CONTROLE OPERACIONAL EM TEMPO REAL DE SISTEMAS DE LODOS ATIVADOS ATRAVÉS DA MICROSCOPIA ÓTICA

Ana Luiza Fávaro Piedade[(1)]
Bióloga, formada em 2004. Especialista em Microbiologia de Lodos Ativados pela Scuola Umbra di Amministrazione Publica, Itália, ministrado pelo Dr. David Jenkins. Atua como consultora em sistemas de lodos ativados desde 2004 atendendo indústrias no Brasil, Chile e Espanha. Especialista em ecotoxicologia aquática. Diretora Executiva da Acqua Expert Engenharia Ambiental.

Endereço[(1)]**:** Av. Dona Ana Costa, 146, sala 1402 – Vila Mathias - Santos - SP - CEP: 11.060-000 - Brasil - Tel: +55 (11) 9 5552-2576 - e-mail: ana.luiza@acquaexpert.com.br.

RESUMO

Nos processos de tratamento de efluentes sanitários e industriais, em particular nos sistemas de lodos ativados, a eficiência operacional desempenha um papel crucial. A estrutura do lodo e a proliferação de microrganismos específicos podem causar diversos problemas, como o aumento do Índice Volumétrico do Lodo (IVL) e o escape de sólidos pelo efluente tratado. Embora a identificação de comunidades bacterianas e protozoários por meio de microscopia ótica seja uma metodologia bem estabelecida, sua aplicação nos sistemas de lodos ativados ainda é subutilizada no Brasil. A avaliação microscópica do lodo ativado com contraste de fase oferece uma forma única de monitorar as Estações de Tratamento de Efluentes (ETEs) em tempo real, permitindo a adoção de ações operacionais precisas e preditivas. Isso acelera a recuperação do processo e previne problemas como formação excessiva de espuma, redução da eficiência na remoção de carga orgânica e nitrogênio, arraste de sólidos e outros problemas comuns nesse tipo de tratamento.

PALAVRAS-CHAVE: Lodo Ativado, Microbiologia, Contraste de fase

INTRODUÇÃO

O processo de lodo ativado sempre consiste em dois processos unitários de fluxo líquido – uma conversão biológica de poluentes em um tanque de aeração e a separação de sólidos, geralmente em um clarificador por gravidade (Jenkins et al, 2003).

O tanque de aeração fornece um ambiente para a remoção e transformação de poluentes solúveis e particulados por um consórcio misto e variável de micro e macrorganismos chamado lodo ativado. O clarificador secundário, por sua vez, fornece um ambiente quiescente que permite que os sólidos do lodo ativado floculem e depois se separem do efluente tratado por sedimentação por gravidade. O objetivo do clarificador é fornecer um transbordamento clarificado (baixo teor de sólidos, baixa turbidez) chamado de efluente secundário e um lodo concentrado (alta concentração de Sólidos em Suspensão Totais - SST), chamado de lodo ativado de retorno. Para um tratamento eficiente, tanto o tanque de aeração quanto o clarificador secundário devem funcionar satisfatoriamente. Portanto, fatores que afetam tanto a oxidação biológica quanto a separação de sólidos são importantes para determinar a eficiência geral do processo (Jenkins et al, 2003).

a capacidade de sedimentação do lodo é considerada um dos principais problemas nos sistemas de lodo ativado e é comumente medida pelo índice Volumétrico do lodo (IVL). Portanto, a floculação do lodo, sua estabilidade, tamanho dos agregados, morfologia, densidade e composição química são cruciais para a operação eficiente desse sistema (Mesquita et al, 2013).

Globalmente, o lodo ativado abrange um ecossistema complexo composto por diferentes tipos de microrganismos, como bactérias filamentosas e formadoras de flocos, protozoários e metazoários. Além disso, devido à natureza complexa das comunidades microbianas, desequilíbrios entre os diferentes tipos de bactérias podem ocorrer e perturbar a ETE com consequências econômicas e ambientais profundas. Por isso, a avaliação da comunidade microbiana por inspeção microscópica (Eikelboom, 2000) é uma forma útil de diagnosticar rapidamente disfunções. No entanto, deve-se observar que as técnicas microscópicas também são ferramentas úteis para estudos de ecologia, hidrodinâmica, difusão e sorção de poluentes, que estão além do escopo deste artigo.

Neste contexto, realizar com frequência uma caracterização microscópica do lodo é fundamental para ter sucesso operacional. De uma forma geral, a identificação da microbiologia do lodo tem contribuído em muito

no aumento da eficiência em remover compostos tóxicos, na determinação da taxa de retorno de lodo, na distribuição da carga de efluentes, na concentração ideal de oxigênio a ser adicionada, na concentração de macronutrientes, evitando na maioria dos casos desperdícios com insumos e energia (Madoni, 1994).
Contudo, um levantamento realizado em 197 ETEs ao longo de 2022 e 2023 mostrou que essa análise ainda é pouco utilizada nas ETEs no Brasil ou é utilizada de maneira inadequada, utilizando-se da microscopia de campo claro, que não permite quantificar e identificar as bactérias filamentosas e outras estruturas importantes.

OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi avaliar a adoção e o uso adequado da microscopia como ferramenta de controle operacional em sistemas de lodos ativados em 197 Estações de Tratamento de Efluentes (ETEs) no Brasil. O objetivo era verificar se essas empresas estão utilizando a microscopia como ferramenta de controle e se estão aplicando corretamente os procedimentos relacionados.

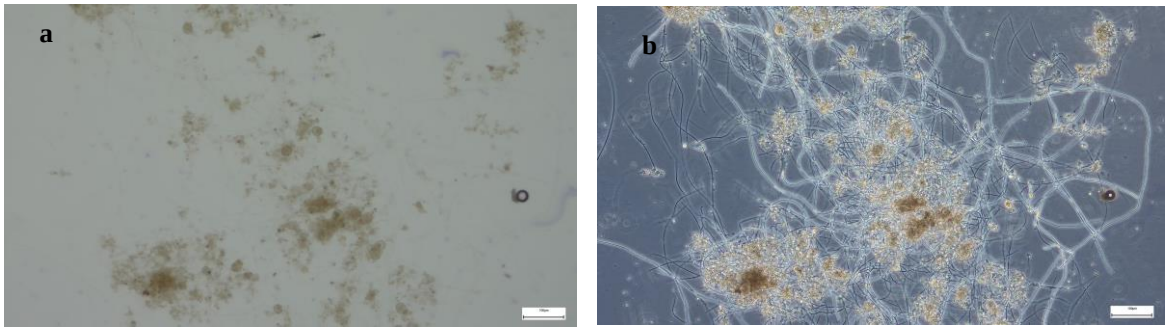
METODOLOGIA

Durante o período de 2022 a 2023, foram realizadas avaliações em 197 empresas que possuem sistemas de lodos ativados. Essas avaliações abordaram os seguintes critérios: a presença de microscópio nas Estações de Tratamento de Efluentes (ETEs), a disponibilidade de microscópios com contraste de fase, a frequência das análises do lodo e a capacidade das empresas em interpretar os resultados dessas avaliações e utilizá-los para implementar ações corretivas visando o controle da eficiente da planta de tratamento.

O MICROSCÓPIO ADEQUADO

O estudo desses microrganismos requer o uso correto do microscópio para revelar diferenças em sua forma e tamanho e diagnosticar estruturas celulares e o primeiro passo para ter sucesso em uma avaliação do lodo biológico é utilizar um microscópio adequado, que precisa ter uma ótica muito boa e, principalmente, precisa estar equipado com contraste de fase (Ph).
A microscopia de contraste de fase (Ph) é uma técnica de microscopia óptica que converte os deslocamentos de fase da luz que passa por uma amostra transparente em mudanças de brilho na imagem. Isso permite estudar amostras com baixo contraste e, portanto, é adequado para examinar espécimes fixos sem coloração e células vivas. Esses tipos de amostras têm diferenças muito baixas de absorbância em comparação com o meio circundante, e tais diferenças no índice de refração não podem ser detectadas pela microscopia de campo claro (BF). Na microscopia de contraste de fase, um anel no diafragma do condensador gera um cone oco de iluminação de ordem zero que é projetado no plano focal posterior da objetiva. Um anel de fase correspondente na lente da objetiva absorve a luz não difratada e desloca ligeiramente o comprimento de onda, aumentando assim o contraste. Essa abordagem funciona melhor com amostras relativamente finas (< 5 µm). O contraste de fase requer o uso de objetivas designadas em conjunto com anéis de fase alinhados (Nielson et al, 2016).
O uso da microscopia de contraste de fase é inestimável para determinar características específicas na identificação de bactérias filamentosas, como a presença de ramificações ou bainhas, dificilmente visíveis no campo claro (Lindea et al, 1999). De fato, a microscopia de contraste de fase, que diferencia estruturas de densidade diversa, pode ser usada para visualizar as estruturas internas do lodo ativado sem coloração e contrastar as bactérias filamentosas. A Figura 1 mostra duas imagens obtidas com microscopia de campo claro e microscopia de contraste de fase, onde o maior contraste dos organismos filamentosos usando aquisição de contraste de fase é claramente visível.

Figura 1: Imagens de uma mesma amostra de lodo biológico usando microscopia de campo claro e microscopia de contraste de fase com ampliação total de 100x. (a) Imagem de campo claro; (b) Imagem de contraste de fase.



A Figura 2 apresenta um microscópio equipado com contraste de fase. Todas as micrografias desse artigo foram feitas utilizando este equipamento.

Figura 2: Microscópio ótico equipado com contraste de fase (peça destacada pela seta).



ESTRUTURAS QUE DEVEM SER OBSERVADAS NA ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DO LODO ATIVADOS

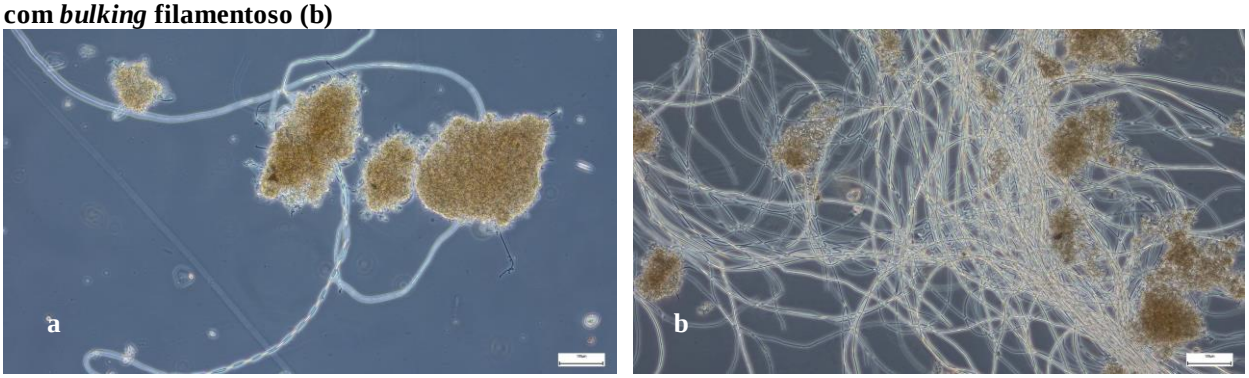
Na análise microbiológica devemos sempre observar dois grupos principais: as bactérias, que formam 95% de toda biomassa do lodo e os protozoários que compõe 5%.
Com relação as bactérias temos basicamente dois grupos principais: as formadoras de flocos biológicos, as quais na microscopia comum não é possível observar, mas sim a floculação delas (flocos biológicos) e as bactérias filamentosas.
Abaixo tem a descrição dessas três principais avaliações (flocos biológicos, bactérias filamentosas e protozoários).

- **FLOCOS BIOLÓGICOS**

Um dos problemas mais frequentes e difíceis de controlar em uma planta de lodos ativados é o arraste de sólidos pelo efluente tratado. O arraste normalmente está relacionado com elevados valores de IVL, isto é, má formação dos flocos biológicos. Por isso é tão importante monitorar semanalmente a qualidade dos flocos.
Os flocos de lodo ativado são caracterizados por sua forma, estrutura, resistência e tamanho (Eikelboom, 2000). A forma do floco pode variar de mais ou menos circular a irregular. A forma de flocos mais comumente encontrada é a circular. Se os flocos possuírem formato irregular, sua velocidade de sedimentação é reduzida.
A forma dos flocos é uma característica que pode indicar fenômenos desfavoráveis no lodo. Por exemplo, uma forma em estrela, plumosa ou reticular geralmente está associada à presença de microrganismos filamentosos (principalmente bactérias e fungos), cujo excesso é indesejável, pois eles causam o *bulking* (Figura 3).
A estrutura dos flocos pode ser aberta (a água pode fluir através das partículas do floco) ou compactada. Em condições de hipóxia ou falta de alimento, os flocos assumem a forma compactada, cobertos por formações acinzentadas. A presença desses flocos no lodo causa uma diminuição de sua atividade. Existem muitos fatores diferentes que tornam o floco disperso, isso inclui o desenvolvimento de formas filamentosas, excesso ou deficiência de oxigênio, sobrecarga orgânica ou condições de escassez de nutrientes.

Os flocos sedimentam mais rapidamente se estiverem mais compactos. Com base na resistência, podem ser distinguidos em flocos firmes e fracos. Os flocos fracos podem ser facilmente danificados. O tamanho dos flocos do lodo é consideravelmente variável. Existem três classes de tamanho de flocos: pequenos, com diâmetro <150 µm; médios, de 150 a 500 µm; e grandes, >500 µm (Jenkins et al, 2003). Flocos médios e grandes decantam com maior facilidade.
Para conseguir fazer uma avaliação com toda essa riqueza de detalhes mais uma vez é necessário analisar a amostra em um microscópio com boa ótica e com contraste de fase.

Figura 3: Imagens microscópicas com contraste de fase e ampliação total de 100 x de flocos ideais (a) e com *bulking* filamentoso (b)



- **BACTÉRIAS FILAMENTOSAS**

Quando ocorre uma condição de *bulking* filamentoso, torna-se extremamente importante identificar a espécie causadora desse fenômeno, a fim de tomar medidas corretivas direcionadas à causa do problema. A maioria das bactérias filamentosas causa problemas na separação de sólidos no efluente tratado quando presentes em excesso, e algumas têm a capacidade de formar uma espuma espessa e marrom que é difícil de ser eliminada do tanque de aeração.
A Tabela 1 apresenta uma lista com as espécies de bactérias filamentosas registadas.

Tabela 1: Filamentos reconhecidos que causam bulking ou formação de espuma no lodo ativado.

Sphaerotilus natans	*Microthrix parvicella**
Tipo 1701	*Nocardia* spp.**
Haliscomenobacter hydrossis	*Nostocoida limiciola* I, II & III
Tipo 021N	Tipo 0961
Thiothrix I e II	Tipo 0581
Beggiatoa spp.	Tipo 0092
Tipo 0914	Tipo 0411
Tipo 0041	Tipo 1863**
Tipo 0675	Fungos
Tipo 1851	
Tipo 0803	

* essas filamentosas causam *bulking* e espuma
** essas filamentosas causam apenas espuma

Para identificar as espécies de bactérias filamentosas presentes em uma amostra de lodo é importante obter informações sobre as características descritas abaixo (Eikelboom e van Buijsen, 1981) (Figura 4).

Forma dos filamentos. Os filamentos podem ser retos, curvados, miceliais ou enrolados.

Tamanho e forma das células dentro do filamento. Exemplo: bastonetes, cocos.

Ramificação. Fungos e actinomicetos, como a *Nocardia*, possuem filamentos ramificados. Algumas bactérias filamentosas, como a *Sphaerotilus natans*, exibem ramificações falsas.

Mobilidade dos filamentos. Por exemplo, a *Beggiatoa* se move deslizando em uma superfície.

Presença de uma bainha. Algumas bactérias filamentosas produzem uma bainha, que é uma estrutura tubular que envolve as células. Embora seja difícil de ver, essa estrutura pode ser observada em preparações onde as células estão ausentes. A coloração com violeta de cristal a 0,1% é um método comum para detectar a bainha. No entanto, em algumas bactérias filamentosas, como *Thiothrix*, as bainhas podem estar presentes em algumas cepas e ausentes em outras (Williams et al., 1987).

Presença de bactérias epifíticas na superfície dos filamentos. Várias células bacterianas se fixam à superfície de algumas bactérias filamentosas.

Tamanho e diâmetro do filamento. Esses fatores podem ser úteis para distinguir entre fungos e actinomicetos filamentosos ramificados, como a *Nocardia*.

Presença de grânulos. Grânulos são inclusões em bactérias filamentosas e são usados para armazenar alimentos. A presença de grânulos de enxofre é indicada pela observação de grânulos amarelos brilhantes após adição de sulfeto de sódio ou tiossulfato à amostra. *Beggiatoa, Thiothrix* e tipo 021N possuem grânulos de enxofre. Os grânulos de enxofre são cercados por um envelope de camada única dentro de invaginações da membrana citoplasmática (Richard et al., 1985b).

Coloração de esfregaços secos de lodo ativado. Os seguintes testes são realizados usando campo claro e aumento de 1000x diretamente:

- Coloração de Gram. Este teste distingue entre bactérias gram-positivas e gram-negativas e é baseado na composição química das paredes celulares bacterianas.
- Coloração de Neisser. Essa técnica de coloração ajuda na observação de grânulos de polifosfato em bactérias filamentosas. As células são coradas com uma mistura de azul de metileno e violeta de cristal, e são contracoradas com crisoidina Y (Eikelboom e van Buijsen, 1981). Bactérias Neisser-negativas aparecem como filamentos de cor marrom claro a amarelada, enquanto bactérias Neisser-positivas exibem grânulos de polifosfato escuros.

Usando essas características, então se tenta identificar as bactérias filamentosas de acordo com a chave dicotômica descrita por (Eikelboom, 1975; Eikelboom e van Buijsen, 1981; Jenkins et al., 1984). A Figura 5 exibe micrografias de algumas bactérias filamentosas comumente encontradas nos sistemas de lodos ativados no Brasil.

Figura 4: Algumas características morfológicas de bactérias filamentosas. Adaptado de Eikelboom e van Buijsen (1981). Fonte: Bitton, 2005.

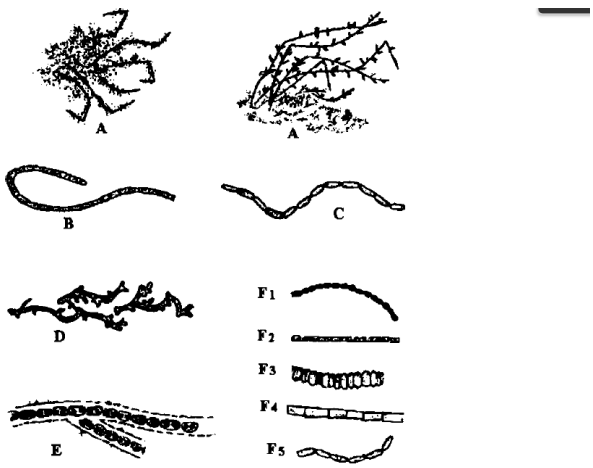
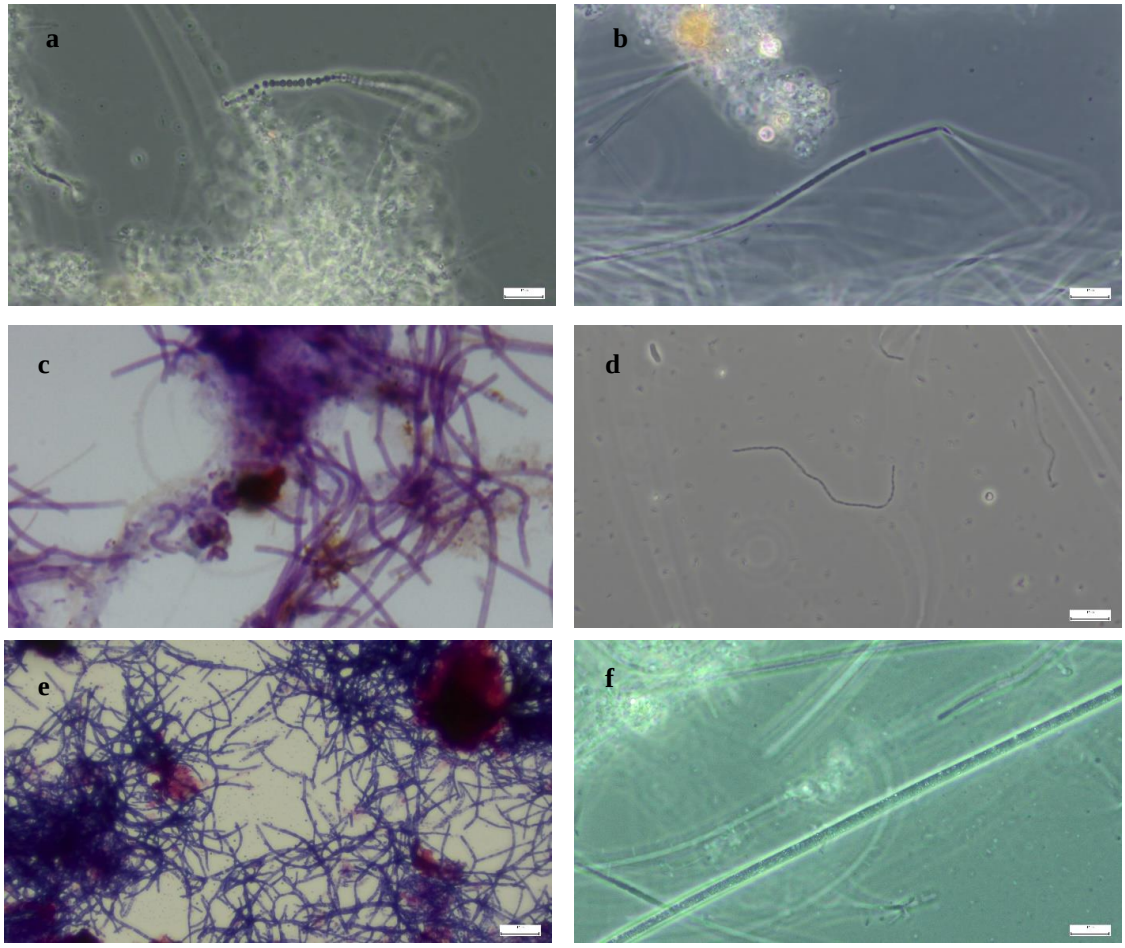


Figura 5: Alguns microrganismos filamentosos comuns observados em lodos com *bulking* no Brasil: (a) *Nostocoida limicola*; (b) *Sphaerotilus natans*; (c) tipo 0092; (d) tipo 1863; (e) *Nocardia* sp.; (f) tipo 021N. (exceto pela tipo 0092, que foi corado pela técnica de Neisser e a *Nocardia* sp. com Gram, todos os outros foram observados por microscopia de contraste de fase a 1000x).



A contagem e identificação das bactérias filamentosas feita de forma correta e semanalmente permite antecipar um episódio de *bulking* antes que ele se torne grave. Como a população microbiana no lodo ativado geralmente muda lentamente, exigindo geralmente 2 a 3 idades do lodo para mudar radicalmente, essa observação microscópica precisa ser realizada apenas em intervalos semanais. No entanto, durante um período de início de bulking ou durante a aplicação de medidas corretivas, a observação diária do lodo ativado é necessária (Department of Environmental Protection, 2009).

- **PROTOZOÁRIOS & METAZOÁRIOS**

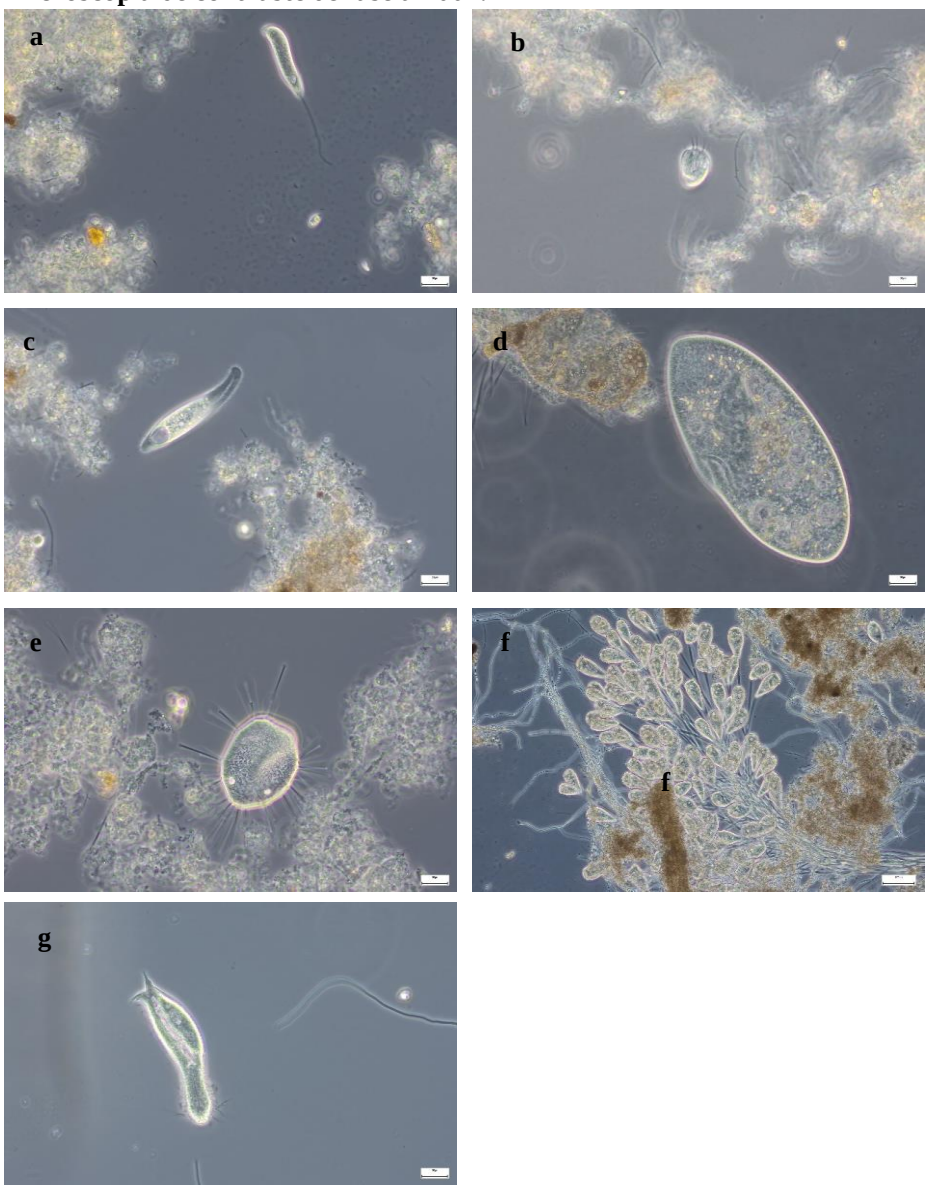
Os protistas são organismos comumente encontrados nos sistemas de lodos ativados, com densidades aproximadas de 3 a 20 x 10^6 ind/L (Madoni, 2011). Numerosos autores divulgaram listas de protistas encontrados em lodos ativados, sendo a primeira lista completa de 228 espécies proposta por Curds (1975), das quais 160 pertencem ao filo Ciliophora, embora apenas um número limitado tenha sido observado regularmente (Madoni, 2011).
Alguns estudos indicam que a comunidade de protistas varia na maioria das ETEs de acordo com as condições operacionais e fatores ambientais, como temperatura, pH, amônia, salinidade ou concentração de metais pesados (Curds, 1975; Poole, 1984; Hoffman & Atlas, 1987; Salvadó, 1994; Madoni, 1994b; Salvadó et al., 2001; Lishman et al., 2000).
Os protistas, juntamente com as bactérias, são o grupo de microrganismos mais importantes na microbiota de lodos ativados. Os protozoários, juntamente com outras formas de vida superiores (metazoários) correspondem

aproximadamente a 5% do peso seco da matéria em suspensão no licor misto (Serrano et al., 2008 a), embora alguns autores estimem que possam atingir valores de 250 mg/L (peso seco), representando aproximadamente 9% dos sólidos voláteis (Madoni, 1994a).

Apesar da relação dos protistas com a remoção da matéria orgânica nos processos de tratamento (Curds, 1975), uma de suas funções mais importantes é a participação nas cadeias tróficas, principalmente na predação das populações de bactérias livres (processos de bacterivoria), desempenhando assim um papel direto na eliminação de contaminantes e microrganismos patogênicos do licor misto (Holubar et al., 2000). Embora alguns protistas (como os ciliados andarilhos e outros organismos que se alimentam de bactérias floculantes) estimulem o crescimento bacteriano no floco, a maioria deles (principalmente os ciliados sésseis) se alimenta apenas de partículas e bactérias livres. Portanto, são considerados principalmente consumidores primários no tratamento de efluentes, melhorando a qualidade do efluente tratado e contribuindo indiretamente para a redução da produção de lodo (Lee et al., 2004). Além disso, a presença de ciliados tem sido associada à redução de colônias viáveis de *Escherichia coli* (Curds & Fey, 1969).

A Figura 6 exibe micrografias de algumas espécies de protozoários comumente registrados em lodos ativados no Brasil.

Figura 6: Alguns protozoários comuns observados em lodos ativados no Brasil: (a) Flagelado *Peranema* sp. (b) Ciliado andarilho *Aspidisca* sp. (c) ciliado livre *Litonotus* sp.; (d) ciliado livre *Paramecium* sp. (e) Suctória.; (f) ciliados fixos coloniais e (g) metazoários Gastrotríquio. Todos foram observados por microscopia de contraste de fase a 400x.



RESULTADOS

A pesquisa conduzida em 197 Estações de Tratamento de Efluentes (ETEs) instaladas em 185 indústrias de médio e grande porte e 12 concessionárias públicas de saneamento (Tabela 2) revelou que a maioria das ETEs investigadas (48,7%) não realiza análise de amostras de lodo, devido à falta de um microscópio na ETE.
Os analistas das empresas que participaram dessa pesquisa relataram que as suas empresas não investem em um microscópio adequado pois acreditam ser um investimento muito elevado. Muito provavelmente porque não conhecem todas as vantagens em ter essa avaliação semanal no controle de processo de suas ETEs.
Apenas 41,1% dessas empresas possuem um microscópio, porém, o equipamento é inadequado para realizar uma análise completa dos microrganismos presentes no lodo, uma vez que não possui contraste de fase, resultando em uma frequência de análise abaixo do mínimo necessário.
Observou-se que 8,1% das empresas pesquisadas, mesmo com o microscópio inadequado, realizam análises semanais, porém, nesse caso, somente conseguem avaliar de maneira confiável a densidade e diversidade dos protozoários e metazoários. Essa avaliação é importante, mas não tem relação direta com a sedimentabilidade do lodo.
Por fim, constatou-se que apenas 2% das empresas pesquisadas possuem o microscópio apropriado, equipado com contraste de fase, e realizam uma avaliação completa do lodo. Essas empresas são capazes de realizar a classificação dos flocos biológicos, a contagem e identificação das bactérias filamentosas, bem como dos protozoários e metazoários. Dessa forma, conseguem operar suas ETEs em tempo real, tomando ações corretivas ou preditivas de forma rápida e eficiente.

Tabela 2: Resultado da pesquisa sobre o uso da microscopia em 197 ETEs no Brasil.

Não tem microscópio	48,7%
Tem microscópio apenas com campo claro, mas não analisa o lodo com muita frequência	41,1%
Tem microscópio apenas com campo claro e analisa o lodo semanalmente	8,1%
Tem microscópio com contraste de fase e analisa o lodo semanalmente	2,0%

CONCLUSÕES

Monitorar a biomassa dos sistemas de lodos ativados é tão importante quanto as outras análises físico-químicas de rotina.
Os microrganismos presentes na biomassa são indicadores poderosos das condições operacionais e frequentemente apresentam sintomas de estresse ou toxicidade dias antes da deterioração real do desempenho na remoção de DBO, amônia ou SST. Exames microscópicos de rotina podem ajudar os operadores a prever problemas no tratamento antes mesmo que os sintomas de problemas subjacentes apareçam.
Infelizmente, essa avaliação ainda é subutilizada nas ETEs do Brasil. Avaliações mais avançadas, como por exemplo, o sequenciamento de DNA, já estão sendo utilizadas na identificação de microrganismos do lodo ativado, mas isso, em curto prazo, não substituirá a avaliação microscópica, principalmente no quesito classificação dos flocos biológicos.
A composição incorreta da biomassa corresponde diretamente a problemas operacionais. Um objetivo da microscopia do lodo ativado é interpretar problemas de controle do processo para que o operador possa gerar soluções de forma mais eficaz.
Simplesmente identificar os sintomas de um problema não necessariamente indica a causa. Por exemplo, a má capacidade de sedimentação pode estar relacionada a um crescimento excessivo de microrganismos filamentosos, partículas de flocos muito pequenas, ausência de protozoários ou crescimento bacteriano disperso. Cada um desses problemas pode requerer um método de tratamento diferente, o que ilustra a importância de identificar a verdadeira causa do problema para reverter a situação da biomassa.
Seja para manutenção preventiva ou para diagnosticar problemas, as análises microscópicas podem fornecer informações valiosas sobre o processo de tratamento de efluentes sanitários e industriais. Os microrganismos são os responsáveis pelo tratamento do lodo ativado, portanto, é importante que os operadores conheçam a saúde do seu lodo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BITTON, G. *Wastewater microbiology* 3º ed. Published by John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2005

2. CURDS, C.R. *Protozoa en Ecological Aspects of Used Water Treatment*, v I. Curds, C.R., y Hawkes, H.A. (eds). London: Academic Press, p. 203-268, 1975

3. CURDS, C.R., Y FEY, G.J. *The effect of ciliated protozoa on fate of Escherichia coli in the activated sludge process*. Water Research v. 3, p. 853-867, 1969.

4. EIKELBOOM, D.H. *Filamentous organisms observed in activated sludge*. Water Res. v.9: p.365– 388, 1975

5. EIKELBOOM, D.H., AND H.J.J. VAN BUIJSEN. *Microscopic Sludge Investigation Manual*, Report #A94a, TNO Research Institute, The Netherlands, 1981

6. EIKELBOOM, D.H, *Process Control of Activated Sludge Plants by Microscopic Investigation*. IWA Publishing, London, England, 2000.

7. HOFFMAN, R.L., Y ATLAS, R.M. *Measurement of the effects cadmium stress on protozoan grazing of bactéria (bacterivory) in activated sludge by fluorescence microscopy*. Applied an Environmental Microbiology, v.53, p. 2440- 2444, 1987.

8. HOLUBAR, P., GRUDKE, T., MOSER, A., STRENN, B., Y BRAUN, R. *Effects of bacterivorous ciliated protozoans on degradation efficiency of a petrochemical activated sludge process*. Water Research, v. 34, p. 2051-2060, 2000.

9. JENKINS D, RICHARD M. G and DAIGGER. *Manual on the causes and control of activated sludge bulking, foaming and other solids separation problems*. 3º ed. London, England, 2003.

10. JENKINS, D., M.G. RICHARD, AND G.T. DAIGGER. *Manual on the Causes and Control of Activated Sludge Bulking and Foaming, Water Research*. Commission, Pretoria, South Africa, 1984.

11. LEE, S., BASU, S., TYLER, C.W., Y WEI, I.W.*Ciliate populations as bio-indicators at Deer Island treatment plant*. Advances in Environmental Research, v. 8, p. 371-378, 2004.

12. LINDEA, K.C, SERVIOUR R.J, BLACKALL, L.L, SODDELL, J.A.. *Practical methods for the examination and characterization of activated sludge, in: R.J. Seviour, L.L. Blackall (Eds.), The Microbiology of Activated Sludge*, Kluwer Academic Publishers, London, 1999.

13. LISHMAN, L.A., LEGGE, R.L., Y FARQUHAR, G. *Temperature effects on wastewater treatment under aerobic and anoxic conditions*. Water Research, v. 34, p. 2263-2276, 2000.

14. MADONI, P. *A sludge biotic index (SBI) for the evaluation of the biological performance of activated sludge plants based on the microfauna analysis*. *Water Res*. v.28, 1994.

15. MADONI, P. *Estimates of ciliated protozoa biomass in activated sludge and biofilm*. Bioresource Technology, v.48, p. 245-249, 1994a.

16. MADONI, P. *A sludge biotic index (SBI) for the evaluation of the biological performance of activated sludge plants based on the microfauna analysis*. Water Research, v28, p. 67-75, 1994b.

17. MADONI, P. *Protozoa in wastewater treatment processes: a minireview*. Italian Journal of Zoology, v.78(1), p. 3-11, 2011.

18. MESQUITA, D.P., AMARAL, A.L., FERREIRA, E.C. *Activated sludge characterization through microscopy: A review on quantitative image analysis and chemometric techniques*. Anatytica Chimica Acta. v.802, p. 14-28, nov. 2013.

19. NIELSON, J.L., VAZQUES, C.M.L, BRDJANOVIC, D. *Experimental Methods In Wastewater Treatment* (eBook). Published by IWA Publishing, London, UK., 2016.

20. NOTES ON ACTIVATED SLUDGE PROCESS CONTROL. Prepared By: State of MaineDepartment of Environmental Protection. 2009.

21. POOLE, J.E.P. *A study of the relationship between the mixed liquor fauna and plant performance for a Variety of activated sludge sewage treatment works*. Water Research, v.18. p. 281-187, 1984.

22. RICHARD, M.G., G.P. SHIMIZU, AND D. JENKINS. *The growth physiology of the filamentous organism type 021N and its significance to activated sludge bulking*. J. Water Pollut. Control Fed. v.57. p. 1152–1162. 1985b.

23. SALVADÓ, H. *Effect of mean cellular retention time on ciliated protozoan populations in urban wastement plants based on a proposed model*. Water Research, v. 28, p. 1315-1321, 1994.

24. SALVADÓ, H., MAS, M., MENENDEZ, S., Y GRACIA, M.P. *Effects of shock loads of salt on protozoan communities of activated sludge*. Acta Protozoology, v.40(3), p. 177-185, 2001.

25. SERRANO, S., ARREGUI, L., PÉREZ-UZ, B., CALVO, P., Y GUINEA, A. *Guidelines for the Identification of Ciliates in Wastewater Treatment Plants*. London: IWA Publishing, 2008a.

26. WILLIAMS, T.M., R.F. UNZ, AND J.T. DOMAN. Ultrastructure of *Thiothrix* spp. and “type 021N” bacteria. Appl. Environ. Microbiol. v. 53 p. 1560–1570, 1987.