJO, C. V. M.; FERNANDES, J. G. S. Microbiologia de sistema de lodos ativados e sua relação com o tratamento de efluentes industriais: a experiência da Cetrel. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 14, n. 2, p. 183-192, 2009.
14. SANT'ANNA-JR, G. L. Tratamento Biológico de Efluentes: fundamentos e aplicações. Rio de Janeiro: Interciência, 2010.
15. SILVA-NETO, I. D. *et al.* Redescription of *Licnophora chattoni* Villeneuve-Brachon, 1939 (Ciliophora, Spirotrichea) associated with *Zyzyzus warreni* Calder, 1988 (Cnidaria, Hydrozoa). *European Journal of Protistology*, 48, 48-62. 2012.
16. SISTEMA NACIONAL DE INFORMAÇÕES SOBRE SANEAMENTO – SNIS. Diagnóstico dos serviços de água e esgotos. Site institucional, 2009. Disponível em: <<http://www.snis.gov.br/>>.
17. VON SPERLING, M. Princípios do tratamento biológico de águas residuárias: Lodos Ativados. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental - UFMG, 1997. 415p.
18. WILÉN, B.; LUMLEY, D.; MATTSON, A.; MINO, T. Relationship between floc composition and flocculation and settling properties studied at a full scale activated sludge plant. *Water Research*, v. 42, p. 4404-4418, 2008.