

## **Coleta, ativação e aplicação de Microrganismos Eficientes (EM's) no tratamento de esgoto sanitário**

C.Z. CORREA<sup>1</sup>, D. H. NAKAGAWA<sup>1</sup>, L.F.F. DEMETRIO<sup>1</sup>, B. O. FREITAS<sup>2</sup> e K. V. M. C. PRATES<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Universidade Tecnologia Federal do Paraná

<sup>2</sup> Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Departamento de Engenharia Ambiental  
E-mail para contato: camila.z.correa@gmail.com

**RESUMO** – O objetivo do trabalho foi coletar e ativar Microrganismos Eficientes (EM's) para utilização no tratamento de esgoto sanitário. A coleta dos EM's foi realizada em mata nativa e a ativação com caldo de cana de açúcar. Após 30 dias de fermentação, amostras foram coletadas para cultivo em meios específicos para Bactérias Fermentadoras de Lactose (BFL), Leveduras (LVD) e Actinomicetos (ACT) a fim de determinar as Unidade Formadora de Colônia/mL (UFC/mL) e caracteriza-las morfológica e microscopicamente. Repetiu-se os mesmos procedimentos com o esgoto sanitário bruto. A solução de EM's mais esgoto bruto foram inseridos em Reator em Bateladas Sequenciais Aerado (RBSa) contendo material suporte. Para quantificação dos EM's presentes no RBSa retirava-se um material suporte em ciclos específicos. Realizou-se análises de pH e DQO<sub>T</sub> no esgoto bruto e tratado. Os resultados da quantificação da solução de EM's ativado foram da ordem 10<sup>8</sup> UFC/mL para cada grupo estudado. No esgoto sanitário bruto obteve-se 10<sup>4</sup>, 10<sup>6</sup> e 10<sup>7</sup> UFC/mL de BFL, LVD, e ACT, respectivamente. Quando avaliada a quantidade de EM's aderidos ao material suporte chegou-se à ordem de 10<sup>9</sup> UFC/mL. A caracterização macroscópica das colônias indicou grande diversidade dos microrganismos de interesse. Quanto a DQO<sub>T</sub> atingiu-se redução de cerca de 70% e o pH saiu da faixa da neutralidade para a de alcalinidade. Conclui-se que existe a viabilidade da coleta, ativação e utilização dos EM's em processo de tratamento biológico de esgoto.

### **1. INTRODUÇÃO**

No Japão, há aproximadamente 30 anos alguns microrganismos vêm sendo capturados e utilizados na agricultura natural como alternativa aos fertilizantes sintéticos (MITSUIKI, 2006). Estes microrganismos são conhecidos como Microrganismos Eficazes ou EM's.

O grupo dos EM's é formado por organismos benéficos, altamente eficientes, não patógenos e não geneticamente modificados (ZACARIA, *et al*, 2010). Deste grupo de organismos os de maior predominância são as bactérias fermentadoras de lactose e leveduras, e em menor número os actinomicetos, as bactérias fotossintéticas e outros tipos de organismos, sendo que todos esses são compatíveis uns com os outros e podem coexistir em cultura líquida (HIGA; PARR, 1994).

Inicialmente o uso da tecnologia EM foi desenvolvida como uma alternativa para os fertilizantes sintéticos e pesticidas (HIGA; WOOD, 2013, p. 03), porém nos últimos tempos a utilização do mesmo vem sendo estendida para tratamentos de águas, efluentes e controle de maus odores.

Com o intenso crescimento da população e por consequência o aumento da geração de efluentes domésticos torna-se importante o desenvolvimento de tecnologias sustentáveis e eficientes no tratamento deste resíduo. Conhecendo-se da literatura atual a eficiência da utilização dos EM's em vários processos inclusive no processo de degradação da matéria orgânica, este trabalho teve como principal objetivo coletar, ativar e identificar Microrganismos Eficientes (EM's) para posterior utilização destes em um Reator em Bateladas Sequencias aerado (RBSa) com material suporte, no processo de tratamento biológico de esgoto sanitário.

## **2. MATERIAIS E METODOS**

### **2.1 Coleta, Ativação dos EM's**

A coleta e ativação dos EM's foram realizadas segundo a metodologia proposta por Bonfim *et al.* (2011). O local escolhido para a coleta dos EM's, foi um ambiente de mata nativa, situada em uma propriedade rural a 5 Km do Distrito de Warta – PR, com acesso na Rodovia PR-545, com coordenadas 23°10'56"S e 51°12'46"O.

Para captura dos organismos cozinhou-se aproximadamente 0,7 Kg de arroz apenas com água por 15 minutos. Após esfriar o arroz, este foi distribuído em uma bandeja plástica com perfurações no fundo para que não ocorresse o acúmulo de água. A bandeja plástica com arroz foi deixada no local previamente escolhido e coberta com uma proteção de madeira, para evitar que animais pudessem mexer no mesmo, e também protege-lo do vento. Sobre esta proteção de madeira foi colocada a serapilheira presente no local.

Após um período de aproximadamente 15 dias, já foi possível observar no arroz deixado na mata, o crescimento de microrganismos de coloração rosada, azulada, amarelada e alaranjada, que segundo Bonfim *et al.* (2011) representa características de que os EM's estavam presentes no arroz (Figura 1). As partes que apresentaram estas colorações seguiram para o procedimento de ativação.

Para a ativação dos EM's, o arroz com crescimento dos microrganismos capturados foi distribuído em uma mistura de caldo de cana-de-açúcar e água (para cada 900 mL de água destilada foi adicionado 100 mL de caldo de cana-de-açúcar). Estas garrafas foram mantidas no laboratório e diariamente o gás produzido, em decorrência da ação dos microrganismos, era liberado. Após este período de produção de gás – cerca de 30 dias, a solução de EM's apresentava uma coloração alaranjada com cheiro doce e agradável. Esta solução foi então armazenada 5°C em câmara fria.



Figura 1 –Arroz coletado na mata com características de crescimento dos EM's.

## 2.2 Sistema De Tratamento Utilizado - RBSa

Após a coleta e ativação dos EM's, a solução ativada foi inserida em um RBSa misturada ao esgoto sanitário bruto. O RBSa construído tinha altura total de 64 cm, diâmetro 24,5 cm e volume útil de 10 litros, sendo que destes 50% foram ocupados pelo material suporte – espuma de poliuretano e 20% por lodo. Como o meio suporte utilizado era poroso, o volume útil a ser tratado de efluente no reator foi de 6,5 Litros.

O RBSa continha um termostato (Marca H-606, com a finalidade de manter a temperatura do esgoto constante a 25°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ), um sistema de aeração (Bomba modelo big Air A-420, com vazão de 4,5 L/min, sendo a distribuição do oxigênio realizada no fundo do reator por meio de quatro pedras porosas), uma bomba para o processo de alimentação e uma bomba para o processo de descarte de efluente (Marca: Robertshaw de 127 60Hz 34w). O reator foi operado por sistema automatizado programado em um painel de controle e automação, com a função de controle do tempo de descarte e enchimento, além do período destinado a aeração.

O experimento foi conduzido por 76 ciclos, sendo estes de 8 horas cada, totalizando 25 dias de operação e 608 horas. No início de cada ciclo, o reator era alimentado com 6,5 litros de esgoto sanitário mais 6,5 mL de solução de EM's ativado (1/1000) baseado no trabalho Namsivayan; Narendrakumar e Kumar (2011) (Fase de enchimento – 5 minutos). A fase de reação aeróbia teve duração de 6,85 horas e a fase de sedimentação 1 hora. Ao termino de cada ciclo, o efluente era descartado (Fase de descarte – 4 minutos).

## 2.3 Caracterização dos EM's ativados, presentes no esgoto sanitário bruto e no material suporte do Reator em Bateladas Sequenciais Aerado- RBSa

A caracterização quantitativa para determinação das Unidades Formadoras de Colônia/mL (UFC/mL) dos EM's ativados e inserido no RBSa foi realizada logo após a ativação da solução e a

caracterização quantitativa dos EM's presente no esgoto sanitário bruto foi realizado semanalmente após a coleta na estação de tratamento de esgoto. Análises para determinação da UFC/mL dos EM's também foram realizadas no material suporte presentes no RBSa em tempos específicos (Tabela 1).

Tabela 1 – Tempos de amostragem dos materiais suportes para determinação da UFC/mL dos EM's.

Ciclo	Tempo de Operação Total dos Reatores (Horas)	Ciclo	Tempo de Operação Total dos Reatores (Horas)
1 <sup>o</sup>	8	16 <sup>o</sup>	128
2 <sup>o</sup>	12	22 <sup>o</sup>	176
2 <sup>o</sup>	16	28 <sup>o</sup>	224
4 <sup>o</sup>	32	34 <sup>o</sup>	272
6 <sup>o</sup>	44	40 <sup>o</sup>	320
7 <sup>o</sup>	56	49 <sup>o</sup>	392
10 <sup>o</sup>	80	58 <sup>o</sup>	464
13 <sup>o</sup>	104	76 <sup>o</sup>	608

Para a caracterização dos EM's presentes na solução de EM's ativada e no esgoto sanitário, foi realizada a diluição em série em solução salina (0,80%), até a diluição 10<sup>-6</sup>. Com auxílio de uma pipeta automática alíquotas de 0,1 mL das diluições: 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-4</sup> e 10<sup>-6</sup>, foram retiradas e espalhadas, com uso de swab estéril, em placas de Petri contendo meio específico para contagem dos microrganismos – estes meios foram incubados em temperaturas adequadas para cada tipo de microrganismo.

O material suporte era retirado do reator seguindo os tempos apresentados na Tabela 1, e adicionado em um tubo Falcon com 5g de pérolas de vidro e 10 mL de solução Tween 1%, depois colocava-se mais 5g de pérolas de vidro, e agitava-se o tubo durante um minuto para promover a separação dos microrganismos da espuma, sendo este considerado como a primeira diluição. Posteriormente realizava-se a diluição seriada e o plaqueamento das amostras seguindo procedimento semelhante ao citado no parágrafo anterior.

Os meios específicos utilizados para o cultivo do microrganismos pertencentes aos EM's foram: Meio Yeast Peptone Dextrose (YPD): Leveduras - LVD (28°C±1); Meio sólido Amido Caseína (AC): Actinomicetos - ACT (36°C±1); Meio Agar MRS: Bactérias Fermentadoras de Lactose - BFL (36°C±1).

Após o período de incubação para cada grupo de organismos, foi realizada a contagem das UFC/mL. Em seguida, realizava-se a caracterização macroscópica das colônias presentes nas placas de Petri, a fim de analisar a diversidade de colônias existentes para cada grupo.

Foi realizado também, teste morfo-tintorial a coloração de Gram – segundo Okura (2008), dos EM's cultivados para identificação e confirmação dos organismos cultivados.

## 2.4 Análises físico-químicas

Foram realizadas semanalmente no esgoto sanitário bruto coletado e na saída RBSa nos mesmos tempos de coleta do material suporte, análises de pH e Demanda Química de Oxigênio Total (DQO<sub>T</sub>) segundo APHA (2012), a fim de se conhecer as características do mesmo.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 3.1 Quantificações dos EM's (UFC/mL) presente na solução ativada, no esgoto sanitário bruto e no material suporte

Analisando os resultados da solução de EM's ativada obteve-se cerca  $10^8$  UFC/mL para cada grupo estudado: BFL, LVD e ACT. No esgoto sanitário bruto foram quantificados  $10^4$  UFC/mL de BFL,  $10^6$  UFC/mL de LVD e  $10^7$  UFC/mL de ACT.

Conhecendo a quantidade de EM's inserida no RBSa e presentes naturalmente no esgoto sanitário, foi possível determinar a concentração inicial destes em cada ciclo de operação do RBSa, sendo esta de:  $10^5$  UFC/mL de BFL,  $10^6$  UFC/mL de LVD e  $10^7$  UFC/mL de ACT.

Com relação a concentração de EM's encontradas no material suporte, pode-se visualizar os resultados na Tabela 2, onde são apresentados os valores de UFC/mL nos tempos de amostragem pré-determinados.

Dos resultados constata-se que as BFL e LVD com 16 horas de operação do RBSa já havia atingido a sua concentração máxima no material suporte, já quanto aos ACT a sua concentração máxima foi obtida com 80 horas de operação do RBSa. Durante todo o período de monitoramento do reator foram constatadas a existência destes microrganismos no biofilme estabelecido no material suporte, indicando boa adaptação ao sistema de tratamento.

Namsivayan; Narendrakumar e Kumar (2011) em seu estudo utilizaram uma solução de EM's com o objetivo de avaliar qual a influencia na redução de alcalinidade total, sólidos dissolvidos, DBO e DQO do esgoto doméstico. O reator supracitado possuía capacidade para 2 litros, sendo que destes, 1 litro foi preenchido inicialmente com esgoto doméstico e 100 mL de EM's ativados. O reator foi operado por 20 dias, sendo que nos 5 primeiros dias de experimento, foram adicionados mais 0,0001 mL (1/10,000) de EM's no reator.

Estes autores afirmaram que na concentração de EM's inseria no seu reator havia cerca de 1,0.  $10^4$  UFC/mL de bactérias fermentadoras de ácido láctico,  $10^5$  UFC/mL de LVD,  $10^3$  UFC/mL de ACT e  $10^5$  UFC/mL de fungos fermentadores.

O valor inicial encontrado pelos referidos autores em seu reator foram de:  $11,2 \cdot 10^4$  de bactérias fermentadoras de ácido láctico,  $2,4 \cdot 10^2$  actinomicetos,  $12,0 \cdot 10^3$  leveduras e  $41,1 \cdot 10^3$  UFC/mL de bolores. E após 20 dias de incubação estes valores passaram para  $41,0 \cdot 10^7$  UFC/mL de bactérias,  $51,0 \cdot 10^2$  UFC/mL de actinomicetos,  $27,1 \cdot 10^5$  UFC/mL de leveduras e  $54,1 \cdot 10^4$  UFC/mL de bolores.

Tabela 2 – Concentração de EM's em UFC/mL presentes no material suporte

<b>Ciclos</b>	<b>Tempo de Operação (Horas)</b>	<b>BFL (UFC/mL)</b>	<b>LVD (UFC/mL)</b>	<b>ACT (UFC/mL)</b>
1 <sup>0</sup>	8	2.20.10 <sup>5</sup>	7.05.10 <sup>8</sup>	3.05.10 <sup>7</sup>
2 <sup>0</sup>	12	2.55.10 <sup>5</sup>	7.00.10 <sup>8</sup>	6.75.10 <sup>8</sup>
2 <sup>0</sup>	16	3.05.10 <sup>7</sup>	1.30.10 <sup>9</sup>	9.00.10 <sup>8</sup>
4 <sup>0</sup>	32	8.50.10 <sup>4</sup>	1.82.10 <sup>9</sup>	5.55.10 <sup>8</sup>
6 <sup>0</sup>	44	2.50.10 <sup>4</sup>	1.56.10 <sup>9</sup>	9.65.10 <sup>8</sup>
7 <sup>0</sup>	56	3.05.10 <sup>5</sup>	5.50.10 <sup>8</sup>	5.65.10 <sup>7</sup>
10 <sup>0</sup>	80	9.00.10 <sup>4</sup>	2.25.10 <sup>5</sup>	1.13.10 <sup>9</sup>
13 <sup>0</sup>	104	1.35.10 <sup>7</sup>	9.35.10 <sup>7</sup>	1.12.10 <sup>9</sup>
16 <sup>0</sup>	128	5.30.10 <sup>5</sup>	4.65.10 <sup>7</sup>	1.29.10 <sup>8</sup>
22 <sup>0</sup>	176	5.40.10 <sup>5</sup>	6.50.10 <sup>8</sup>	1.33.10 <sup>9</sup>
28 <sup>0</sup>	224	3.50.10 <sup>6</sup>	3.00.10 <sup>7</sup>	-
34 <sup>0</sup>	272	5.00.10 <sup>5</sup>	3.50.10 <sup>7</sup>	4.80.10 <sup>8</sup>
40 <sup>0</sup>	320	9.50.10 <sup>4</sup>	1.05.10 <sup>8</sup>	3.20.10 <sup>8</sup>
49 <sup>0</sup>	392	5.00.10 <sup>5</sup>	3.50.10 <sup>7</sup>	1.50.10 <sup>7</sup>
58 <sup>0</sup>	464	1.00.10 <sup>4</sup>	3.90.10 <sup>8</sup>	1.20.10 <sup>8</sup>
76 <sup>0</sup>	608	1.50.10 <sup>6</sup>	3.50.10 <sup>7</sup>	3.10.10 <sup>8</sup>

Os autores supracitados constataram que todos os parâmetros testados apresentaram redução, e quanto ao número de organismos em suspensão, notaram que o total da população bacteriana e de leveduras aumentou e quanto à população de fungos e actinomicetos não houve mudança significativa.

Observando os resultados demonstrados na Tabela 2, e os obtidos pelos autores acima, constata-se que o número de organismos do grupo dos EM's encontrou-se em número mais elevado no final deste experimento, do que nos obtidos por Namsivayam, Narendrakumar e Kumar (2011), isto possivelmente pode ser explicado pelo fato dos organismos analisados nesse trabalho serem aqueles aderidos na espuma de poliuretano, formando biofilme, o que possivelmente favoreceu o crescimento e desenvolvimento destes.

### **3.2 Caracterização macroscópica (culturais) e microscópica (morfológicas) dos EM's (UFC/mL) presente na solução ativada, no esgoto sanitário bruto e no material suporte**

Na caracterização macroscópica realizada nas colônias presentes nos meios específicos, todos os grupos apresentaram grande diversidade morfológica, sendo observado para o grupo das BFL cerca de 25 tipos de colônias diferentes, 45 tipos de LVD e 30 colônias diferentes de ACT.



Das colônias cultivadas foram escolhidas cerca de 6 tipos morfológicos diferentes de BFL, LVD e ACT diferentes para realização da coloração de Gram. As análises confirmaram que todas as colônias analisadas pertenciam aos grupos de interesse.

### 3.3 Análises Físico- Químicas: Esgoto Sanitário Bruto E Na Saída Do RBSa

Para o esgoto sanitário bruto foram realizadas no total 4 análises de pH e DQO<sub>T</sub>. O valor médio de pH foi de  $7,2 \pm 0,4$  e DQO<sub>T</sub> médio de  $464 \pm 86$ . Os valores obtidos estavam dentro das faixas de valor (DQO<sub>T</sub>: 450-800 mg/L; pH: 6,7-8,0) para um esgoto sanitário típico, segundo Von Sperling (2005). Na saída do RBSa foram realizadas 8 análises de pH e DQO<sub>T</sub>. Na Tabela 3 são apresentados os valores de pH e DQO<sub>T</sub> no efluente tratado.

Tabela 3 – Resultados de pH e DQO<sub>T</sub> (mg/L) do efluente tratado na saída do RBSa nos ciclos analisados.

Ciclo	pH	DQO <sub>T</sub> (mg/L)	Ciclo	pH	DQO <sub>T</sub> (mg/L)
1 <sup>o</sup>	8.25	138	16 <sup>o</sup>	7.92	166
2 <sup>o</sup>	8.26	138	22 <sup>o</sup>	8.07	147
2 <sup>o</sup>	8.27	138	28 <sup>o</sup>	7.97	101
4 <sup>o</sup>	8.05	188	34 <sup>o</sup>	7.92	97
6 <sup>o</sup>	8.06	188	40 <sup>o</sup>	7.89	71
7 <sup>o</sup>	8.36	145	49 <sup>o</sup>	8.02	73
10 <sup>o</sup>	8.22	96	58 <sup>o</sup>	7.83	66
13 <sup>o</sup>	8.05	155	76 <sup>o</sup>	8.12	57

Avaliando os resultados de DQO<sub>T</sub> na entrada e saída (Tabela 3) do RBSa, nota-se que houve redução da carga orgânica na saída do reator desde o primeiro ciclo, e após estabilização do sistema foi obtida remoção média de 70,8% de DQO<sub>T</sub>. Quanto ao pH, observa-se que o valor do mesmo aumentou na saída do RBSa, saindo da zona da neutralidade para alcalinidade.

## 4. CONCLUSÃO

Avaliando os resultados constata-se a viabilidade da coleta, ativação e utilização dos EM's no processo de tratamento biológico de esgoto sanitário. Sendo estes organismos capazes de se manterem vivos e de se reproduzirem quando inseridos em um RBSa com esgoto sanitário bruto, além de apresentarem grande diversidade macroscópica quando presentes em tal ambiente.

## 5. REFERENCIAS

APHA, *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 22. Ed. Washington: American Public Health Association, 2012.

BONFIM, Filipe P. G. et al. *CADERNO DOS MICRORGANISMOS EFICIENTES (EM)*. 2011. Disponível em:< <http://www.sunnet.com.br/biblioteca/livros-e-textos/caderno-dos-microorganismos-eficientes.pdf> >. Acesso em: 18 Jan. 2013.

HIGA, T; PARR, J. F. BENEFICIAL AND EFFECTIVE MICROORGANISMS for a SUSTAINABLE AGRICULTURE AND ENVIRONMENT. *International Nature Farming Research Center*. Japão, 1994. Disponível em:< <http://www.agriton.nl/higa.html> >. Acesso em: 15 jan. 2013.

HIGA, T; WOOD, M. *Effective Microorganisms for Sustainable Community Development: A National Case Study of Cooperation and Co-Prosperity in North Korea for the Preservation of Environmental, Agricultural, Economic, and Cultural Integrity*. SCD: Japão. Disponível em: < <http://www.envismadrasuniv.org/pdf/Effect%20Microorganisms.pdf>>. Acesso em: 15 jan. 2013.

MITSUIKI, C. *Efeitos de sistemas de preparo de solo e do uso de Microrganismos Eficazes nas propriedades físicas do solo, produtividade e qualidade da batata*. 2006. 98 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

NAMSIVAYAN, S. K. R.; NARENDRAKUMAR, G.; KUMAR, A. Evaluation of Effective Microorganism (EM) for treatment of domestic sewage. *Journal of Experimental Sciences*, v. 2, n. 7, p. 30-32, 2012.

OKURA, M. H. *Microbiologia: roteiros de aulas práticas*. Riberão Preto, SP: Tecmedd, 2008.

VON SPERLING, M. *Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos*. 3. ed. v. 1. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e ambiental – Universidade Federal de Minas Gerais, 2005.

ZACARIA, Z; GAIROLA, S; SHARIFF, N M. Effective Microorganisms (EM) Technology for Water Quality Restoration and Potential for Sustainable Water Resources and Management. In: *International Congress on Environmental Modelling and Software Modelling for Environment's Sake* , 5, 2010, Ottawa. International Environmental Modelling and Software Society (iEMSs).