

Daniele Damasceno Silveira

**POTENCIAL DE REMOÇÃO DE
NITROGÊNIO EM UM ÚNICO ESTÁGIO
DE FILTROS PLANTADOS COM
MACRÓFITAS PARA O TRATAMENTO DE
ESGOTO DOMÉSTICO BRUTO: APORTE
DA BIOLOGIA MOLECULAR PARA A
COMPREENSÃO DOS PROCESSOS**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Engenharia Ambiental.
Orientador: Prof. Dr. Paulo Belli Filho
Coorientador: Prof. Dr. Luiz Sérgio Philippi

Florianópolis
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária
da UFSC.

A ficha de identificação é elaborada pelo próprio autor
Maiores informações em:
<http://portalbu.ufsc.br/ficha>

Daniele Damasceno Silveira

**POTENCIAL DE REMOÇÃO DE NITROGÊNIO EM UM ÚNICO
ESTÁGIO DE FILTROS PLANTADOS COM MACRÓFITAS
PARA O TRATAMENTO DE ESGOTO DOMÉSTICO BRUTO:
APOORTE DA BIOLOGIA MOLECULAR PARA A
COMPREENSÃO DOS PROCESSOS**

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de “Doutora em Engenharia Ambiental”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de pós-graduação em Engenharia Ambiental.

Florianópolis, 16 de junho de 2015.

Prof. William Gerson Matias, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Paulo Belli Filho, Dr.
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Luiz Sérgio Philippi, Dr.
Coorientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Marcos Von Sperling, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Pascal Molle, Dr.
Instituto Nacional de Pesquisa em
Ciências e Tecnologias para o Meio
ambiente e Agricultura – IRSTEA -
França

Prof^ª. Aline Viancelli, Dr^ª.
Universidade do Contestado

Prof^ª. Rejane Helena Ribeiro da
Costa, Dr^ª.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Pablo Heleno Sezerino, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

“Eu não sei se tem alguma coisa que alivia mais a gente do que quando chega alguém perto de nós naqueles momentos difíceis, pega nossa mão e diz: Eu estou aqui...”

Padre Fábio de Melo

Dedico este trabalho a minha mãe.

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores e professores Paulo Belli Filho e Luiz Sérgio Philippi, assim como ao meu orientador na fase de doutorado “sanduíche” Pascal Molle, por terem me recebido de braços abertos e por possibilitarem a realização deste trabalho. É muito difícil expressar o que sinto quando me lembro de todo o caminho que percorri, de todo o meu crescimento profissional e da confiança que em mim foi depositada por estes pesquisadores e professores excelentes. Por isso, emociono-me muito ao escrever essas palavras. A vocês confio meu enorme respeito e digo: muito obrigada! Agradeço especialmente a Pascal Molle, que foi um grande mestre e que, carinhosamente, teve paciência e não mediu esforços para me ensinar dia após dia, quando eu estava na França e mesmo depois de voltar ao Brasil.

Aos membros da banca, os professores Marcos Von Sperling, Aline Viancelli, Rejane H. R. da Costa e Pablo Sezerino, pela disponibilidade e imensa contribuição a este trabalho.

Aos meus colegas franceses, que me acolheram incrivelmente bem, o que permitiu com que saíssem do status de colegas apenas e passassem a ser amigos, destes levamos para sempre. Meu carinho e agradecimento especial à minha querida Bidou (Bernadette Volat), minha supervisora laboratorial, pelas orientações cheias de amor e carinho.

À minha grande amiga, Boram Kim, que me ensinou, me apoiou, me deu forças, carinho e sua amizade incondicional, além de me apresentar e fazer gostar da comida coreana. Muito obrigada!

Aos amigos que fiz em Lyon, especialmente à Letícia, Raíssa, Barbara e Mariana. Elas foram o melhor presente que Lyon me deu. Quantas coisas fizemos juntas, quanto “perrengue” passamos juntas, quanta alegria vivemos juntas. A cada palavra de conforto, a cada ligação de preocupação ao ligar para Raíssa apenas para saber onde ela estava, a cada momento de felicidade simples, como ir a feirinha juntas para brincar na neve, nos tornávamos uma família, a nossa família, e assim somos até hoje.

Aos meus amigos, Raphaëlle, Jordane e Sharon, que foram essenciais para que meu sonho se tornasse realidade.

Aos meus amigos, Marcelo, Tiago, Letícia e Isabela, que com o passar do tempo deixaram de serem “colegas” e sim, se tornaram amigos de verdade. Também à minha amiga/irmã, Naiara Ramos, pois estivemos sempre juntas, sempre ligadas, mesmo que só em

pensamento. À minha amiga, Diana, pois, como o próprio nome indica, só poderia mesmo ser uma mulher exemplar. Muito obrigada pela ajuda, apoio e pelas inúmeras vezes em que você disse: “Dani, você precisa se acalmar, és muito nervosa”.

Ao meu grande amigo, Jorge Tavares. O que dizer sobre esse “portuga”? Amigo, obrigada por tudo, por estares sempre ao meu lado, me ouvindo, me aconselhando, me dando broncas e me fazendo elogios. Você foi fundamental nessa jornada. E, não é que aquele ditado “ódio à primeira vista se transforma em amor” é verdade, mesmo?!

A todos os meus colegas e amigos da família Labeflu, que sempre estiveram ao meu lado, me apoiando. Rodrigo, nosso eterno conselheiro. Obrigada a todos vocês. Agradeço especialmente à Heloísa, Lorena e à minha querida Jossy, minhas amigas da biomol. Quantas discussões juntas, hein?! Mas o importante é não esquecer que o sentido da vida é $5' \rightarrow 3'$, não é mesmo?! Obrigada, especialmente, à Jossy, que esteve presente em minha vida de forma inquestionável quando eu mais precisei.

A todos os amigos do PGGEA, que são muitos e por isso não citarei nomes para não correr o risco de esquecer ninguém!

Ao PPGEA (Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina), ao coordenador do programa e a todos os professores com quem tive contato pelo conhecimento transmitido nas disciplinas e pelo apoio. E também ao ex-secretário, Lucas, que foi tão prestativo sempre que precisei.

À CAPES, ao CNPq e ao IRSTEA, pelo apoio na pesquisa e financiamento concedido para a realização deste trabalho.

Ao professor Rafael Dutra de Armas, por me orientar e ajudar nas análises moleculares.

Aos meus amigos da dança, Simone, Michelle, Rosane, Lenine e Fernando, que estiveram ao meu lado quando passei por uma situação complicada em minha vida.

Ao meu namorado, por estar sempre ao meu lado me incentivando, apoiando e ajudando, sem medir esforços para isso. Até o ouço falar: “se nada der certo hoje, amanhã você levanta mais cedo e tenta de novo! Eu confio em você”. Obrigada por sempre encontrar uma maneira de tornar tudo mais fácil e agradável!

Aos meus pais, Maria Luiza D. Portela e Edegar B. Portella, por sempre me incentivarem, por toda a dedicação, carinho, confiança, ajuda e apoio a mim dedicados durante toda a minha vida. E também ao meu amado irmão, Yago D. Portella. Sem vocês e sua ajuda, nada disso seria possível.

Por fim, agradeço a Deus, por ter sempre me dado escolhas e por me ter permitido escolher a vida que tenho, pois ao meu lado estão as pessoas mais maravilhosas.

“Parfois, nous pensons que ce que nous faisons est que une goutte d'eau dans la mer. Mais, la mer serait plus petit si manquait une goutte.”

RESUMO

O objetivo desta pesquisa foi avaliar o desempenho na remoção de nitrogênio em sistemas de *wetlands* de fluxo vertical para o tratamento de efluente doméstico bruto (Sistema Francês), com o aporte da biologia molecular para a compreensão dos processos. O estudo foi realizado na França ao longo de 16 meses. Dois filtros pilotos com superfície de 2m² cada foram testados e operados com um ciclo de alimentação intermitente (2,5 dias e carga hidráulica aplicada de 0,23 m/d) e um ciclo de repouso (4,5 dias). Uma camada de saturação foi criada no fundo do filtro a fim de propiciar condições para a desnitrificação subsequente à nitrificação. Duas profundidades de saturação foram testadas: 25 cm e 15 cm. O monitoramento incluiu parâmetros físico-químicos (SST, DQO dissolvida, N-NH₄⁺, NTK e N-NO₃⁻), bem como, medições contínuas (Eh, O₂, °C e comportamento hidráulico). As análises estatísticas demonstraram que o melhor desempenho de remoção para os parâmetros analisados ocorreu quando os filtros operaram com 25 cm de saturação (com TDH teórico de 6,66 h). Os resultados de todos os parâmetros avaliados demonstraram variações no desempenho do sistema, além de indicar que melhorias no projeto ou adição de um estágio de tratamento posterior são necessárias para que seja possível a remoção completa do nitrogênio. Levando em consideração que cada filtro piloto representa um único filtro do primeiro estágio do Sistema Francês, as eficiências de remoção (nitrificação de 57% e desnitrificação de 85%) foram consideradas satisfatórias. Em relação à verificação do perfil microbiano, três filtros em escala piloto e quatro estações em escala real foram testados. Para todos os sistemas avaliados não houve diferença estatística em relação aos diferentes pontos de coletas, demonstrando uma boa e homogênea repartição do afluente na superfície dos filtros. Uma maior quantidade (n^o cópias gene/g *pellet*) de bactérias nitrificantes foi observada no período de inverno, o que retrata um efeito temporal, visto que as bactérias nitrificantes possuem crescimento lento. Através do sequenciamento, foi observado para ambos os filtros a presença dos gêneros *Nitrosomonas*, *Nitrosospira* e *Nitrospira*, sendo dominantes as bactérias oxidantes de amônia (AOB). Os filtros pilotos apresentaram diferença significativa (p : 0,001) para a variável estação do ano. Todas as estações em escala real apresentaram resultados semelhantes. Dentre as profundidades testadas, a maior quantidade de AOB foi observada em 30 cm. Esse resultado demonstra que a camada de matéria orgânica depositada na superfície tem papel importante na

estrutura do perfil microbiano. O ciclo de alimentação/repouso avaliado apresentou um aumento quantitativo e qualitativo na comunidade bacteriana nos dias de alimentação e decaimento nos dias de repouso, o que demonstra a dinâmica de crescimento das bactérias. Esse resultado pode indicar que um período de repouso utilizado no Sistema Francês de no máximo sete dias é suficiente para impedir que haja decaimento excessivo da comunidade bacteriana, otimizando, assim, a eficiência do tratamento.

Palavras-chave: Filtros plantados com macrófitas. Efluente doméstico bruto. Sistema Francês. Nitrificação/desnitrificação. Potencial redox. Biologia molecular.

ABSTRACT

This research aims to evaluate the performance on nitrogen removal in vertical flow wetlands systems for the treatment of raw wastewater (French system), with the contribution of molecular biology to understand the processes. This study was performed in France over 16 months. Two pilot systems with 2m² surfaces each, were tested and operated with intermittent feeding cycle (2.5 days and a 0.23 m/d applied hydraulic load) and 4.5 days resting cycle. A saturation layer was created in the in the filter background in order to provide conditions for the denitrification subsequent to nitrification. Two saturations depths were tested: 25 and 15 cm. The monitoring included physico-chemical parameters (TSS, dissolved COD, NH₄⁺ - N, NO₃⁻ - N and TKN), as well as continuous measurements (Eh, O₂, °C and hydraulic behavior). The statistical analysis demonstrated that the best removal performance for the parameters analyzed occurred when the filters operated at 25 cm saturation (with theoretical HRT of 6.66 h). The results of all evaluated parameters showed variations in system performance, they also indicate that improvements in the design or addition of a further processing stage are required so that complete removal of nitrogen is possible. Considering that each pilot filter represents a single filter of the first stage of the French system, the removal efficiencies (57% nitrification and 85% denitrification) were considered satisfactory. Regarding the verification of the microbial profile, three pilot scale filters and four real scale systems were tested. For all evaluated systems, there was no statistical difference in relation to the different collection points, demonstrating a good and homogeneous distribution of the surface of the affluent filters. A larger amount (n^o gene copies/g pellet) of nitrifying bacteria was observed in the winter period, which illustrates a temporal effect, since the nitrifying bacteria have slow growth. Through sequencing, it was observed for both filters the presence of *Nitrosomonas sp*, *Nitrosospira sp* and *Nitrospira sp*, being dominant ammonia oxidizing bacteria (AOB). The pilots systems showed significant differences (p: 0.001) for the variable season of year. All full-scale systems showed similar results. Among the tested depths, the greater amount of AOB was observed in 30 cm. This result shows that the organic matter layer deposited on the surface, plays an important role in microbial profile structure. The evaluated feeding–resting cycles showed a quantitative and qualitative increase in the bacterial community in the feeding days and decay in the resting days, which

demonstrates the growing bacteria dynamic. This result can indicate that a resting period used in the French System of up to seven days, is enough to prevent excessive decay of the bacterial community, thus optimizing the efficiency of the treatment.

Keywords: Constructed wetlands. Domestic raw wastewater. French system. Nitrification/denitrification. Redox potential. Molecular biology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Classificação dos filtros plantados com macrófitas.	47
Figura 2- Esquema representativo de um FPM de fluxo horizontal.	48
Figura 3 – Esquema representativo de um FPM de fluxo vertical.	51
Figura 4 – Esquema do princípio do Sistema Francês.	56
Figura 5 - Esquema da primeira etapa do tratamento Sistema Francês.	57
Figura 6 – Pontos de alimentação.	59
Figura 7 – Inovações de configuração em filtros plantados com macrófitas.	64
Figura 8 – Mecanismos de remoção dos poluentes em um Filtro plantado com macrófitas.	66
Figura 9 - Adaptações da planta às tensões da água residuária em filtros plantados com macrófitas.	68
Figura 10 - Formas dominantes de macrófitas aquáticas.	69
Figura 11– <i>Phragmites australis</i>	71
Figura 12 – Papel mecânico das plantas na camada de lodo depositada.	72
Figura 13 – Rizosfera.	73
Figura 14 – Comunidade bacteriana do solo. Árvore filogenética da vida.	74
Figura 15 – Arranjo e tamanho das partículas em um meio poroso.	78
Figura 16– Materiais recomendados para o Sistema Francês em cada estágio.	81
Figura 17 – Curva granulométrica para validação do material filtrante.	82
Figura 18- Caminhos da decomposição de carbono orgânico e do nitrogênio em FPM em diferentes condições redox.	85
Figura 19– Processos implicados na camada de matéria orgânica depositada.	87
Figura 20- Ciclo clássico do Nitrogênio.	90
Figura 21 - Principais vias de remoção do nitrogênio em filtros plantados com macrófitas.	101
Figura 22- Gradiente redox de elementos pares redox no meio ambiente.	102
Figura 23 – Conjunto das estações de tratamento.	110
Figura 24 – Visão geral dos filtros em escala piloto.	111
Figura 25 – Filtros pilotos nas diferentes condições de oxigenação.	114
Figura 26 – Ponto de alimentação e saída do efluente.	114
Figura 27 – <i>Phragmites communis</i>	115
Figura 28 – Sonda Redox.	118
Figura 29– Instalações das sondas no interior dos filtros.	119
Figura 30 – Representatividade das vazões de entrada e saída de uma batelada.	122
Figura 31– Correlação das análises entre o laboratório de Química e Kits comerciais.	124
Figura 32 – Pontos de amostragem para as análises da comunidade microbiana nos filtros pilotos.	127
Figura 33 – Filtros Plantados com macrófitas em escala real.	129
Figura 34 – Coleta das amostras para análises moleculares.	131

Figura 35 – Representação dos três filtros do 1º estágio do Sistema Francês e dias de coleta.	131
Figura 36 – Padrão dos fragmentos dos grupos de bactérias analisados no estudo.	136
Figura 37 – Concentrações em termos de entrada e saída para os diferentes parâmetros ao longo do tratamento.....	143
Figura 38 – Concentrações em termos de entrada e saída para os diferentes parâmetros ao longo do tratamento.....	144
Figura 39 – Frações de nitrogênio ao longo do experimento.....	145
Figura 40 – Concentrações de DQO dissolvida e SST de entrada e saída (mg.L ⁻¹) e eficiência (%) ao longo do período de operação.	147
Figura 41– Concentrações de N-NH ₄ ⁺ e NTK de entrada e saída (mg.L ⁻¹) e eficiência (%) ao longo do período de operação.....	148
Figura 42 – Comportamento hidráulico das vazões de saída ao longo de uma batelada - período de colmatção.	149
Figura 43 – Comportamento hidráulico das vazões de saída ao longo de uma batelada – período não colmatado.	150
Figura 44 – Evolução das Eh e teor de oxigênio durante o período de colmatção para FPM/P1.....	151
Figura 45 – Evolução do Eh e teor de oxigênio no início da Fase 2.	154
Figura 46– Cargas tratadas de SST, DQO, N-NH ₄ ⁺ e N-NO ₃ ^{-*} . Fase1	159
Figura 47 – Cargas tratadas de SST, DQO, N-NH ₄ ⁺ e N-NO ₃ ^{-*} . Fase 2.....	160
Figura 48 – Regime experimental da retirada do biofilme	163
Figura 49 – Quantificação das bactérias nitrificantes e totais para os filtros pilotos FPM/P1 e FPM/P2.	166
Figura 50 – Gel da DGGE dos filtros FPM/P1 e FPM/P2.	170
Figura 51 – Quantificação das bactérias nitrificantes e totais para o filtro piloto FPM/P3.....	172
Figura 52 – Gel da DGGE do filtro piloto FPM/P3.....	173
Figura 53 – Médias do nº de cópias do gene/g de pellet de bactérias AOB e bactérias totais nas estações E1 e E2.	177
Figura 54 – Médias do nº de cópias do gene/g de <i>pellet</i> de bactérias AOB e Totais na estação E3.	179
Figura 55 – Distribuição temporal e espacial do nº de cópias do gene/g de <i>pellet</i> de bactérias AOB.....	180
Figura 56 – Médias do nº de cópias do gene/g de <i>pellet</i> de bactérias AOB e bactérias totais na estação E4	183
Figura 57– Distribuição temporal e espacial do nº de cópias do gene/g de pellet de bactérias AOB.....	184
Figura 58 – Perfil de bandas dos fragmentos amplificados pela técnica de DGGE – FPM/P1 e FPM/P2.....	185
Figura 59 – Análise estatística NMDS do gel da DGGE dos filtros pilotos FPM/P1 e FPM/P2.....	187
Figura 60 – Dendograma de similaridade para os filtros pilotos – FPM/P1 e FPM/P2.....	191

Figura 61 – Dendograma de similaridade para ambos os filtros pilotos – FPM/P1 e FPM/P2.....	192
Figura 62– Perfil de bandas dos fragmentos amplificados pela técnica de DGGE – FPM/P3.....	193
Figura 63– Dendograma de similaridade do filtro piloto FPM/P3.....	195
Figura 64 – Análise estatística NMDS do gel da DGGE para o FPM/P3.	196
Figura 65 – Perfil de bandas dos fragmentos amplificados pela técnica de DGGE para as estações E1 e E2.	198
Figura 66– Dendograma de similaridade dos filtros em escala real – E1 e E2.	201
Figura 67 – Análise estatística NMDS do gel da DGGE para as estações E1 e E2.....	202
Figura 68 – Perfil de bandas dos fragmentos amplificados pela técnica de DGGE para a estação E3.	205
Figura 69 – Dendograma de similaridade entre diferentes impressões moleculares para a estação E3.	208
Figura 70– Dendograma de similaridade entre diferentes impressões moleculares para a estação E3.	210
Figura 71 – Análise estatística NMDS do gel da DGGE para a estação E3.....	211
Figura 72– Perfil bandas dos fragmentos amplificados pela técnica de DGGE utilizando DNA genômico para a estação E4.	213
Figura 73– Dendograma de similaridade entre diferentes impressões moleculares para a estação E4.	216
Figura 74 – Análise estatística NMDS do gel da DGGE para a estação E4.....	217
Figura 75 - Esquema explicativo do protocolo de retirada do biofilme	247
Figura 76 – Reação em cadeia de polimerase - PCR	248
Figura 77 – Eletroforese em gel de gradiente desnaturante - DGGE	249
Figura 78 – PCR em tempo real - qPCR.....	250
Figura 79 – Fluxograma das análises moleculares.....	251

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Características utilizadas para classificar os filtros plantados com macrófitas (FPM).....	44
Tabela 2 - Benefícios e limitações dos filtros plantados com macrófitas	45
Tabela 3 – Perfil granulométrico dos materiais utilizados em cada estágio e camada do Sistema Francês	57
Tabela 4 – Concentrações de saída e eficiência de remoção global para os dois estágios do Sistema Francês.	62
Tabela 5 – Concentrações de saída e eficiência de remoção para o 1º estágio de tratamento do Sistema Francês	62
Tabela 6 – Concentrações de saída e eficiência de remoção para o 2º estágio com carga hidráulica de CH< 0,6 m/d.	63
Tabela 7 - Principais mecanismos atuantes na remoção de poluentes em FPM.66	
Tabela 8 – Algumas das espécies vegetais utilizadas em clima tropical para filtros de fluxo horizontal e vertical.	70
Tabela 9 – Enzimas que participam do processo da desnitrificação e sua localização	96
Tabela 10 - Alguns gêneros microbianos que efetuam o processo da desnitrificação.....	98
Tabela 11 - Reações microbianas de oxidação-redução.....	103
Tabela 12 – Dimensionamento dos pilotos	112
Tabela 13 – Material filtrante e suas características	112
Tabela 14– Valores de programação e características de projeto dos pilotos. .	120
Tabela 15 – Informações sobre as legendas/códigos dos pontos amostrais utilizados para coleta e exposição dos dados.	127
Tabela 16 – Informações sobre as legendas/códigos dos pontos amostrais utilizados para coleta e exposição dos dados.	132
Tabela 17 – Sequência e características dos iniciadores utilizados para a PCR.	134
Tabela 18 – Composição do Mix para o grupo de Bactérias Nitrificantes.....	135
Tabela 19 – Condições de amplificação para as bactérias nitrificantes	135
Tabela 20 – Sequência e características dos iniciadores utilizados para a qPCR	138
Tabela 21 - Mix da qPCR para o grupo de bactérias totais e nitrificantes	138
Tabela 22 - Condições da amplificação para os grupos analisados pela qPCR	139
Tabela 23 – Características de entrada dos pilotos FPM/P1 e FPM/P2 durante as diferentes fases de saturação.	142
Tabela 24– Eficiência de remoção de massa (%) durante o tratamento e sob as diferentes condições de saturação do FPM/P2, expressos em média $\pm \Sigma$ (N). Os valores do período de colmatção foram excluídos.	156
Tabela 25 – Resultados das análises estatísticas em relação ao efeito da sazonalidade nos parâmetros avaliados por ambos os filtros na Fase 1.	162

Tabela 26 – Resultados NCBI-BLAST para as sequências retiradas das bandas do gel de DGGE dos filtros FPM/P1 e FPM/P2.	188
Tabela 27– Resultados da pesquisa NCBI-BLAST para as sequências retiradas das bandas do gel de DGGE do filtro FPM/P3.	194
Tabela 28– Resultados da pesquisa NCBI-BLAST para as sequências retiradas das bandas do gel de DGGE dos filtros em escala real das estações E1 e E2..	199
Tabela 29 – Resultados da pesquisa NCBI-BLAST para as sequências retiradas das bandas do gel de DGGE dos três filtros do primeiro estágio em escala real da estação E3.	206
Tabela 30 – Resultados da pesquisa NCBI-BLAST para as sequências retiradas das bandas do gel de DGGE dos três filtros do primeiro estágio em escala real da estação E4.	214

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 – Dimensionamento filtro fluxo horizontal pelo modelo KC*	50
Equação 2 – Dimensionamento filtro vertical pelo balanço de oxigênio	52
Equação 3 - coeficiente de uniformidade (CU).....	77
Equação 4 – Porosidade de um material filtrante (n em %).....	79
Equação 5 - Índices dos espaços vazios (ϵ).....	79
Equação 6 – Oxidação da amônia	92
Equação 7 – Oxidação do amônio	92
Equação 8 – Oxidação do nitrito.....	93
Equação 9 - Reação global da nitrificação	93
Equação 10 – 1ª etapa da nitrificação	93
Equação 11 – 2ª etapa da nitrificação	93
Equação 12 - Oxidação total da amônia e síntese da biomassa celular	94
Equação 13 - Processo bioquímico da desnitrificação	97
Equação 14 - Estequiometria da reação da desnitrificação	97
Equação 15 - Estequiometria da reação da desnitrificação	97
Equação 16 – Concentrações para NTK	145

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- Ae - Condição aeróbia
amoA - Amônia mono-oxigenase
An - Condição anaeróbia
ANAMMOX - Bactérias anaeróbias oxidantes de amônia
AOA - Archaea oxidante de amônia (*ammonia-oxidizing archaea*)
ATP - Adenosina-Trifosfato
ATTENTIVE - *Assainissement des eaux usées adapté au contexte Tropical par Traitement Extensifs utilisant des végétaux*
C/N - Relação carbono/nitrogênio
CANON - Processo ANAMMOX com aeração intermitente
CO₂ - Gás carbônico
CONAMA - Conselho Nacional de Meio Ambiente
COT - Carbono Orgânico Total
Ct - Fase exponencial - Cycle Threshold
CU - Coeficiente de uniformidade
d - Dia
D1 - Distância de 15 cm e 1 m do ponto de alimentação
D2 - Distância de 30 cm e 2 m do ponto de alimentação
D3 - Distância de 45 cm do ponto de alimentação
D4 - Distância de 15 cm do ponto de alimentação
D5 - Distância de 30 cm do ponto de alimentação
D6 - Distância de 45 cm do ponto de alimentação
DBO - Demanda bioquímica de oxigênio
DQO - Demanda Química de Oxigênio dissolvido
DGGE - Eletroforese em gel de gradiente desnaturante
DIAMOX - Oxidação desnitrificante do amônio
DNA - Ácido Desoxirribonucléico
dNTP - Bases nitrogenadas
DOM - Territórios ultra-marítimos franceses de clima tropical
E1 - Estação em escala real 1
E2 - Estação em escala real 2
E3 - Estação em escala real 3
E4 - Estação em escala real 4
Eh - Potencial Redox
EH - Equivalente habitacional
EPNAC - *Evaluation des Procédés Nouveaux d'Assainissement des petites et moyennes Collectivités*
ETE - Estações de tratamento de esgotos

FP - Filtro plantado com macrófitas
FP1_i - Filtro plantado com macrófita – piloto 1 - inverno
FP1_v - Filtro plantado com macrófita – piloto 1 – verão
FP2_i - Filtro plantado com macrófita – piloto 2 – inverno
FP2_v - Filtro plantado com macrófita – piloto 2 – verão
FPM - Filtros plantados com macrófitas
FPM/P1 - Filtro plantado com macrófita – piloto 1
FPM/P2 - Filtro plantado com macrófita – piloto 2
FPM/P3 - Filtro plantado com macrófita – piloto 3
G. C. A. T - Bases nitrogenadas
GESAD - Grupo de Estudos em Saneamento Descentralizado
Gama-AOB – Gammaproteobacteria
HAO - Oxidoreductase de hidroxilamina
i – Inverno
K-C* - Modelo cinético
LABEFLU - Laboratório de Efluentes Líquidos e Gasosos
LIMA - Laboratório Integrado do Meio Ambiente
Log - Exponencial logaritmo
M.O - Matéria orgânica
m² - Metro ao quadrado
m³ - Metro cúbico
mM – Milimolar
mV – Milivolts
NaCl - Cloreto de sódio
NMDS - Escalonamento Multidimensional Não Métrico
N-NH₄⁺ - Amônio
N-NO₃⁻ - Nitrato
NOB - Bactéria oxidante de nitrito (*nitrite-oxidizing bactéria*)
Norg - Nitrogênio orgânico
NTK - Nitrogênio Total *Kjeldahl*
Nar - Nitrato redutase
Nir - Nitrito redutase
Nor - Óxido nítrico redutase
Nos - Óxido nitroso redutase
O₂ – Oxigênio
°C – Temperatura
OD - Oxigênio Dissolvido
P – Fósforo
Pb - Pares de base
PBS - Tampão fosfato salino
PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

pH - Potencial hidrogeniônico
PE - Polietileno de alta densidade
RNAm - Ácido Ribonucléico Mensageiro
RNAr - Ácido Ribonucléico Ribossômico
rpm - Rotação por minuto
SD - Desvio padrão
SHARON - Processo de reator único de alta atividade de remoção do amônio com o nitrito
SST - Sólidos Suspensos Totais
SEM - Erro padrão da média
SHE - Eletrodo padrão de hidrogênio
SINT - Sociedade de Engenharia e Tecnologia
TAE - Solução tampão
TDR - Sonda *Time Domain Reflectometry*
TDH - Tempo de detenção hidráulica
TEMED - Tetrametiletilenodiamina
TOR - Princípio do Tudo-ou-nada
UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina
v - Verão
V3 - Região do gene 16S
Vt - Volume total de uma amostra do material
Vv - Volume de vazios
 ΔG° - Entalpia

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	31
1.1 OBJETIVOS.....	36
1.1.1 Objetivo Geral	36
1.1.2 Objetivos Específicos	37
1.2 HIPÓTESES DA PESQUISA.....	37
1.3 JUSTIFICATIVAS.....	38
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	43
2.1 FILTROS PLANTADOS COM MACRÓFITAS (WETLANDS CONSTRUÍDOS)	43
2.1.1 Aspectos Gerais	43
2.1.2 Classificação dos FPM	47
2.1.2.1 Filtros plantados com macrófitas de fluxo horizontal	48
2.1.2.2 Filtros plantados com macrófitas de fluxo vertical	50
2.1.2.3 Sistema Híbrido.....	53
2.1.2.4 Sistema Francês.....	54
2.1.3 Novas configurações em filtros plantados com macrófitas	64
2.1.4 Componentes e funcionamento dos Filtros plantados com macrófitas	65
2.1.4.1 Elementos atuantes	67
2.1.4.2 Remoção dos poluentes	83
2.1.4.3 Nitrogênio	88
2.2 POTENCIAL REDOX	101
2.3 BIOLOGIA MOLECULAR	104
3. MATERIAIS E MÉTODOS	109
3.1 ESTUDO EM ESCALA PILOTO	109
3.1.1 Descrição do sistema de tratamento	109
3.1.1.1 Localização.....	109
3.1.2 Concepção e Dimensionamento	109
3.1.2.1 Material filtrante.....	112
3.1.2.2 Condições de oxigenação	113
3.1.3 Parâmetros operacionais	115
3.1.4 Protocolo experimental	120
3.1.4.1 Regime de alimentação	120
3.1.4.2 Amostragem	121
3.1.5 Análises físico-químicas	122
3.1.6 Análise estatística dos dados	124
3.2 IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA ATRAVÉS DO USO DE TÉCNICAS MOLECULARES	125

3.2.1 Procedimentos para análises dos filtros em escala piloto	125
3.2.2 Procedimentos para análises dos filtros em escala real	128
3.2.3 Análises Moleculares.....	132
3.2.3.1 Métodos de preparação para as amostras: obtenção do biofilme para análise.....	133
3.2.3.2 PCR - Reação em cadeia da polimerase.....	133
3.2.3.3 Eletroforese em gel de gradiente desnaturante – DGGE.....	136
3.2.3.4 qPCR (Reação em cadeia de polimerase em tempo real).....	138
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	141
4.1 RESULTADOS FÍSICO-QUÍMICOS DOS FPM EM ESCALA PILOTO.....	141
4.1.1 Características gerais da água	141
4.1.2 Propriedades de funcionamento do filtro.....	149
4.1.2.1 Hidráulica.....	149
4.1.2.2 Oxigênio e Potencial redox (Eh).....	151
4.1.3 Eficiências de remoção.....	155
4.1.4 Fatores que afetam a eficiência de remoção	160
4.1.4.1 Período de alimentação	160
4.1.4.2 Temperatura e estação do ano	161
4.2 ANÁLISES DA COMUNIDADE MICROBIANA POR TÉCNICAS MOLECULARES	162
4.2.1 Protocolo do desprendimento do biofilme	162
4.2.2 Quantificação da comunidade microbiana por PCR em tempo real – qPCR	164
4.2.2.1 qPCR – Filtros em escala piloto.....	164
4.2.2.2 qPCR – Filtros em escala real	175
4.2.3 Diversidade da comunidade bacteriana - AOB - baseada na PCR – DGGE – sequenciamento	184
4.2.3.1 Diversidade da comunidade bacteriana dos filtros em escala piloto	185
4.2.3.2 Diversidade da comunidade bacteriana dos filtros em escala real	197
5. CONCLUSÕES.....	219
6. RECOMENDAÇÕES	223
REFERÊNCIAS	225
APÊNDICES	245

1. INTRODUÇÃO

A Organização Mundial de Saúde estima em 1,1 bilhão o número de pessoas no mundo que não têm acesso a fontes de abastecimento de água. No mesmo contexto, 2,5 bilhões de pessoas não tem acesso ao saneamento pelo que, aproximadamente 35% da população mundial despeja-os de forma inadequada nos cursos d'água (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2012), resultando em vários problemas, tanto ambientais como de saúde pública.

Anualmente, a morte de 2 milhões de pessoas é enquadrada em problemas de saúde pública, devido as doenças vinculadas à ausência de saneamento, sendo a maioria crianças originárias de países em desenvolvimento, moradores de regiões periféricas e zonas rurais (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2012). No que diz respeito ao meio ambiente, a ausência de saneamento associada ao aumento demográfico, à intensificação das atividades econômicas e ao descumprimento da legislação vigente, geram problemas nos corpos hídricos (por exemplo, alteração da sua qualidade). As águas superficiais e os lençóis freáticos estão sendo poluídos, sobretudo pelo lançamento direto ou indireto de despejos industriais, domésticos e agropecuários não tratados ou tratados de forma ineficiente. Tal ação provoca o aumento da contaminação por organismos patogênicos e nutrientes, tais como fósforo e nitrogênio.

O aumento da concentração desses nutrientes em recursos hídricos promove o fenômeno da eutrofização, isto é, a transformação de um meio aquático oligotrófico (baixa concentração de nutrientes) em meio eutrófico (alta concentração de nutrientes), sendo o mesmo, caracterizado pelo crescimento excessivo de algas que causam inúmeros efeitos adversos, tais como a decomposição da matéria orgânica presente no meio, o que provoca a diminuição do oxigênio dissolvido (ocasionando a mortandade de peixes e de outros organismos) e a liberação de toxinas.

O nitrogênio é o elemento de estudo desta tese. Sendo um constituinte natural de proteínas, clorofila e vários outros compostos biológicos, a sua presença é comum em efluentes domésticos e a determinação da sua concentração exibe-se como parâmetro fundamental para a caracterização de efluentes brutos e tratados.

Atualmente, o aumento da concentração de nitrogênio em esgotos, sem tratamento, apresenta-se como um sério problema ambiental. O despejo em excesso em corpos hídricos e os problemas

decorrentes da liberação dos esgotos demonstram a necessidade de implementação de um sistema integrado de proteção ambiental baseado na redução das descargas e na aplicação de sistemas de tratamento que possam removê-lo de forma satisfatória (MALTAIS-LANDRY *et al.*, 2009).

Todavia, observa-se ainda a remoção insuficiente de nitrogênio nas estações de tratamento de esgoto, tanto em sistemas coletivos/convencionais (nível primário e secundário) como em sistemas individuais (nível terciário), pelo que, vários estudos vêm sendo conduzidos a fim de melhorar a transformação/remoção deste nutriente. No entanto, as várias formas deste elemento – orgânica e inorgânica (íons de amônio) – originárias de diferentes fontes, de diferentes níveis de tratamento, e com concentrações bastante variadas, entre outros fatores, acabam por influenciar na sua remoção (FAULWETTER *et al.*, 2009).

Introduzida a problemática da falta de saneamento e da remoção insuficiente do nitrogênio, fica evidente a necessidade de avanços na pesquisa em relação a esses problemas. Dos estudos disponibilizados na literatura e que vêm sendo realizados pela comunidade científica e acadêmica, uma grande ênfase está sendo dada aos sistemas descentralizados/individuais, mais compactos, com menor custo de operação e com satisfatórios índices de remoção. Tais sistemas, por apresentarem essas características tornam-se uma boa alternativa de aplicação em locais sem saneamento, além de outros como unidades residenciais unifamiliares e pequenas coletividades, urbanas e rurais, as quais, por vezes, não possuem uma tecnologia adequada que as condições locais exigem (PHILIPPI *et al.*, 2007).

Nesse contexto, a utilização do sistema de tratamento descentralizado do tipo filtros plantados com macrófitas (FPM) também denominados de *Wetlands* construídos, mostra-se como uma alternativa viável para os locais supracitados, devido às características adicionais que esse tipo de sistema apresenta: capacidade tampão, adsorção física dos poluentes na superfície do solo, degradação da matéria orgânica por micro-organismos, assimilação dos nutrientes pelas plantas, baixo custo de implantação e operação, dentre outros.

Os primeiros estudos realizados com FPM foram desenvolvidos por Seidel (1966), os quais inspiraram Kickuth (1977) a desenvolver o conceito de “*Root Zone Method*”. Esse sistema, composto por um filtro de fluxo horizontal plantado com macrófitas possuía no meio filtrante um material de suporte que favorecia o desenvolvimento dos vegetais e criava condições favoráveis para a atividade biológica, devido ao

desenvolvimento das raízes e da comunidade microbiana ali instalada, os quais em conjunto promoviam o tratamento depuratório dos poluentes.

Posteriormente, Brix (1993) desenvolveu uma classificação para os FPM a partir do tipo de macrófita utilizada (sistema com plantas flutuantes, enraizadas e submersas e, enraizadas e emergentes) e que se distinguem conforme o regime hidráulico aplicado: fluxo superficial (filtro saturado com lâmina d'água em sua superfície), fluxo horizontal sub-superficial (efluente drenado horizontalmente pelo filtro e sem lâmina d'água em sua superfície) e fluxo vertical sub-superficial (efluente drenado verticalmente e sem lâmina d'água em sua superfície).

Além das classificações citadas, foi desenvolvido por Alan Liénard e sua equipe, no Instituto Nacional de Pesquisa em Ciências e Tecnologias para o Meio ambiente e Agricultura na França (IRSTEA), um sistema de fluxo vertical com algumas características próprias, o que resultou por sua vez, em uma nova configuração chamada de *French vertical flow constructed wetlands* - Sistema Francês (LIÉNARD, 1987).

Este sistema possui características importantes para o tratamento de efluentes domésticos e é aplicado com sucesso há alguns anos na França para tratar efluentes de pequenas comunidades rurais (atualmente mais de 3.500 estações estão em operação para o tratamento de águas residuais domésticas, de até 4.500 EH – equivalente habitante), com importantes taxas de remoção de materiais em suspensão, do carbono e grande potencial na remoção do nitrogênio. Ademais, além do aspecto ecológico e baixa relação área por pessoa ($2 \text{ m}^2 \cdot \text{EH}^{-1}$), a popularidade do design francês vem do fato do primeiro estágio de filtro ser alimentado por efluente bruto, dispensando dessa forma um pré-tratamento. Ainda hoje, este sistema mostra-se como um eficiente método de tratamento do efluente em conjunto com o lodo, o qual é depositado na superfície (cerca de $2,5 \text{ cm} \cdot \text{ano}^{-1}$), e que, de acordo com a pesquisa feita por Molle (2014), parece ter um papel importante no desempenho do filtro.

Contudo, certas lacunas ainda existem, especificamente nos processos da desnitrificação e desfosfatação, os quais permanecem em estudo e que devem ser abordados ou definidos (MOLLE, 2003). Além disso, o sistema descrito demanda, ainda, um estágio posterior para conseguir atingir a remoção total através da desnitrificação. Isso gera, portanto, a necessidade de haver duas etapas de tratamento separadas, que exigem diferentes condições de oxigenação, aeróbias e anóxicas, respectivamente, o que, por consequência, exige uma área

razoavelmente grande para a sua implantação (uma das desvantagens do sistema).

Com o intuito de otimizar o processo no tratamento do nitrogênio e diminuir a área requerida, várias inovações e modificações na configuração dos FPM vêm sendo testadas nos últimos anos, tais como: sistema vertical de fluxo ascendente e descendente com recirculação [*Circular-flow corridor* (sistema composto por 3 estágios sendo a primeira e a terceira formadas por filtros horizontais retangulares de fluxo sub-superficial, e a segunda por um sistema circular de fluxo vertical - *Towery hybrid*)], sistema horizontal sub-superficial com defletores verticais onde o efluente flui para cima e para baixo (*Baffled subsurface-flow*); combinação de FPM com células de combustível microbiana (*Microbial fuel cell*), dentre outras (WU *et al.*, 2014).

Na França, embora a maioria dos filtros utilizados possuam a concepção clássica francesa (dois estágios de fluxo vertical), cujas diretrizes e performances são bem conhecidas (MOLLE *et al.*, 2005), as inovações vêm ganhando espaço nos últimos tempos, sendo desenvolvidas por empresas privadas e públicas. Essas inovações referem-se principalmente à redução da área requerida, dos custos operacionais e da melhoria no desempenho, podendo-se destacar as seguintes: sistema de um estágio de fluxo vertical com recirculação, sistema de dois estágios de fluxo vertical um acima do outro e, sistema de um estágio de fluxo vertical com saturação no fundo do filtro (MOLLE, 2014).

A modificação no Sistema Francês para um estágio de fluxo vertical com saturação no fundo do filtro foi desenvolvido na presente pesquisa, com o intuito de avaliar o desempenho desta nova configuração em relação ao comportamento do filtro, com foco no comportamento e remoção do nitrogênio. A geração das duas zonas de oxigenação – aeróbia e anóxica (esta provocada pelo fundo saturado), no mesmo filtro, teve como objetivos promover a nitrificação e a desnitrificação em um único estágio (com eficientes taxas de remoção), diminuir a área para implantação e reduzir os custos operacionais.

Atualmente, em países de clima tropical, por meio de diversos grupos de pesquisa, vem sendo estudada a aplicação deste sistema. No entanto, tal como afirmam alguns autores, o fato de ainda não serem amplamente utilizados, observam-se lacunas em pontos específicos, tais como, os critérios de dimensionamento para as condições climáticas e econômicas particulares desses países (KANTAWANICHKUL *et al.*, 2009). Esses autores também ressaltam que o clima e as condições

locais afetam fortemente os processos de remoção do nitrogênio em sistemas de FPM, reforçando, assim, a necessidade de experimentos nessas condições para que alguns aspectos do tratamento sejam esclarecidos.

No que se refere ao Brasil, como citam Oliveira e Von Sperling (2011), por ser um país de grande extensão geográfica, apresenta grandes diferenças em termos de clima, de economia, contrastes culturais e sociais. Em relação a sistemas de tratamento de efluente, embora haja a utilização de sistemas bastante sofisticados, são aplicados na sua maioria sistemas naturais e não mecanizados, os quais se beneficiam das temperaturas elevadas na maior parte do país. Segundo os mesmos autores, a temperatura desempenha um papel decisivo em alguns processos de tratamento, o que por sua vez, contribui para a diminuição de área requerida para instalação e no aumento da eficiência de remoção.

Além do avanço em novas pesquisas para remoção do nitrogênio e sua aplicação em países de clima tropical, o estudo dos processos microbiológicos que promovem a sua remoção vem ganhando espaço na engenharia. Por muito tempo o estudo das estações foi limitado em análises físico-químicas de entrada e saída de uma instalação, tendo a parte biológica ainda obscura, onde justamente se encontram as reações mal compreendidas realizadas por micro-organismos não identificados.

Avanços em técnicas qualitativas e quantitativas afirmam a presença de espécies microbianas específicas ou grupos funcionais que influenciam na remoção de poluentes. E, embora tenha ocorrido um aumento do uso dessas técnicas nos últimos anos, o que se sabe sobre a atividade microbiana em FPM baseia-se em suposições e/ou dados circunstanciais (FAULWETTER *et al.*, 2009).

Portanto, a utilização de um conjunto de técnicas da biologia molecular tornou-se essencial para o estudo de processos biológicos, por vezes complexos, envolvidos no tratamento de águas residuárias aportando importantes informações para a compreensão e determinação da composição e dinâmica das comunidades microbianas, bem como identificação ao nível de gênero ou espécie dos micro-organismos envolvidos nos processos que ocorrem em uma estação de tratamento.

Neste contexto, o IRSTEA, em conjunto com o grupo de trabalho *Evaluation des Procédés Nouveaux d'Assainissement des petites et moyennes Collectivités* (EPNAC) e em parceria com algumas entidades interessadas no saneamento na França: *Service d'Assistance*

Technique aux exploitants de Stations d'Épuration, Agences de l'Eau; Services de police de l'eau; Ministères de l'Environnement et de la Santé, Office International de l'eau et Office national de l'eau et des lieux aquatiques desenvolveu um projeto de pesquisa com o objetivo de melhorar a eficiência das estações de tratamento de esgoto de pequenas e médias comunidades da região denominada por DOM (territórios ultra-marítimos franceses de clima tropical).

Esse projeto, chamado de *Assainissement des eaux usées adapté au contexte Tropical par Traitement Extensifs utilisant des végétaux* (ATTENTIVE) tem por objetivo validar o dimensionamento dos filtros plantados com macrófitas otimizando a remoção de poluentes no contexto tropical face às condições climáticas e aos problemas econômicos e de saneamento que essas comunidades apresentam. Assim, esta tese enquadra-se no projeto ATTENTIVE, que se desenvolve através de várias pesquisas, em que ocorre o monitoramento de filtros-piloto e em escala real em diferentes locais, tanto na França, como na região DOM.

Esta pesquisa foi realizada por meio de uma parceria entre o IRSTEA e o Laboratório de Efluentes Líquidos e Gasosos (LABEFLU) vinculado ao Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), o qual vem desenvolvendo inúmeros trabalhos relacionados com a problemática de efluentes domésticos e industriais. Além do apoio do projeto: Tecnologias Sociais para a Gestão da Água (TSGA) – programa que visa o uso sustentável da água através do apoio à capacidade de gestão local em bacias hidrográficas de Santa Catarina – SC.

Além do LABEFLU, o Grupo de Estudos em Saneamento Descentralizado (GESAD/ENS/UFSC) desenvolve inúmeras pesquisas ao longo de uma década com a utilização de filtros plantados com macrófitas para o tratamento de águas residuárias.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial de remoção de nitrificação e desnitrificação no sistema de filtros plantados com macrófitas de fluxo vertical (Sistema Francês) com fundo saturado para o tratamento de esgoto sanitário bruto.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o desempenho dos filtros na remoção do nitrogênio;
- Investigar a influência das diferentes alturas de saturação testadas sobre o desempenho do sistema;
- Analisar os efeitos de temperatura e do potencial redox no meio filtrante na remoção do nitrogênio;
- Estudar as interações biológicas e bioquímicas dos filtros por meio da realização de análises físico-químicas e da diversidade microbiana;
- Caracterizar a comunidade microbiana nitrificante, utilizando técnicas quantitativas e qualitativas da biologia molecular – qPCR, e PCR-DGGE.

1.2 HIPÓTESES DA PESQUISA

A presente pesquisa foi conduzida sob as seguintes hipóteses e questões subsequentes:

1ª – A modificação e adaptação do sistema FPM (Sistema Francês) melhora o desempenho do tratamento de efluentes domésticos.

- a) A aplicação de um fundo saturado (anóxico) no Sistema Francês de fluxo vertical para o tratamento de esgoto doméstico bruto melhora o tratamento de materiais em suspensão (sedimentação), da matéria carbonácea (consumo de carbono pela desnitrificação) e do nitrogênio total (desnitrificação) permitindo operar com um único estágio de tratamento?
- b) Qual a altura de saturação, dentre as testadas, para que um único estágio possa realizar o processo nitrificação/desnitrificação de forma satisfatória?

2ª – A medição do potencial redox (Eh) promove um melhor entendimento das condições, por vezes complexas, que ocorrem nos meios filtrantes.

- a) O acompanhamento do Eh em diferentes profundidades no meio filtrante ajuda na visualização do perfil e na compreensão dos processos de metabolismos bacterianos e nas condições de oxigenação, contribuindo para uma tomada

rápida de decisão em relação às condições oxirredução do meio?

3ª – A remoção de um poluente está associada a um grupo funcional microbiano específico. Portanto, a compreensão dos mecanismos biológicos através da identificação da biota microbiana presente nas diferentes camadas filtrantes do FPM contribui para a melhoria no sistema de tratamento dos processos de nitrificação/desnitrificação.

- a) Quais e quantos são micro-organismos nitrificantes envolvidos no processo da nitrificação que ocorrem no meio filtrante?
- b) Como a variação temporal e espacial da comunidade microbiana interfere na eficiência do tratamento?

1.3 JUSTIFICATIVAS

A legislação brasileira indica que todos os cidadãos têm direito a um meio ambiente equilibrado, característica essa, essencial à qualidade de vida. Para isso, o Poder Público instituiu instrumentos legais — através de Resoluções — que dispõem sobre as condições necessárias para a emissão de efluentes em corpos hídricos.

O Brasil possui o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) órgão responsável que estabelece padrões de qualidade das águas naturais através da Resolução nº 350 de 2004 complementada pela 430 de 2011, a qual contempla padrões máximos de lançamento de efluentes, classificação dos corpos d'água, formas adequadas de tratamento e disposição final, e sanções estabelecidas de acordo com impacto ambiental gerado pelo efluente lançado. Porém, ainda há muito que se fazer no sentido de se colocar tais instrumentos efetivamente em prática. Em Santa Catarina, o Código Estadual de Meio Ambiente, através da Lei nº 14.675 de 13 de abril de 2009, Artigo 177, lista uma série de condições previstas nas normas federais dos parâmetros físico-químicos, além de outros parâmetros, as quais controlam o lançamento de efluentes em corpos de água interiores, lagunas, estuário e na beira-mar.

Além do Brasil, outros países desenvolvem pesquisas com o objetivo de buscar sistemas mais eficazes na remoção de poluentes nitrogenados e fosfatados, que apresentem simultaneamente custo-benefício de aplicação, buscando atingir principalmente as áreas onde há precariedade em relação ao saneamento e atender as legislações que

objetivam padronizar o lançamento dos efluentes nos corpos hídricos receptores.

O esgoto doméstico é um potencial poluidor devido à sua composição, rica em nutrientes nitrogenados e fosfatados, os quais são liberados no meio ambiente devido à precariedade do saneamento. Além dos nutrientes, o esgoto doméstico possui também uma fração de sólidos orgânicos e inorgânicos, suspensos e dissolvidos, bem como micro-organismos, muitas vezes patogênicos. No entanto, apesar da fração corresponder a apenas 0,1% da sua composição, é justamente devido aos seus componentes que o esgoto deve ser tratado (VON SPERLING, 1996).

A eutrofização representa um dos mais sérios problemas em relação à poluição das águas acrescido dos problemas de saúde pública que podem surgir pela liberação inadequada nos corpos hídricos, logo, o tratamento de esgotos é de suma importância.

Diante disso, faz-se necessário optar pela utilização de sistemas de tratamento eficientes, com baixo custo de implantação e operação, potencializando a sua aplicação tanto pelo setor público como privado.

Dos sistemas que podem atender os requisitos, os filtros plantados com macrófitas enquadram-se como uma boa alternativa devido às vantagens que apresenta, tais como: baixo consumo de energia, tecnologia acessível, boa tolerância às variações de carga, baixa produção de lodo, minimização de odores, boa aceitação pela população devido à sua integração à paisagem local e, sobretudo, o baixo custo de implantação e operação quando comparado a outros sistemas de tratamento.

Na França, entre os processos de tratamento de esgotos para pequenas comunidades, os FPM (Sistema Francês) desde o final da década de 90 representam 11% entre os sistemas utilizados (GOLLA *et al.*, 2010), e praticamente domina o tratamento de efluentes domésticos em pequenas comunidades, sendo alvo de estudo e aplicação em vários outros países, assim como no Brasil, e em outros países de clima tropical, devido às suas características e a sua eficiência no tratamento. Ainda que esse tipo de sistema possua estas vantagens, as inovações têm adquirido espaço nos últimos anos, com o objetivo de melhorar o desempenho, diminuir a área requerida para a sua implantação e, por consequência, os custos operacionais tornando este tipo de tratamento ainda mais atrativo.

Ademais, sabe-se que o uso integrado de ferramentas que auxiliam a compreensão dos processos que ocorrem, é uma estratégia

eficiente para a melhoria do processo de tratamento. Um parâmetro importante a ser agregado aos estudos com FPM, principalmente nas novas configurações, é o potencial redox (Eh).

As configurações dos diversos sistemas promovem diferentes condições redox, que podem variar com o tempo de tratamento e/ou espacialmente no meio filtrante, permitindo a formação de nichos ecológicos favoráveis ao desenvolvimento de biofilmes microbianos com funções diferentes no processo de oxigenação e capacidade de remoção dos poluentes (WIESSNER *et al.*, 2005; VYMAZAL, 2007). Com base nisso, pode-se afirmar que as pesquisas de potencial redox mostram a influência deste parâmetro no desenvolvimento bacteriano permitindo, assim, um melhor entendimento dos processos que ocorrem, gerando, por sua vez respostas sobre o desempenho do tratamento. O conhecimento da comunidade bacteriana presente nos filtros mostra-se, também, de extrema importância, uma vez que tal comunidade é responsável pela remoção dos nutrientes presentes no efluente.

No meio filtrante de um FPM ocorre a formação de um biofilme composto por uma grande diversidade taxonômica de bactérias que realizam o processo de remoção dos nutrientes. Em relação ao nitrogênio, a sua remoção biológica ocorre geralmente pela combinação dos processos de nitrificação autotrófica e desnitrificação heterotrófica, sendo uma etapa limitante da velocidade global do processo de tratamento biológico, devido à baixa taxa de crescimento dos organismos envolvidos (METCALF e EDDY, 2003). As bactérias que removem o nitrogênio designam-se por nitrificantes quimiolitotautotróficas especializadas, através da combinação dos processos de nitrificação/desnitrificação. Conseqüentemente, o estudo das bactérias responsáveis pela remoção do nitrogênio é de extrema relevância devido a sua importância no tratamento biológico em ETE.

O estudo de comunidades microbianas está, atualmente, sendo realizado através de técnicas avançadas do campo da biologia molecular, as quais vêm dominando nos últimos anos devido as suas vantagens em relação às técnicas mais tradicionais de cultivo.

Para a caracterização da capacidade de um sistema tratar um tipo de poluente, o microbiologista deve responder a várias questões, dentre elas: quem, quantos e como? No entanto, métodos microbiológicos tradicionais, ditos pasteurianos, não respondem completamente essas questões. Esses métodos são limitados exclusivamente as técnicas microscópicas, de enriquecimento e cultivo, nas quais, isoladamente, muitas vezes não fornecem maiores informações quanto à composição microbiana devido às dificuldades inerentes às condições ideais para o

cultivo e ao isolamento dos micro-organismos, uma vez que alguns deles são bastante seletivos quanto ao meio de cultivo e suas variáveis (JUZAN *et al.*, 2012).

Já os métodos moleculares, os quais dispensam o cultivo, reduzem os erros dos métodos pasteurianos, permitindo a caracterização dos micro-organismos numa amostra, cultivada ou não, no seu ambiente natural (HUYBENS *et al.*, 2009). As técnicas da biologia molecular, baseadas na análise de fragmentos específicos de RNAr 16S, fornecem informações quantitativas e qualitativas precisas ao nível de espécie e grupos funcionais, uma vez que o DNA/RNA é estudado, tendo esse conjunto importância fundamental para o estudo da diversidade de micro-organismos presentes na amostra que se deseja estudar.

As variadas formas de configuração dos sistemas de tratamento e suas peculiaridades confundem a compreensão sobre a estrutura da comunidade microbiana, sua distribuição espacial e suas atividades. Portanto, estudos mais aprofundados sobre a microbiologia podem ampliar o conhecimento das transformações que ali ocorrem e ajudar a melhorar o projeto e a eficiência do tratamento (TRUU *et al.*, 2009), uma vez que é possível relacionar os resultados taxonômicos das análises moleculares com os parâmetros físico-químicos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 FILTROS PLANTADOS COM MACRÓFITAS (WETLANDS CONSTRUÍDOS)

2.1.1 Aspectos Gerais

Os filtros plantados com macrófitas (FPM) são sistemas que fazem parte do grupo dos *wetlands* construídos (*Constructed Wetlands* — como são chamados internacionalmente) são sistemas da engenharia que foram desenvolvidos inicialmente para tratar águas residuárias. Esse sistema de filtros foi projetado para replicar os processos físicos, químicos e biológicos ocorridos em áreas naturais (terras úmidas, brejos, várzeas, pântanos ou manguezais) de forma controlada (KADLEC e KNIGHT, 1996; VYMAZAL, KROPFELOVA, 2008; VYMAZAL e KROPFELOVA, 2011).

Os *wetlands* construídos são sistemas artificialmente projetados para utilizar plantas aquáticas (macrófitas) em substratos como areia, cascalho ou outro material inerte saturado ou parcialmente saturado e promover, assim, o aporte e sustento para o desenvolvimento de biofilmes que agregam populações variadas de micro-organismos que, por meio de processos biológicos, químicos e físicos, tratam as águas residuárias (KADLEC e WALLACE, 2009; VYMAZAL, 2010).

Seidel na década de 50 realizou o primeiro experimento sobre a possibilidade de tratamento de águas residuárias com filtros de fluxo vertical no Instituto Max Planck na Alemanha (VYZAMAL, 2008). As várias pesquisas realizadas por Seidel tiveram por objetivo não só o tratamento de águas residuárias domésticas, mas também de águas contaminadas por fenol e efluente de agropecuária. Os experimentos desta cientista inspiraram Kickuth (1977) a desenvolver o conceito de “*Root Zone Method*” — sistema, composto por um filtro de fluxo horizontal plantado com macrófitas, possuindo no meio filtrante um material de suporte que favorecia o desenvolvimento dos vegetais e criava condições favoráveis para a atividade biológica devido ao desenvolvimento das raízes e da comunidade microbiana ali instaladas que, em conjunto, promoviam o tratamento depuratório dos poluentes.

Na década de 90 Brix (1993) estabeleceu uma classificação para os FPM a partir do tipo de macrófita utilizada, que variava conforme o regime hidráulico aplicado. Atualmente, uma nova classificação foi proposta por Fonder e Headley (2013) que também se basearam na

hidráulica e nas características da vegetação, sendo que estes dois atributos foram subdivididos de acordo com características específicas a fim de classificar os diferentes tipos de concepção dos filtros plantados com macrófitas (Tabela 1).

Tabela 1- Características utilizadas para classificar os filtros plantados com macrófitas (FPM)

Atributo físico	Característica	Descrição	Classes	Subclasses
Hidrologia	Posição da água	Posição da água na superfície em relação ao solo ou substrato	Escoamento superficial subsuperficial	-
	Sentido do fluxo	Direção predominante do fluxo através do sistema	Horizontal	-
			Vertical	Ascendente Descendente Misto
	Saturação	Grau de saturação	Livre drenagem Intermitente Constante	-
Afluentes	Posição e tipo de distribuição do afluente	Superficial Subsuperficial Base de fundo	-	
Vegetação	Vegetação séssil	Localização das raízes: anexa nos sedimentos bentônicos ou flutuante	Séssil bentônica Flutuante	-
	Forma de crescimento	Forma de crescimento dominante da vegetação em relação à água	Emergente Submersas Flutuante com folhas Flutuante	Herbáceo Arborizado -

Fonte: adaptado de Fonder e Headley (2013).

Devido às características ecológicas, elevada eficiência de remoção, baixos custos operacionais e de instalação se comparados a

outros tipos de tratamento, operação simples, potencial de reutilização da água e dos nutrientes, nas últimas décadas os FPM tornaram-se uma opção atraente para o tratamento de efluentes domésticos e industriais (CHEN *et al.*, 2006; CHANG *et al.*, 2012; SEZERINO *et al.*, 2012a; SEZERINO *et al.*, 2012b; PELISSARI *et al.*, 2013; LANA *et al.*, 2013; ROUSSO *et al.*, 2015; MORVANNOU *et al.*, 2015), águas residuárias agrícolas (PENG *et al.*, 2012; PELISSARI *et al.*, 2014), escoamento de águas pluviais (ARIAS *et al.*, 2014), efluente de mineração, lixiviados de aterros sanitários, dentre outros (TANNER *et al.*, 2002; VYMAZAL, 2007; SCHOLZ 2010; ZHI e JI, 2012; SAEED e SUN, 2012; WU *et al.*, 2014; SEZERINO *et al.*, 2014;).

Os principais benefícios e limitações dos filtros plantados com macrófitas podem ser visualizados na Tabela 2.

Tabela 2 - Benefícios e limitações dos filtros plantados com macrófitas

Benefícios	Limitações
Bom nível de tratamento de contaminantes tais como: fósforo, formas de nitrogênio, DBO, SS e hidrocarbonetos.	Necessidade de uma área relativamente grande para construção.
Projetados para gerir eventos de chuvas intensas, proporcionando atenuação do volume de efluentes. Funcionam como 'zona tampão'.	A remoção de poluentes pode variar ao longo de períodos sazonais e também por variações no fluxo de entrada de poluentes.
Custo relativamente baixo e simplicidade de operação	Emissão de gases com efeito de estufa
Minimização de odores através da utilização de uma densa cobertura vegetal adequada, um nível raso de efluente e manutenção.	Os efluentes tratados não devem ser utilizados para a pesca, banhos, rega ou animal, devido à possível presença de patógenos, toxinas e parasitas.
Proporcionam habitat para uma grande variedade de aves, mamíferos, répteis, anfíbios e invertebrados.	Alguns poluentes (por exemplo, metais pesados e pesticidas) podem causar danos a animais selvagens.

Continuação da Tabela 2 - Benefícios e limitações dos filtros plantados com macrófitas

Esteticamente agradável: valorizam a paisagem.	Alguma infiltração de efluente para as águas subterrâneas pode ocorrer caso o filtro não for devidamente projetado e construído.
--	--

Fonte: adaptado de SCHOLZ (2010).

De acordo com o descrito na Tabela 2, é notável que a eficiência do tratamento pelos FPM depende do projeto de construção do sistema, do tipo de fluxo, da vegetação, do clima e da comunidade microbiana. Além disso, é preciso ter um bom planejamento, levando em consideração as características do local de implantação, a disponibilidade de área, a temperatura e a reutilização pretendida ou eliminação das águas residuárias tratadas. Assim, ainda que esse tipo de sistema de tratamento seja considerado simples, os processos para remover os contaminantes são complexos e interligados (SEZERINO, 2006).

Esse sistema é geralmente usado como processo descentralizado de tratamento, sendo utilizado na maioria das vezes como um tratamento secundário ou terciário, ou seja, as águas que adentram nesse sistema já receberam uma etapa de tratamento anterior. Porém, o modelo de operação do tipo “Sistema Francês” opera sem um tratamento primário, procedimento que será destacado posteriormente.

O pré-tratamento é importante para evitar o entupimento do filtro (colmatação) — obstrução dos espaços livres de poros por acumulação de sólidos. As principais tecnologias aplicadas como pré-tratamento de FPM são: Remoção de areia, cascalho e materiais volumosos; Caixa de gordura; Tanque séptico; Reator compartimentado anaeróbio; e Reator anaeróbio de fluxo ascendente (UASB) (HOFFMANN *et al.*, 2011).

Em estudo realizado por Zhi e Ji (2012) aponta-se que, nos últimos 21 anos, um terço dos países do mundo fazem uso desse tipo de tratamento, sendo predominantemente encontrado na Europa, América do Norte, Extremo Oriente e Oceania. No entanto, quando refere-se à países em desenvolvimento, é observado que sua aplicação apesar de ter aumentado ainda é lenta (ZHANG *et al.*, 2014).

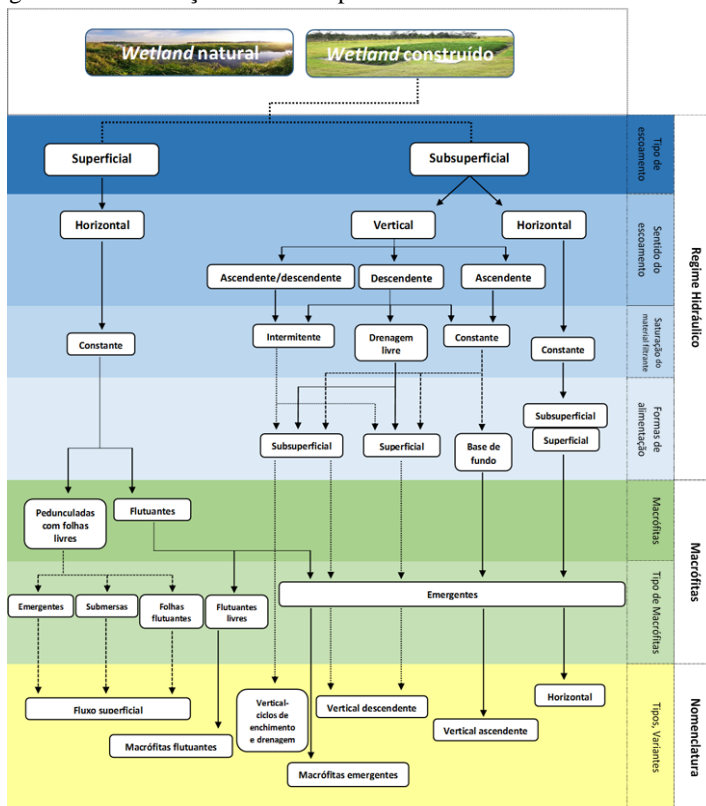
Atualmente, muitos estudos estão sendo conduzidos a fim de identificar e aperfeiçoar o papel de cada elemento atuante no tratamento. Dentre tais elementos, destacam-se os estudos sobre: o fluxo

empregado; o material filtrante; as macrófitas; a taxa hidráulica e orgânica; as cinéticas de depuração; a transferência de oxigênio; a estrutura e metabolismo do biofilme formado; a eficiência no tratamento; a diminuição de área de implantação e a vida útil do sistema.

2.1.2 Classificação dos FPM

De acordo com a última classificação feita por Fonder e Headley (2013) os filtros plantados com macrófitas são classificados com base em suas características físicas e de design de tratamento, sendo que foi desenvolvida uma hierarquia de classificação apresentada na Figura 1.

Figura 1- Classificação dos filtros plantados com macrófitas.



Fonte: adaptado de Fonder e Headley (2013).

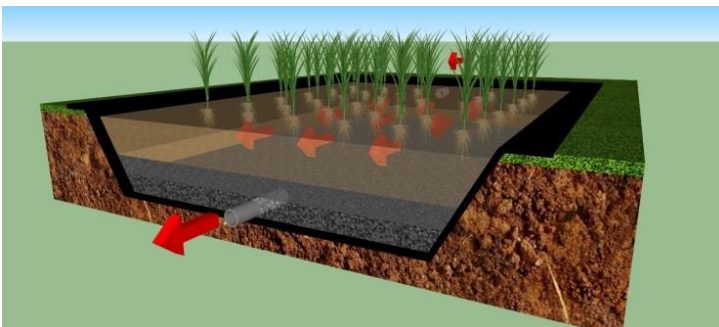
Da classificação apresentada, foram consideradas para Revisão Bibliográfica deste trabalho somente as categorias de fluxo subsuperficial (horizontal e vertical) e híbrido devido suas aplicabilidades. Além dessas duas categorias, foi destacado o Sistema Francês por este apresentar a configuração aplicada no experimento desta Tese.

2.1.2.1 Filtros plantados com macrófitas de fluxo horizontal

Neste tipo de configuração, o efluente a ser tratado é disposto na zona de entrada e flui através do meio poroso sob a superfície do leito em um caminho mais ou menos horizontal até atingir a zona de saída, onde é recolhido e descarregado. Durante esse percurso, o efluente é repartido em toda a largura e altura do filtro, estando em contato com zonas aeróbia, anóxica e anaeróbia. A zona aeróbia situa-se próxima às raízes e rizomas e, durante a passagem do efluente pela rizosfera, inicia-se a degradação do mesmo pela ação dos micro-organismos e pelos processos físicos e químicos que ali ocorrem. Logo abaixo encontra-se a zona anóxica e, ao fundo do filtro, a zona anaeróbia (COOPER *et al.*, 1996; VYMAZAL, 2010).

Em fluxo horizontal o material filtrante é completamente saturado e o nível do efluente deve ser mantido a aproximadamente 5 cm abaixo da superfície, evitando assim os caminhos preferenciais e assegurando um fluxo homogêneo (MOLLE, 2003) conforme apresentado na Figura 2.

Figura 2- Esquema representativo de um FPM de fluxo horizontal. As setas indicam o fluxo horizontal padrão.



Fonte: autor.

Como mencionado anteriormente no item 2.1.1 Aspectos Gerais, este tipo de filtro foi desenvolvido na década de 70 na Alemanha e partir de então vários estudos foram realizados, principalmente por países desenvolvidos com a utilização de materiais filtrantes grosseiros. Com o passar dos anos, tais materiais foram substituídos por outros com características mais adequadas, favorecendo as reações físico-químicas necessárias no tratamento dos poluentes.

E, em relação à macrófita, é comumente utilizada a espécie *Phragmites australis*, ainda amplamente utilizada na Europa.

Atualmente, esse tipo de configuração é bastante frequente na América do Norte e Austrália. Na Europa, essa tecnologia vem recebendo maior atenção, como por exemplo no Reino Unido. No Brasil, a utilização do fluxo horizontal é predominante e, além de tratar águas residuárias domésticas e municipais, tem sido utilizado para lixiviados de aterros industriais e agrícolas (CALJURI *et al.*, 2009).

Esse tipo de fluxo é eficiente na remoção de compostos orgânicos através da degradação promovida pela microbiota existente sob condições anóxica e anaeróbia — zonas predominantes nesta configuração devido ao sentido do fluxo, que limita a concentração de oxigênio no interior do filtro. Os sólidos suspensos são removidos predominantemente por filtração e sedimentação e a eficiência de remoção é geralmente elevada. A série nitrogenada é degradada pela ação dos micro-organismos que compõem o biofilme¹ localizado na rizosfera. O nitrogênio é removido primeiramente através da nitrificação na zona aeróbia e desnitrificação nas zonas subsequentes. Numerosos estudos afirmam que devido à insuficiência de oxigênio neste tipo de configuração, a desnitrificação prevalece entre os processos ocorridos (COOPER *et al.*, 1996; IWA, 2000; VYMAZAL, 2010).

A retenção de fósforo é geralmente baixa devido ao contato limitado do efluente com partículas de solo que adsorve e/ou precipita o fósforo. A absorção pelas plantas representa apenas armazenamento temporário visto os nutrientes serem liberados novamente para o filtro após a senescência das plantas (VYMAZAL, 2010).

O dimensionamento dos FPM de fluxo horizontal é geralmente baseado em uma abordagem de sistema hidráulico — Lei de Darcy (cálculo da seção hidráulica do filtro a ser aplicado e, por conseguinte, largura e profundidade) e; baseado em uma parte biológica, a qual está associada com o tempo de passagem do efluente baseada em uma reação

¹ **Biofilme:** é um conjunto de micro-organismos fixados sobre uma superfície sólida como, por exemplo, raízes.

de primeira ordem associada ao fluxo pistão, prevendo a concentração de saída de um poluente em função da concentração de entrada.

No entanto, é importante salientar a impossibilidade de se obter uma concentração nula na saída do tratamento, o que resulta na liberação dos materiais metabólitos pelas plantas. Tais materiais se depositam no filtro ou são liberados com o efluente e são denominados de “ruído de fundo” (C^*). Para uma vazão constante (considerando a soma dos fluxos gerados pela precipitação e evapotranspiração como “nula”), a reação utilizada para calcular o dimensionamento é o modelo K-C* (KADLEC; KNIGHT, 1996) com ajustes no coeficiente K em função da cinética de degradação, da temperatura e da porosidade do material filtrante (MOLLE, 2003), descrito na Equação 1.

Equação 1 – Dimensionamento filtro fluxo horizontal pelo modelo KC*

$$A = \frac{Q}{k} \ln \left(\frac{C_e - C^*}{C_s - C^*} \right)$$

No entanto, novas pesquisas estão em andamento com o objetivo de determinar uma abordagem mais precisa para a modelagem dinâmica visto que essa abordagem de dimensionamento apresenta variações significativas nas constantes de degradação (EME, 2012). Apesar disso, independente de qual modelo for utilizado, para esgotos municipais a área de um filtro horizontal é de cerca de $5 \text{ m}^2 \text{ EH}^{-1}$ — quando utilizado como tratamento secundário, com concentrações de entrada variando de $150 - 300 \text{ mg.l}^{-1}$ de DBO_5 ($K_{\text{DBO}_5} = 0,1 \text{ m.d}^{-1}$) — e de $1 \text{ m}^2 \text{ EH}^{-1}$ — quando utilizados como tratamento terciário ($K_{\text{DBO}_5} = 0,31 \text{ m.d}^{-1}$) (MOLLE, 2003; VYMAZAL e KRÖPFELOVÁ, 2008).

Cabe ressaltar que a desvantagem deste sistema é a sua sensibilidade à colmatação, portanto, tanto a escolha dos materiais utilizados e as cargas aplicadas quanto o processo de tratamento a montante são, em grande parte, responsáveis pelo entupimento do sistema de alimentação (KNOWLES *et al.*, 2011).

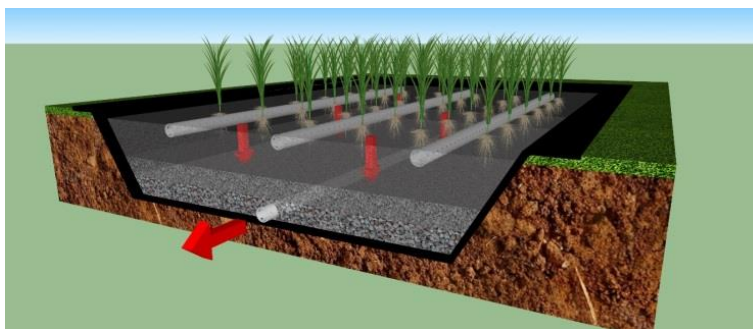
2.1.2.2 Filtros plantados com macrófitas de fluxo vertical

Nesta configuração, o efluente é disposto de forma vertical e homogênea na superfície do filtro, favorecendo a percolação do efluente pelo material filtrante composto geralmente por três camadas diferentes (camada de filtração, transição e drenagem) e sendo recuperado por uma

rede de drenagem no fundo do filtro (COOPER *et al.*, 1996; VYMAZAL e KRÖPFELOVÁ, 2008) (Figura 3).

Devido à forma intermitente de aplicação do efluente, a cada batelada é fornecido um arraste de oxigênio atmosférico para o substrato, promovendo, assim, condições favoráveis para a degradação da matéria orgânica e a oxidação da amônia. Além disso, por conta da verticalidade de infiltração, a distribuição do efluente ocorre numa área maior e o volume do filtro é totalmente aproveitado, o que, por sua vez, diminui a área requerida. Em contrapartida, essa configuração não proporciona a desnitrificação e a remoção de fósforo é baixa (COOPER *et al.*, 1996).

Figura 3 – Esquema representativo de um FPM de fluxo vertical. As setas indicam o fluxo vertical padrão.



Fonte: autor.

Cooper (2005) caracterizou os primeiros sistemas de fluxo vertical (chamados de sistemas de primeira geração), os quais possuíam várias etapas com 2 a 4 filtros no primeiro estágio e que eram alimentados com recirculação. Recentemente, sistemas mais compactos estão sendo utilizados (chamados de segunda geração).

Atualmente, a aplicação de filtros com fluxo vertical vem aumentando, e a razão para isso se dá à sua capacidade de transporte de oxigênio, o que resulta em boas taxas de nitrificação, menor área por equivalente habitante em comparação o sistema de fluxo horizontal e eficiência na remoção de compostos orgânicos (DBO₅, DQO), de sólidos em suspensão e de patógenos (UN-HABITAT, 2008).

Os FPM de fluxo vertical são comumente utilizados para tratar efluentes domésticos e municipais. Além de efluente doméstico, esse sistema é usado para vários tipos de águas residuárias, tais como

efluente de refinaria, chorume, industriais como laticínios, dentre outros, além de aplicado em áreas de intenso escoamento de água (VYMAZAL, 2010).

Em relação ao dimensionamento, Platzer (1999) descreve este utilizando dados previamente estabelecidos. Para a remoção de 85% de DQO, prevê uma demanda de 0,7 gO₂/g DQO (quantidade de oxigênio requerido na degradação), 4,3gO₂/gNTK (quantidade de oxigênio requerido para a nitrificação) e 2,9 gO₂/gN-NO₃ (recuperação do oxigênio devido a desnitrificação). Uma área prevista = Q(m³/d) / taxa hidráulica mm/d*1000. (Equação 2).

Equação 2 – Dimensionamento filtro vertical pelo balanço de oxigênio

$$\begin{aligned} \text{Demanda } O_2(g/d) & \\ &= (0,85 \times 0,7 \times DQO_{aflu}) + (4,3 \times NTK_{aflu}) \\ &- (0,1 \times 2,9 \times NTK_{aflu}) \end{aligned}$$

$$\text{Convecção } O_2(g/d) = 0,3 \times Q \times 1000$$

$$\begin{aligned} \text{Difusão } O_2(g/d) & \\ &= 1 \times \text{área prevista} \times [24 - (1,5 \times n^{\text{a}} \text{bateladas})] \end{aligned}$$

Onde:

0,3 = 300mg O₂ de arraste

1 = 1gO₂/h/m²

24 horas

1,5 = tempo entre batelada

Sendo:

$$\text{Balanço} = \text{convecção } O_2 + \text{difusão } O_2 - \text{demanda } O_2 > 0$$

Em comparação com os filtros de fluxo horizontal, sistemas de fluxo vertical exigem menor área, geralmente 1 – 3 m² EH⁻¹, com profundidade variando de 0,5 – 1 m (COOPER *et al.*, 1996).

Uma das desvantagens desse sistema é a possível colmatção, embora esta seja menos evidente que no fluxo horizontal. Por isso, é importante selecionar adequadamente o material filtrante, a taxa de aplicação, o fluxo hidráulico, dentre outros parâmetros, a fim de evitar problemas futuros.

Neste tipo de fluxo, o efluente também pode ser inserido na parte inferior do filtro e drenado de forma ascendente, ou seja, ocorrer

infiltração para cima e, em seguida, o efluente ser recolhido na base superior do filtro. Tais sistemas são chamados de *Tidal flow constructed wetlands*. Além do Brasil, outros países como Austrália, Nova Zelândia e Suécia também estudaram esse tipo de fluxo (VYMAZAL e KRÖPFLOVÁ, 2008).

Além do sistema vertical convencional, na França o sistema de FPM de fluxo vertical recebeu algumas modificações, sendo, por sua vez, denominado de *French vertical constructed wetlands* - Sistema Francês. Tal sistema é bastante utilizado em todo território francês (MOLLE *et al*, 2005; MORVANNOU *et al.*, 2015), e será detalhado no decorrer da tese.

2.1.2.3 Sistema Híbrido

Em sistemas híbridos, as vantagens do fluxo horizontal e vertical podem ser combinadas de modo a se complementarem. O interesse dessa associação é proporcionar a ocorrência dos processos de nitrificação e desnitrificação nos filtros de fluxo vertical e de fluxo horizontal, respectivamente, visto que os sistemas horizontais oferecem boas condições para a desnitrificação, mas a nitrificação é inibida pelo fato de transferência de oxigênio ser limitada pelo fluxo aplicado. Já o fluxo vertical promove condições aeróbias, o que facilita a nitrificação, mas impede a desnitrificação. Assim, para conseguir uma remoção eficaz do nitrogênio total, sistemas híbridos e com design mais sofisticado tornaram-se uma tendência inevitável no desenvolvimento dos FPM nos últimos anos (VYMAZAL, 2011; HU *et al.*, 2014).

Dependendo da finalidade, o sistema híbrido pode ser arranjado em fluxo horizontal seguido pelo vertical, ou vice e versa. O sistema fluxo vertical - fluxo horizontal (FV-FH) foi originalmente concebido por Seidel na década de 50, porém de uso bastante restrito. Somente no final dos anos 90 esse sistema passou a ser mais utilizado em países como a França e o Reino Unido. Atualmente, o uso dos sistemas híbridos aumentou consideravelmente em vários países, sendo utilizados principalmente para a remoção no nitrogênio total (UN-HABITAT, 2008). Para maiores conhecimentos dos arranjos utilizados em sistemas híbridos, o leitor pode visitar trabalhos como o de Vymazal (2013).

2.1.2.4 Sistema Francês

Na década de 80, uma equipe (LIÈNARD, 1987) do Instituto Nacional de Pesquisa em Ciência e Tecnologia para o Meio Ambiente e Agricultura (IRSTEA) (antigo Cemagref) desenvolveu um modelo de filtros plantados com macrófitas de fluxo vertical que foi designado internacionalmente como *French vertical constructed wetlands* — Sistema Francês. Os primeiros estudos, sob orientações da Dr^a Seidel, foram realizados numa pensão para crianças. Os bons resultados obtidos — principalmente nos dois primeiros estágios do sistema — incentivaram futuras pesquisas. No entanto, uma maior aplicação desse tipo de sistema para tratar águas residuárias domésticas só foi ocorrer na década de 90 através da Sociedade de Engenharia e Tecnologia (SINT), que acordou exclusividade com o IRSTEA para desenvolver e utilizar o Sistema Francês sob a marca *Phragmifilter*®.

Após alguns anos, esse tipo de sistema ganhou boa reputação no tratamento de efluentes de pequenas comunidades e, atualmente, dentre os diferentes sistemas de FPM de fluxo vertical, o Sistema Francês é o mais utilizado para tratamento de efluentes doméstico na França, sendo que várias empresas oferecem este serviço (MOLLE *et al.*, 2005). Estima-se que, atualmente, mais de 3.500 estações (MORVANNOU *et al.*, 2015) estão em operação para tratamento de efluentes domésticos com capacidade de 20 a 4.500 EH⁻¹. A maior parte das estações são compostas de duas fases de fluxo vertical em série – modelo clássico francês, no entanto existem algumas associações que são utilizadas como, por exemplo, associação com fluxo horizontal, sistemas de lagoas ou com sistemas de tratamento convencional, uma etapa do fluxo vertical com recirculação, sistemas parcialmente saturados, dentre outros) (Soriano *et al.*, 2011, Prost-Boucle e Molle 2012; Kim *et al.*, 2014; Silveira *et al.*, 2015).

No Brasil, alguns estudos vêm sendo realizados com o Sistema Francês, tais como: COTA *et al.* (2011); LANA *et al.* (2013); MANJATE *et al.* (2015); VON SPERLING, M. (2015), os quais aportam bons resultados na aplicação deste sistema nas condições ambientais do país.

O dimensionamento do Sistema Francês foi desenvolvido de forma bastante empírica, sendo baseado no conhecimento adquirido ao longo de anos de estudos feitos pelo IRSTEA a respeito da carga orgânica aceitável expressa em superfície do filtro por equivalente habitante (EH).

Tradicionalmente e com parâmetros de construção e operação bem definidos (MOLLE *et al.*, 2005), o Sistema Francês possui dois estágios de tratamento compostos de três filtros verticais em paralelo no primeiro estágio e dois filtros verticais ou um horizontal no segundo estágio. Tem como principal característica a aplicação direta de efluente bruto na superfície do filtro, ou seja, não há necessidade de tratamento primário. Tampouco há necessidade de etapas posteriores para o tratamento do efluente. Porém, normalmente antes da aplicação nos filtros é feito um gradeamento do efluente para retenção de sólidos grosseiros. A Figura 4 representa a estação de tratamento do tipo Sistema Francês desenvolvido pelo IRSTEA.

O efluente bruto, após a triagem, ou mesmo sem ela, é bombeado para o primeiro estágio através de tubos de no mínimo 100 mm de diâmetro, com grandes orifícios. Na primeira etapa, o efluente é filtrado através de uma camada de, no mínimo, 30 cm de brita fina de sílica, para, posteriormente, passar através de uma segunda camada de transição com material intermediário e, então, atingir a camada de drenagem com material grosso no fundo do filtro. Em relação aos filtros utilizados no segundo estágio, estes possuem praticamente as mesmas características do primeiro, com exceção da camada de filtração composta de no mínimo 30 cm de areia ($0,25 \text{ mm} < d_{10} < 0,40 \text{ mm}$).

A configuração clássica francesa é composta por dois estágios verticais, no entanto, quando é utilizado um filtro horizontal no segundo estágio, não se utiliza areia como material filtrante e o sistema passa a configurar-se como um sistema híbrido (MOLLE *et al.*, 2008).

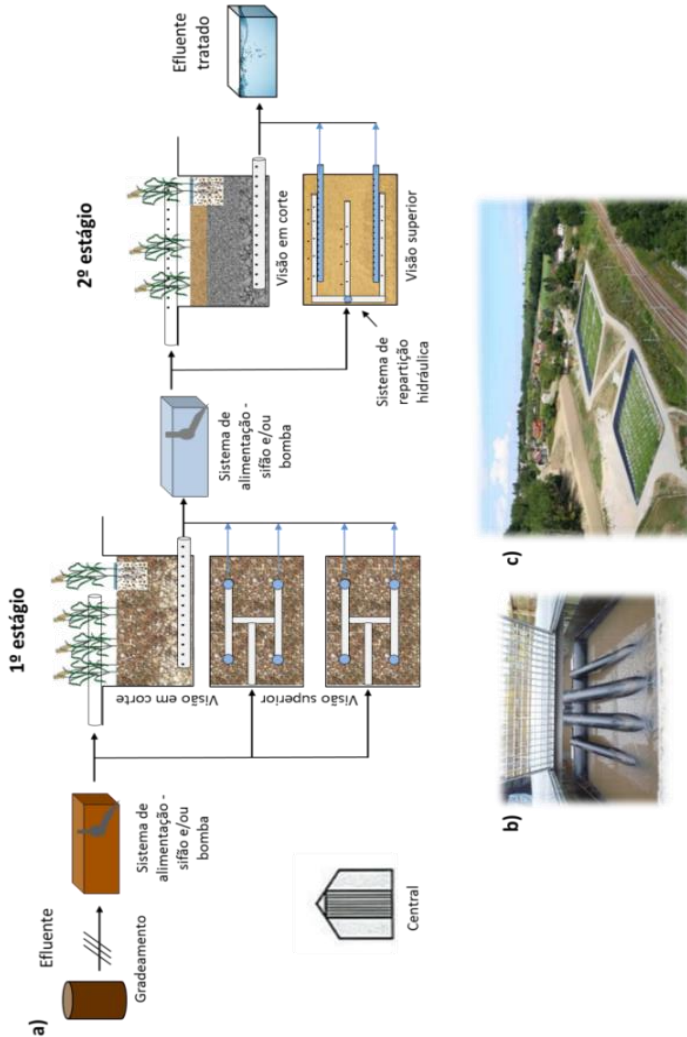
Na França, os filtros plantados com macrófitas geralmente são plantados com junco comum — *Phragmites australis*.

A Figura 5 permite visualizar a configuração do filtro, e a Tabela 3 a granulometria dos materiais utilizados em cada estágio.

A superfície de cada estágio é adaptada de acordo com alguns fatores, como o clima, o nível de remoção de poluentes exigido pelas autoridades, a carga orgânica recebida no verão, a carga hidráulica, entre outros. Para o primeiro estágio, é indicado uma superfície de $1,2 \text{ m}^2 \cdot \text{EH}^{-1}$ para o conjunto dos três filtros, com uma carga orgânica de $300 \text{ gDQOm}^2 \cdot \text{d}^{-1}$, $\approx 150 \text{ gSSTm}^2 \cdot \text{d}^{-1}$, $\approx 25 - 30 \text{ gNKm}^2 \cdot \text{d}^{-1}$ e uma carga hidráulica de $0,37 \text{ m} \cdot \text{d}^{-1}$ sobre um filtro em funcionamento.

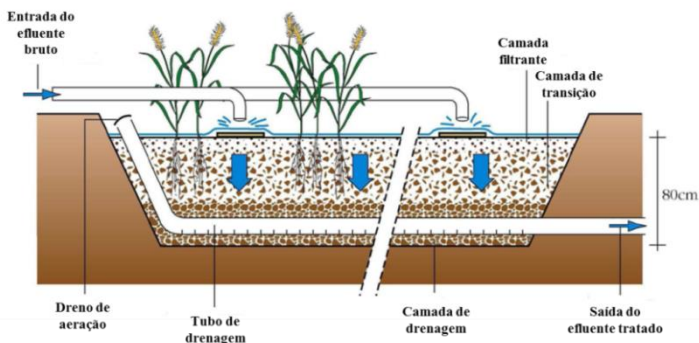
Figura 4 – Esquema do princípio do Sistema Francês.

a) configuração padrão; b) gradeamento; c) estação de tratamento em escala real Chalex 2.000 EH⁻¹ – FR



Fonte: autor.

Figura 5 - Esquema da primeira etapa do tratamento Sistema Francês



Fonte: adaptado de Groupe macrophyte (2005).

Já para o segundo estágio, a superfície indicada é de $0,8 \text{ m}^2 \cdot \text{EH}^{-1}$ para os dois filtros. Esse dimensionamento é baseado numa descarga diária de $120 \text{ gDQO} \cdot \text{EH}^{-1}$, $60 \text{ gSST} \cdot \text{EH}^{-1}$, $10 - 12 \text{ gNK} \cdot \text{EH}^{-1}$ e $150 \text{ L} \cdot \text{EH}^{-1}$ — parâmetros geralmente encontrados em pequenas comunidades francesas (MOLLE *et al.*, 2005).

Tabela 3 – Perfil granulométrico dos materiais utilizados em cada estágio e camada do Sistema Francês

1º estágio	2º estágio
Camada filtrante (superior)	
>30 cm de brita fina (2/8 mm) *	>30 cm de areia (0,25 mm < d ₁₀ < 40 mm)
Camada de transição (intermediária)	
10 a 20 cm de brita adaptada (5/20 mm)	10 a 20 cm de brita adaptada (3/10 mm)
Camada de drenagem (inferior)	
10 a 20 cm de brita (20/40 mm)	10 a 20 cm de brita (20/40 mm)

*Atualmente é recomendada a granulometria de 2/6mm (MOLLE, comunicação pessoal)

Fonte: MOLLE *et al.* (2005).

Em relação à operação, o Sistema Francês é operado com alternância de ciclos: ciclo de alimentação e ciclo de repouso. Quando um dos três filtros do primeiro estágio entra no ciclo de alimentação, este recebe efluente bruto por 3 a 4 dias; em seguida, o filtro é mantido em repouso durante sete dias. O mesmo acontece, sucessivamente, para os outros dois filtros. Essa alternância de ciclos entre os filtros é fundamental para o controle do crescimento bacteriano e para manter as condições aeróbias no filtro, o que permite boa nitrificação, promoção da mineralização da matéria orgânica proveniente dos sólidos suspensos contidos no efluente bruto, além de evitar a colmatação (MOLLE *et al.*, 2005).

Assim, o primeiro estágio contribui principalmente para degradação da matéria carbonácea — onde os sólidos são retidos e mineralizados —, com um acúmulo teórico de 1,5 cm ao ano (MOLLE, 2014) e com a nitrificação devido a condição aeróbia predominante. A originalidade desta fase encontra-se principalmente no fato de que ele é alimentado com efluente bruto (e, por conseguinte, o desenvolvimento de uma camada de matéria orgânica – lodo – ao longo dos anos). Molle *et al.* (2005) apontam que para o primeiro estágio do Sistema francês com superfície de $1,2 \text{ m}^2 \text{ EH}^{-1}$, apresenta uma eficiência de 79% e 86% para DQO e SST, respectivamente, enquanto que a nitrificação é incompleta, com 50% - 60% de remoção para NTK.

Já o segundo estágio completa a remoção da matéria orgânica e favorece a desnitrificação, promovendo a remoção total do nitrogênio em função das condições de oxigenação, da temperatura e do pH. A oxigenação é mantida graças à alimentação do tipo batelada (alimentação intermitente) e a difusão gasosa do ar atmosférico pela superfície do filtro com conexão ao seu interior pelos drenos de aeração.

Quando os filtros são construídos com uma diferença de altura entre a entrada e saída, o efluente flui por gravidade, utilizando um sifão como dispositivo de alimentação, sem ter aporte de energia (60% dos filtros de 1º estágio e 75% dos filtros de 2º estágio) (MOLLE *et al.*, 2005). Outro fator é a distribuição do efluente, o qual é recomendado para o primeiro estágio um fluxo de $0,5 \text{ m}^3/\text{h}/\text{m}^2$ de superfície do filtro alimentado — com um ponto de alimentação para um máximo de 50 m^2 — e, para o segundo estágio, é recomendado um fluxo de $0,25 \text{ m}^3/\text{h}$ para $0,5 \text{ m}^3/\text{m}^2$, de acordo com as características da areia — com um ponto de alimentação para 1 m^2 de superfície Figura 6.

Figura 6 – Pontos de alimentação.

(a, b) alimentação do primeiro estágio. (c) alimentação no segundo estágio.



Fonte: grupo de estudos FPM – IRSTEA

Portanto, é importante salientar que a alimentação dos filtros é de fundamental importância para evitar futuros problemas de desempenho do sistema.

O Sistema Francês é adequado para a remoção das formas de nitrogênio contidos em águas residuárias. Um estudo realizado por Morvannou *et al.* (2015) apresentou um panorama geral baseado num tratamento estatístico de uma base de dados dos últimos 10 anos do sistema clássico francês resumindo, os dados de desempenhos globais de 415 estações em escala real.

Em relação à regulamentação francesa para estações com capacidade entre 200 e 2.000 EH^{-1} (mínimo de eficiências de remoção para DQO, DBO_5 e SST de 60%, 60% e 50%, respectivamente, ou em termos de concentração máxima de efluente de $35 \text{ mgDBO}_5 \text{ L}^{-1}$) os filtros mostraram-se uma boa remoção dos poluentes com uma superfície total de filtração para ambos os estágios de $2 \text{ m}^2 \text{ EH}^{-1}$ de: > 90% para DQO; 95% para SST e 85% para a nitrificação. Apesar das flutuações na quantidade de carga orgânica e hidráulica, 60 mg DQO L^{-1} , 15 mg SST L^{-1} e 8 mg NTK L^{-1} , apresentaram como concentrações médias na saída do sistema.

A Tabela 4 apresenta as concentrações de saída e eficiência de remoção média de DQO, SST e NTK – remoção global das estações estudadas. Eficiências de remoção de 87%, 93% e 84% para DQO, SST e NTK, respectivamente. Estes valores são consistentes com os calculados por Molle *et al.* (2005) (91%, 95% e 85% para DQO, SST e NTK, respectivamente).

A dispersão das concentrações de saída é maior do que para as eficiências de remoção, mesmo se os requisitos clássicos de saída são respeitados (125 mgDQO L^{-1} , 35 mgSST L^{-1} e $25 \text{ mgDBO}_5 \text{ L}^{-1}$), mesmo para cargas poluentes até 2-5 vezes da carga nominal. Estas

concentrações dependem das características em relação ao projeto/design (superfície do filtro, altura do material do filtro) e operacionais (cargas hidráulicas). Sendo assim, o Sistema clássico Francês é considerado um método eficiente para o tratamento de águas residuárias provenientes de pequenas comunidades (MORVANNOU *et al.*, 2015).

Contudo, cabe salientar que as eficiências globais citadas pelo trabalho de Morvannou *et al.* (2015) não refletem totalmente a eficiência de cada fase, e sim o conjunto. Na verdade, se um dos dois estágios deixa de tratar os poluentes, o outro pode compensar esta disfunção e suavizar as eficiências de remoção. Como citado anteriormente, a primeira etapa, é mais complicada por enfrentar algumas dificuldades para o tratamento do NTK, sendo o segundo estágio, responsável por compensar a baixa eficiência de remoção, completando a nitrificação total. Por este fato, vários estudos estão dando ênfase ao primeiro estágio do Sistema Francês, bem como o estudo realizado nesta tese.

Nota-se que o afluente apresentava características bastantes variáveis devido às diferenças nas redes de esgotos (combinadas ou separadas e quantidade de intrusão de água limpa). Esses dados vêm de encontro com os resultados obtidos pelo estudo realizado por Molle *et al.* (2005).

De acordo com os dados da Tabela 4, é possível constatar que, globalmente, o sistema apresenta bons níveis de remoção para todos os parâmetros.

No que diz respeito à remoção do nitrogênio NTK, o desvio padrão (SD) de 17% é explicado pela sensibilidade da nitrificação em relação à presença de oxigênio e à competição com a degradação da matéria orgânica. Vários parâmetros influenciam na etapa da nitrificação, tais como: sistema de distribuição, gestão de alimentação (frequência e número de bateladas), tipo do material filtrante utilizado, entre outros. Assim como para o nitrogênio, um desvio padrão maior é observado para o fósforo (MOLLE *et al.*, 2005).

Os resultados obtidos para o primeiro estágio estão resumidos na Tabela 5, onde é possível observar que a maior eficiência dessa etapa é em relação à decomposição da matéria orgânica (SST, DQO e DBO₅), embora a nitrificação não seja negligenciável, com remoção de 59%. Essa eficiência é reforçada pelo depósito de lodo na superfície do filtro, que ajuda a regular a infiltração e, por consequência, o regime hidráulico do filtro (MOLLE *et al.*, 2005; MOLLE *et al.*, 2006; MORVANNOU *et al.*, 2015).

O segundo estágio possui papel principal na nitrificação. Já para a DQO e SST o desempenho se concentra no polimento desses parâmetros devido às baixas concentrações de entrada proveniente do primeiro estágio – aproximadamente 140 e 40 mg/L, respectivamente (MOLLE *et al.*, 2005). A Tabela 6 apresenta os resultados obtidos de concentração e eficiência para o segundo estágio.

Tabela 4 – Concentrações de saída e eficiência de remoção global para os dois estágios do Sistema Francês.

Parâmetros	DQO		SST		NTK	
	[C] saída (mg/L)	Eficiência de remoção (%)	[C] saída (mg/L)	Eficiência de remoção (%)	[C] saída (mg/L)	Eficiência de remoção (%)
Média ± X	74 ± 16	87± 2 (409)	17±6	93±1 (411)	11±2	84±2 (329) 17
(N) SD*	(417) 168	14	(418) 64	9	(357) 13	
Molle et al. (2005)	66 ±13 (49) 46	91± 3 (49) 46	14±5 (49) 18	95±2 (49) 18	13±5 (49) 18	85±5 (49) 17

* SD: desvio padrão. N: nº de amostras; ± X = 1,96 * (SD/√N): 95% intervalo de confiança

Fonte: adaptada de Morvannou *et al.* (2015).

Tabela 5 – Concentrações de saída e eficiência de remoção para o 1º estágio de tratamento do Sistema Francês

Parâmetros	DQO		SST		NTK	
	[C] saída (mg/L)	Eficiência de remoção (%)	[C] saída (mg/L)	Eficiência de remoção (%)	[C] saída (mg/L)	Eficiência de remoção (%)
Média ± X	126±11	77± 2 (250)	38±4	83±2 (252)	27±2	59±3 (223) 21
(N) SD*	(250) 90	14	(252) 33	15	(228) 19	
Molle et al. (2005)	131±20 (54) 71	79± 3 (54) 10	33±6 (54) 19	86±3 (54) 19	31±5 (54) 17	58±5 (54) 17

* SD: desvio padrão. N: nº de amostras; ± X = 1,96 * (SD/√N): 95% intervalo de confiança

Fonte: adaptada de Morvannou *et al.* (2015).

Tabela 6 – Concentrações de saída e eficiência de remoção para o 2º estágio com carga hidráulica de CH < 0,6 m/d.

Parâmetros	DQO		SST		NTK	
	[C] saída (mg/L)	Eficiência de remoção (%)	[C] saída (mg/L)	Eficiência de remoção (%)	[C] saída (mg/L)	Eficiência de remoção (%)
Média ± X (N) SD*	51 ± 7 (44) 23	56 ± 12 (44) 38	11 ± 3 (44) 9	65 ± 10 (44) 34	7 ± 2 (44) 6	71 ± 7 (44) 23
80 < DQO < 280 (média 140) mg.L⁻¹	55 ± 8 (29) 21	60 ± 8 (28) 21	11 ± 4 (29) 9	72 ± 7 (28) 19	6 ± 2 (29) 5	78 ± 7 (28) 18

* SD: desvio padrão. N: nº de amostras; $\pm X = 1,96 * (SD/\sqrt{N})$: 95% intervalo de confiança

Fonte: adaptada de MOLLE *et al.* (2005)

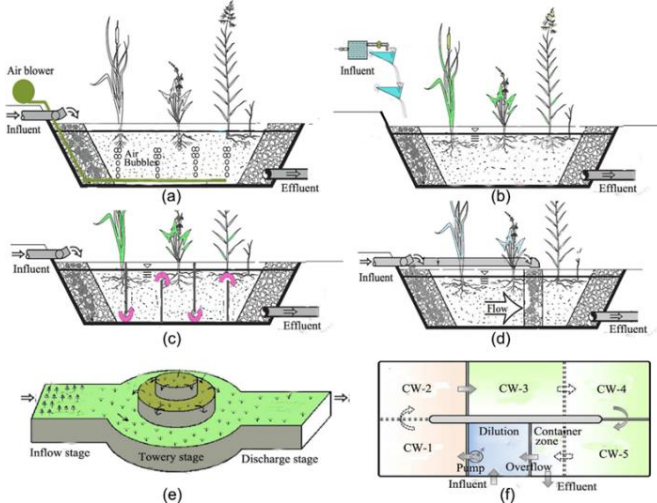
2.1.3 Novas configurações em filtros plantados com macrófitas

Pelas vantagens que o sistema de FPM oferece em comparação com outros sistemas de tratamento, sua aplicação atualmente está recebendo maior atenção no meio acadêmico, o que, por sua vez, acarreta num aumento significativo do número de pesquisas sobre o assunto.

Além disso, a necessidade de compreensão dos mecanismos de remoção dos poluentes levou a um aumento das novas configurações apresentando grande variedade de designs e/ou combinações de diferentes tipos de FPM e/ou uso de outras tecnologias, que estão sendo testadas por diversos grupos de pesquisas com o intuito de aumentar a eficiência na remoção dos nutrientes (principalmente o nitrogênio) e de diminuir a área para implementação (FAULWETTER *et al.*, 2009; WU *et al.*, 2014). Algumas dessas configurações podem ser visualizadas na Figura 7.

Figura 7 – Inovações de configuração em filtros plantados com macrófitas.

a) *Artificial aerated CW modified* – Wallace e Knight (2006); b) *Drop aerated CW modified* – Wallace e Knight (2006); Zou *et al.* (2012); c) *Baffled flow CW modified* – Wallace e Knight (2006); d) *Step feeding CW modified* – Wallace e Knight (2006); e) *Hybrid towery CW modified* – Ye e Li (2009); f) *Circular flow corridor CW modified* - Peng *et al.* (2012).



Fonte: WU *et al.* (2014).

Na França, devido à grande procura por filtros plantados com macrófitas para o tratamento de efluentes domésticos, principalmente o Sistema Francês, foi observado nos últimos anos um aumento das inovações (ou tentativas de inovação) destinadas a reduzir o *footpring* (pegada ecológica), bem como, os custos de implementação e operação (MOLLE, 2014). Dentre estas inovações pode-se citar: Sistema Francês com um único estágio e recirculação; sobreposição dos estágios do Sistema Francês clássico; um estágio do Sistema Francês com fundo saturado; Sistema Francês combinado com sistemas convencionais (MOLLE *et al.*, 2008; TROESCH *et al.*, 2010; PROST-BOUCLE e MOLLE, 2012; SILVEIRA *et al.*, 2015; KIM *et al.*, 2014). Enfatizando que essas modificações mantiveram um alto nível de desempenho no tratamento (MOLLE, 2014).

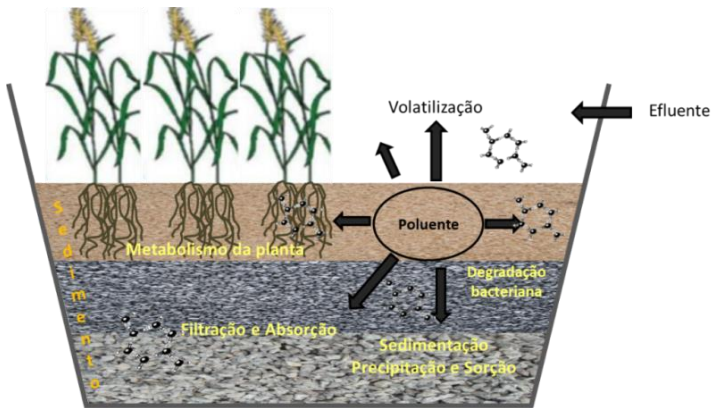
Sistema Francês de fluxo vertical também foi testado em associações com sistemas convencionais, como biodiscos, filtros biológicos, dentre outros (SORIANO *et al.*, 2011; NIELSEN, 2003; TROESCH *et al.*, 2009; VINCENT *et al.*, 2011).

Molle (2014) cita que estas novas configurações precisam de uma boa compreensão das interações dos processos que envolvem o fluxo do sistema, visto que, decantação das partículas, filtração e interceptação resultam na formação da camada de matéria orgânica na superfície do filtro, já que, esta camada desempenha um papel fundamental na eficiência do tratamento.

2.1.4 Componentes e funcionamento dos Filtros plantados com macrófitas

Os filtros plantados com macrófitas formam um conjunto complexo, sendo considerados reatores físico-químicos e biológicos artificiais, impermeáveis — se comparados ao solo natural —, onde o material utilizado na filtração permite o desenvolvimento de micro-organismos (principalmente bactérias) que, conjuntamente com outros fatores, promovem o tratamento do efluente, os quais podem-se destacar: filtração dos sólidos suspensos — que está relacionada diretamente com a granulometria do material filtrante empregado; degradação biológica pela comunidade bacteriana desenvolvida na rizosfera; e, transformações químicas (sorção, precipitação) de acordo com as características minerais do suporte utilizado (MOLLE, 2003). O conjunto da remoção dos poluentes em um FPM está resumido na Figura 8.

Figura 8 – Mecanismos de remoção dos poluentes em um Filtro plantado com macrófitas.



Fonte: adaptado de UN-HABITAT (2008).

Os mecanismos de remoção para os principais constituintes do afluente que adentra um FPM estão citados na Tabela 7.

Tabela 7 - Principais mecanismos atuantes na remoção de poluentes em FPM

Constituintes das águas Residuárias	Mecanismos de remoção
Sólidos Totais	Sedimentação/Filtração/Decomposição Precipitação e co-precipitação Oxidação pelos microrganismos Assimilação pelas plantas
DBO e DQO	Degradação microbiana (aeróbia e anaeróbia) Sedimentação (acumulação de matéria orgânica na superfície do sedimento) Filtração
Fósforo	Reações de adsorção pelas plantas e microbiota Precipitação com Al, Fe e Ca. Formação de complexos com a matéria orgânica Assimilação pelas plantas aquáticas e microbiota
Nitrogênio	Amonificação/Nitrificação/Desnitrificação Assimilação pelas plantas aquáticas Volatilização da amônia

Continuação da Tabela 7 - Principais mecanismos atuantes na remoção de poluentes em FPM.

Sulfato	Adsorção (troca catiônica) Precipitação de sulfetos metálicos
Metais	Sedimentação/Filtração Reações de adsorção Precipitação com material orgânico e acúmulo no sedimento
	Precipitação na forma de hidróxidos e sulfetos Assimilação pelas plantas aquáticas Transformações microbianas (oxidação)
	Adsorção a matéria orgânica e partículas do solo Degradação microbiana
	Sedimentação/Filtração/Adsorção
Patógenos	Radiação Ultravioleta Oxidação Predação e ataque por vírus Morte natural Exposição a biocidas excretados por macrófitas

Fonte: Kadlec e Knight (1996); Cooper *et al.* (1996); Un-Habitat (2008).

2.1.4.1 Elementos atuantes

Dentro de um sistema de filtros plantados com macrófitas encontra-se, basicamente, um conjunto de três elementos: *os vegetais, o material filtrante e os micro-organismos*. No entanto, como afirmam vários estudos (FAULWETTER *et al.*, 2009; TRUU *et al.*, 2009; SAMSÓ e GARCÍA, 2013), dentre os três elementos, a atividade dos micro-organismos é considerada como o elemento mais importante na transformação/remoção dos poluentes.

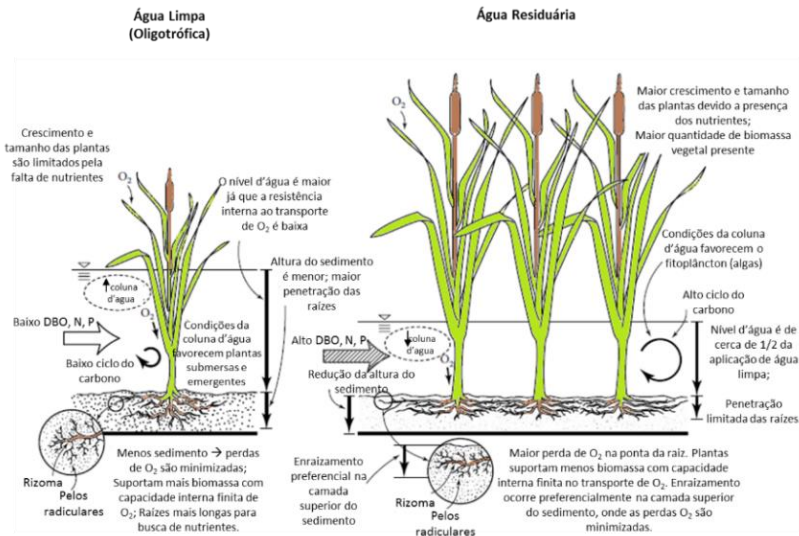
❖ Vegetais

Em sistemas de FPM para tratamento de águas residuárias os vegetais utilizados são geralmente as macrófitas aquáticas, que são plantas vasculares com tecidos facilmente visíveis e que diferem das algas devido à organização interna dos tecidos resultantes de células especializadas.

Esse grupo de plantas terrestres sofreu ao longo do seu processo evolutivo uma série de adaptações em decorrência da deficiência de oxigênio que influenciaram em seu crescimento e desenvolvimento em ambientes aquáticos. Dentre elas, podemos encontrar: respostas

fisiológicas e comportamentais, adaptações morfológicas, estratégias reprodutivas, entre outras. As principais adaptações podem ser visualizadas na Figura 9 (KADLEC e WALLACE, 2009).

Figura 9 - Adaptações da planta às tensões da água residuária em filtros plantados com macrófitas.



Fonte: adaptado de Kadlec e Wallace (2009).

Williams (1964) classifica quatro grupos de macrófitas aquáticas de acordo com sua morfologia e fisiologia, a saber:

- **Macrófitas emergentes:** normalmente encontradas em condição saturada ou submersas ao solo, podendo se desenvolver em profundidade de água de 0,5 m ou acima da superfície do substrato. Principais espécies documentadas: *Acorus cálamo*, *Carex rostrata*, *Phragmites australis*, *Scirpus lacustris* e *Typha latifolia*.

- **Macrófitas flutuantes com folhas:** enraizadas ao sedimento; submersas com profundidade de água de 0,5 – 3,0 m; flutuantes ou com folhas ligeiramente aéreas; exemplos incluem: *Nymphaea odorata* e *Nuphar lutea*.

- **Macrófitas submersas:** possuem seu tecido fotossintético submerso pela água; possuem bom desenvolvimento em condições oxigenadas e são usadas principalmente para o polimento de efluente

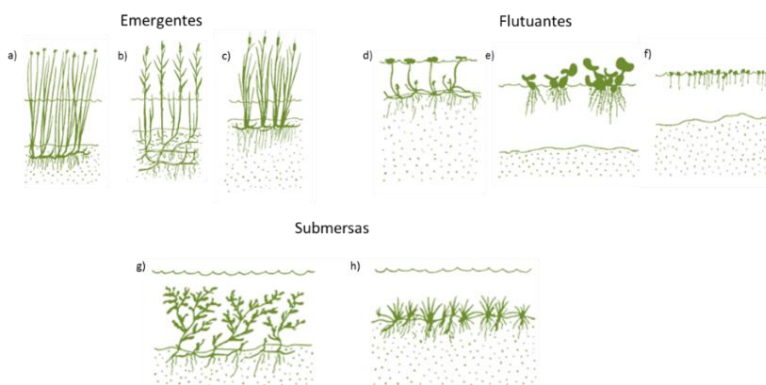
secundário. Os exemplos incluem: *Myriophyllum spicatum*, *Ceratophyllum demersum*, e *Rhodophyceae*.

- Macrófitas livremente flutuante: flutuam livremente nas águas superficiais. Estas plantas são capazes de remover nitrogênio (N) e fósforo (P) pela incorporação na biomassa vegetal e por desnitrificação; também removem os sólidos em suspensão. Exemplos incluem: *Lemna minor*, *Spirodela polyrhiza* e *Eichhornia crassipes*.

Podemos observar os grupos dominantes de espécies de macrófitas aquáticas utilizadas no tratamento de águas residuárias na Figura 10.

Figura 10 - Formas dominantes de macrófitas aquáticas.

As espécies ilustradas são: Emergentes - (a) *Scirpus* (*Schoenoplectus lacustris*), (b) *Phragmites australis*, (c) *Typha latifolia*; Flutuantes - (d) *Hydrocotyle vulgaris*, (e) *Eichhornia crassipes*, (f) *Lemna minor*; Submersas - (g) *Crispus potamogeton*, (h) *Littorella uniflora*.



Fonte: adaptado de Kadlec e Wallace (2009).

Várias espécies são documentadas no desenvolvimento de filtros plantados com macrófitas, sendo selecionadas de acordo com: região, clima, regime hidráulico e carga orgânica aplicada no filtro. Estudos em países de clima tropical utilizam uma maior variedade de plantas (EME, 2012). Algumas dessas espécies estão relatadas na Tabela 8.

No Sistema Francês, bem como em outras configurações utilizadas na Europa, a espécie comumente aplicada é a *Phragmites australis* (Figura 11), devido às suas importantes características, tais como: adaptação ao clima frio, resistência a condições de longo período

de alagamento, a períodos secos, forte adaptação ao recebimento de elevada carga orgânica, rápido crescimento das raízes, etc.

Tabela 8 – Algumas das espécies vegetais utilizadas em clima tropical para filtros de fluxo horizontal e vertical.

Espécie	Referência
<i>Filtros de fluxo horizontal</i>	
<i>Agapanthus africanus</i>	Zhang <i>et al.</i> (2011)
<i>Arundo donax</i>	Radha Madhaw <i>et al.</i> (2002)
<i>Cyperus papyrus</i>	Okurut <i>et al.</i> (1999); Mburu <i>et al.</i> (2008); Zhang <i>et al.</i> (2011)
<i>Pennisetum purpureum</i>	Platzer <i>et al.</i> (2004)
<i>Phragmites australis</i>	Agudelo <i>et al.</i> (2010); Ahmed <i>et al.</i> (2008); Ascuntar Ríos <i>et al.</i> (2009); Bayley <i>et al.</i> (2003); Davison <i>et al.</i> (2001); Davison <i>et al.</i> (2005); Melián <i>et al.</i> (2010); Rivera <i>et al.</i> (1995); Tomenko <i>et al.</i> (2006); Williams <i>et al.</i> (1999)
<i>Scirpus grossus</i>	Jinadasa <i>et al.</i> (2006)
<i>Typha augustifolia</i>	Esser <i>et al.</i> (2010); Lim <i>et al.</i> (2001); Polprasert e Sawaitayothin (2006); Williams <i>et al.</i> (1999); Zhang <i>et al.</i> (2011); Zhang <i>et al.</i> (2012)
<i>Zizaniopsis bonariensis</i>	Da Motta Marques <i>et al.</i> (2001); Philippi <i>et al.</i> (1999); Sezerino <i>et al.</i> (2012)
<i>Filtros de fluxo vertical</i>	
<i>Agapanthus africanus</i>	Zurita <i>et al.</i> (2009) Zurita <i>et al.</i> (2011)
<i>Arundo donax</i>	Zhu <i>et al.</i> (2010); Ge <i>et al.</i> (2011)
<i>Phragmites australis</i>	Zhang <i>et al.</i> (2010); Cui <i>et al.</i> (2010); Ge <i>et al.</i> (2011)
<i>Canna indica</i>	Zhang <i>et al.</i> (2010); Cui <i>et al.</i> (2010); Ge <i>et al.</i> (2011)
<i>Cyperus alternifolius</i>	Zhang <i>et al.</i> (2010)
<i>Cyperus involucratus</i>	Kantawanichkul <i>et al.</i> (2009)
<i>Phragmites australis</i>	Melián <i>et al.</i> (2010); Zhang <i>et al.</i> (2010); Jia <i>et al.</i> (2010)
<i>Strelitzia reginae</i>	Zurita <i>et al.</i> (2009) Zurita <i>et al.</i> (2011)
<i>Vetiveria zizanioides</i> Nash	Kantawanichkul <i>et al.</i> (1999)

Fonte: Adaptado de EME (2012).

Porém o fator mais importante da escolha da planta é relacionado com o seu papel mecânico, a fim de garantir a permeabilidade da camada de depósito. Para tanto, é necessário que a planta possua um desenvolvimento denso e homogêneo em haste, sem formação de tufos (MOLLE *et al.*, 2015).

Figura 11– *Phragmites australis*
Macrófita aquática comumente utilizada no Sistema Francês.



Fonte: autor.

Segundo Wang *et al.* (2015) vários estudos confirmam que as macrófitas são essenciais para o bom desempenho do sistema de tratamento e para a remoção de nutrientes presentes no efluente. No entanto, sabe-se que a absorção dos nutrientes pelas plantas é negligenciável se comparada com as transformações microbianas e físico-químicas que ocorrem no interior do filtro. De todo modo, elas são essenciais no desenvolvimento de tais filtros, pois criam um ambiente favorável que fomenta os principais processos microbianos do tratamento (KADLEC e WALLACE, 2009; WANG *et al.*, 2015), relatados a seguir:

- Assimilação de nutrientes: efeito significativo para efluentes bem diluídos. Estudos apontam que a poda regular das plantas influencia na remoção dos nutrientes, aumentando assim sua eficiência, principalmente em clima tropical. No entanto, a carga armazenada pelas plantas continua baixa em comparação com as cargas aplicadas aos

filtros — para o nitrogênio, média de 3 gN/m²/dia para fluxo horizontal e, 7 gN/m²/dia para fluxo vertical (média de 20 a 200 gN/m²/ano⁻¹); já para o fósforo, a média é de 3 a 15 gP/m²/ano⁻¹.

- Permeabilidade do filtro: o papel mecânico da vegetação e a escolha da macrófita a ser utilizada no processo são de extrema relevância uma vez que as plantas influenciam na percolação do efluente. A alimentação com efluente bruto induz a formação de uma camada de lodo que reduzirá a permeabilidade do efluente, bem como a transferência de oxigênio.

Por outro lado, o crescimento das raízes e rizomas tem o potencial de contrabalancear esse limitante uma vez que, no período de repouso do filtro, ao redor das plantas cria-se um espaço favorável à hidráulica devido ao efeito físico e mecânico do vento (Figura 12), aspecto que, por sua vez, aumenta a permeabilidade e transferência de oxigênio para o material filtrante.

Figura 12 – Papel mecânico das plantas na camada de lodo depositada

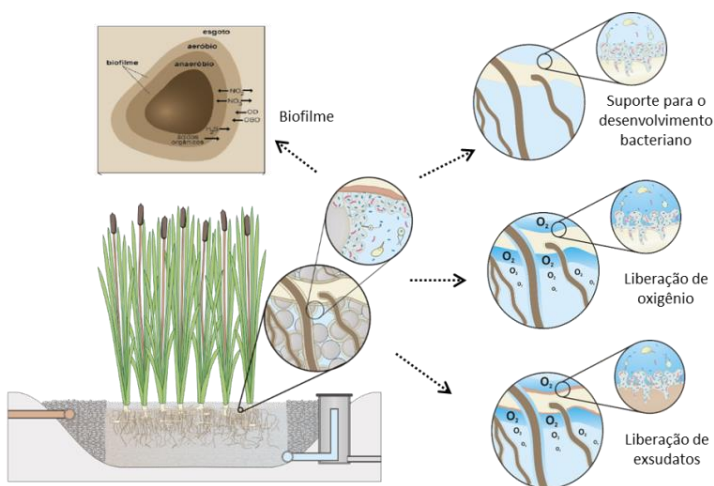


Fonte: grupo de estudos FPM – IRSTEA

- Transferência de oxigênio: apesar das plantas contribuírem na transferência de oxigênio para o interior do filtro, principalmente ao redor das raízes e no verão, estudos comprovam que esse fenômeno é pouco representativo se comparado aos outros fatores físicos (difusão e convecção) que ocorrem.

- Desenvolvimento das raízes: o rizoma tem um efeito positivo no tratamento devido às comunidades bacterianas instaladas nas raízes. Vários estudos comprovam a importância das raízes para o desenvolvimento do biofilme (biota bacteriana), que é o principal responsável pelo tratamento dos poluentes presentes no efluente (Figura 13).

Figura 13 – Rizosfera.
Detalhe para biofilme e processos ocorridos.



Fonte: adaptado de Olijnyk (2008) e Weber e Gagnon (2013).

- Mineralização da matéria orgânica: as plantas contribuem indiretamente para a mineralização uma vez que sua densa camada isola a superfície do filtro, protege das agressões térmicas e, além disso, cria um ambiente de sombra e umidade adequadas para o desenvolvimento das bactérias.

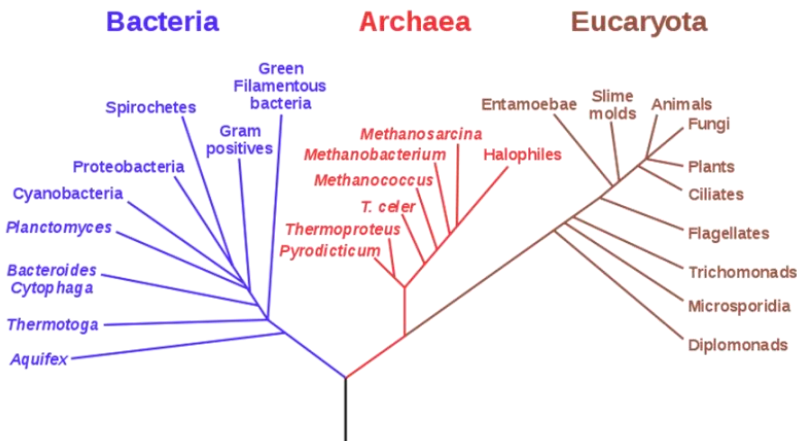
Além disso, outro fator que se sobressai na implementação desse sistema é o paisagismo. Os filtros ganham destaque pela sua estética e, desse modo, promovem melhor aceitação da comunidade em sua aplicação. Ademais, estudos recentes apontam a valorização da biomassa produzida pelas plantas. Heers (2006) indica os seguintes benefícios: valorização energética (combustível e produção de biogás); valorização agrícola (compostagem, produção de fertilizante etc.);

produção forrageira; valorização industrial (produção de papel, material artesanal, produção de produtos químicos). No entanto, é necessário um estudo de toxicidade dos vegetais antes de sua utilização.

❖ Micro-organismos

A comunidade microbiana do solo é composta por três domínios – Bacteria, Archaea e Eucaryota (Figura 14) —, sendo os procariotos (Bacteria e Archaea) os maiores representantes dessa biota. O conjunto destes três domínios, devido à sua história evolutiva e necessidade de adaptação aos mais distintos ambientes, possui ampla diversidade genética em comparação com os organismos superiores. Constituem, portanto, um grupo com imensa riqueza química e molecular, sendo a base de processos ecológicos como os ciclos biogeoquímicos (HUNTER-CEVERA, 1998).

Figura 14 – Comunidade bacteriana do solo. Árvore filogenética da vida.



Fonte: adaptado de Woese *et al.* (1990).

Dentre os três grupos filogenéticos, o mais representativo em um sistema de tratamento de efluentes é o *Bacteria* (AMANN *et al.*, 1996).

As bactérias possuem diferentes formas (esféricas, cilíndricas, espiral, etc), além de diferentes tipos de agregações (diplococo, estreptococos, estafilococos, dentre outros). De acordo com sua fonte de energia e carbono, são classificadas em Heterotróficas e Autotróficas. Possuem tamanho na ordem de microns – 0,5 à 5µm, exceto as

filamentosas que possuem média de 10 a 500 μm — e podem ser pluricelulares. Seu crescimento é baseado em dois tempos: uma fase de crescimento citoplasmático seguida de uma fase de multiplicação por divisão celular (CANCER *et al.*, 2011).

Em relação à presença das bactérias em sistemas de tratamento de efluentes, como já documentado em vários estudos, esses microorganismos são cruciais para o tratamento dos efluentes devido à sua presença nos ciclos biogeoquímicos e seu papel no fluxo de energia e transformações dos nutrientes. Skalrz *et al.* (2010) afirmam que a estabilidade e o desempenho de um sistema de tratamento dependem da diversidade e dinâmica da comunidade microbiana, ressaltando, assim, a importância desses organismos.

Em filtros plantados com macrófitas, as bactérias se aderem às superfícies de partículas sólidas — como raízes, material filtrante — formando o biofilme. Esse biofilme é responsável pela maior parte das transformações essenciais e decomposição de contaminantes nas águas residuárias.

Mesmo diante do conhecimento da importância do biofilme, pouco se sabe sobre as populações envolvidas na sua formação e atividade, sendo o assunto considerado ainda por muitos pesquisadores como uma “caixa preta” (IASUR-KRUH *et al.*, 2010).

Atualmente, existem algumas publicações sobre a microbiota. No entanto, esses trabalhos correspondem em sua maioria a estudos, por exemplo, de biocenose com microscopia eletrônica (TIETZ *et al.*, 2007); de influência dos processos microbianos no desempenho do sistema (GUTKNECHT *et al.*, 2006; FAULWETTER *et al.*, 2009); da relação das plantas com comunidade microbiana (ZHAO *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2015); da influência de variáveis ambientais (ARROYO *et al.*, 2015). Já em relação à diversidade microbiana, estudos mais completos são limitados (TRUU *et al.*, 2005; BAPTISTA *et al.*, 2008; DONG e REDDY, 2010; WEBER *et al.*, 2011; ANSOLA *et al.*, 2014).

Em pesquisas realizadas por Ibekwe *et al.* (2007) e Truu *et al.* (2009), identificou-se que o filo proteobacteria é dominante em filtros plantados com macrófitas, seguido por membros dos filos Cytophaga-Flavobacterium, Actinobacteria e Firmicutes. Resultados da biologia molecular aportam resultados precisos sobre espécie de bactérias oxidantes da amônia (AOB), tendo destaque, especificamente, dois grupos filogenéticos: *Nitrosococcus oceani* e *Nitrosococcus halophilus* dentro da classe γ -Proteobacteria; *Nitrosomonas* e *Nitrosospira spp* dentro da classe β -Proteobacteria.

Além disso, segundo estudos realizados por Ibekwe *et al.* (2003); Gorra *et al.* (2007) e Tietz *et al.* (2007) o maior percentual de seqüências encontrado foi de *Nitrospira* a partir de amostras de filtros verticais e horizontais para efluentes provenientes de diferentes fontes (laticínios, indústria, municipais). Já a espécie *Nitrosomonas spp* foi comumente encontrada em efluente doméstico de sistemas de tratamento convencionais (ROWAN *et al.*, 2003).

Em relação aos organismos desnitrificantes, estes pertencem a uma ampla gama dos domínios *Bacteria* e *Archaea*, sendo que tanto sua presença como a diversidade e abundância em filtros plantados com macrófitas são normalmente avaliadas utilizando diferentes genes funcionais: *nirK*, *nirS*, e *nosZ* — responsáveis pelas etapas do processo da desnitrificação. Grupos bacterianos envolvidos incluem: *Bacillus*, *Enterobacter*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Spirillum* (TRUU *et al.*, 2009; SAEED e SUN, 2012).

Cabe salientar que, apesar da importância dos processos microbiológicos, tais processos são dependentes de outros fatores de intervenção como: condições hidráulicas; propriedades do efluente; material filtrante; nutrientes disponíveis; plantas e dos fatores ambientais.

❖ Material filtrante

O tratamento de efluente por filtros plantados com macrófitas ocorre por meio de diferentes processos (ver Tabela 7), nos quais o material filtrante está diretamente associado a várias funções, dentre elas: (1) meio suporte para fixação das raízes e rizomas da vegetação; (2) auxiliar na distribuição e recolhimento do fluxo na entrada e saída do reator; (3) meio suporte para o crescimento microbiano - biofilme; (4) filtragem e mineralização de partículas (VYMAZAL e KRÖPFELOVÁ, 2008).

As propriedades físico-químicas do material filtrante e dos poluentes conferem ao filtro uma condição trifásica — *sólida, líquida e gasosa* —, sendo, portanto, considerados como reatores trifásicos. A capacidade de retenção — tanto da fase sólida como líquida —, os poluentes na superfície das partículas sólidas e a atividade biológica dão ao filtro um papel importante nas transformações dos poluentes. Dessa forma, tal material deve possuir características que sustentam em longo prazo boas condições de fluxo juntamente com a capacidade de adsorção de compostos inorgânicos (provenientes do nitrogênio e fósforo).

Um dos materiais comumente utilizados como meio filtrante é a areia, pois possui como característica boa condutividade hidráulica. No

entanto, não apresenta boas taxas de adsorção. A brita (cascalho) também é comumente utilizada e possui bons resultados contra a colmatação e boas taxas de adsorção. Posto isso, fica evidente que a escolha do material a ser utilizado está relacionada à finalidade do tratamento e deve ser cuidadosa (PHILIPPI e SEZERINO, 2004).

O conjunto de partículas minerais e da matéria orgânica proveniente do desenvolvimento bacteriano e da acumulação dos sólidos suspensos na superfície do filtro forma a *fase sólida*. Desta fase, a granulometria do material filtrante e a matéria orgânica são dois componentes que merecem destaque.

- Granulometria:

Refere-se à *textura* do material filtrante — distribuição numérica das partículas elementares em função da sua geometria —, descrita de acordo com seu volume e sua forma. A definição da granulometria do material a ser utilizado é dada a partir da realização de uma curva granulométrica em laboratório que representa a fração acumulada de grânulo em função do seu diâmetro, indicando, portanto, a superfície específica do material. A inclinação da curva granulométrica permite caracterizar o grau de uniformidade do tamanho das partículas, gerando um coeficiente de uniformidade (CU). Esse coeficiente constitui um índice, como o próprio nome diz, de *uniformidade* ou de *irregularidade* da distribuição do tamanho das partículas, como descrito na Equação 3.

Equação 3 - coeficiente de uniformidade (CU)

$$CU = \frac{d_{60}}{d_{10}} < 2$$

$$CU = \frac{d_{60}}{d_{10}} > 2$$

Onde:

U = coeficiente de uniformidade (adimensional); d_{60} e d_{10} em milímetros;

d_{10} : é definido como o diâmetro correspondente a 10% em peso total das partículas menores que ele;

d_{60} : diâmetro efetivo correspondente a 60% em peso total de todas as partículas menores que este valor (d_{60}) (PHILIPPI e SEZERINO, 2004).

Sendo assim, quando a relação d_{60}/d_{10} for menor que 2, a granulometria é dita como uniforme. Quando a relação for maior que 2, é dita dispersa ou irregular.

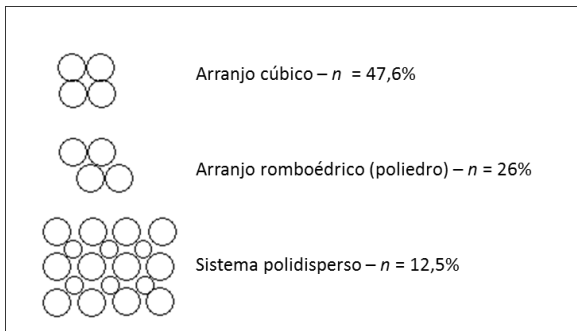
A composição granulométrica e os índices gerados pela curva definem parâmetros de projeto que irão interferir na hidrodinâmica no filtro e, conseqüentemente, na sua eficácia de tratamento.

No que diz respeito à estrutura da fase sólida, esta é quantificada de acordo com o modo de organização dos elementos constituintes e dos espaços/lacunas formados pela sua estruturação.

Esses dois fatores — *textura e estrutura* — influenciam diretamente na porosidade (n) do material filtrante e interferem na hidrodinâmica: quanto menor o tamanho dos grãos e mais polidispersos, maior a condutividade hidráulica e menor o tempo de passagem (TDH); no entanto, maior será o risco de colmatação. Ou seja, a porosidade depende da união das partículas, da sua forma e do seu arranjo, em que a presença de partículas finas num sistema polidisperso reduzirá a porosidade devido ao preenchimento dos poros entre as partículas grandes. Portanto, o arranjo da estrutura dos poros (Figura 15) influencia na hidráulica, na aeração e na colmatação do sistema (MOLLE, 2003).

Figura 15 – Arranjo e tamanho das partículas em um meio poroso.

Para um arranjo aleatório de partículas monodispersas, a porosidade média será na ordem de 36%. n : porosidade



Fonte: adaptado de Molle (2003).

Para definir a porosidade de um material filtrante (n em %), calcula-se primeiramente a razão entre o volume de vazios (V_v) e o volume total de uma amostra do material (V_t), conforme ilustrado pela Equação 4 (CAPUTO, 1996):

Equação 4 – Porosidade de um material filtrante (n em %)

$$n (\%) = \frac{V_v}{V_t} \times 100$$

Em seguida, é necessário relacionar os índices dos espaços vazios (ϵ). Para isso, usa-se a Equação 5 que permite calcular o volume de vazios sobre o volume total da amostra:

Equação 5 - Índices dos espaços vazios (ϵ)

$$n = \frac{\epsilon}{1 + \epsilon}$$

Desse modo, obtém-se como resultado a porosidade (n).

- Matéria orgânica:

O conhecimento sobre a matéria orgânica (M.O.) fornece informações sobre o desenvolvimento bacteriano e sobre a acumulação de sólidos em suspensão, o que, por sua vez, modifica as características e o comportamento funcional da fase sólida face à hidrodinâmica e o transporte de solutos. Vemos, assim, que a presença da matéria orgânica no sistema tem papel determinante na hidráulica do filtro.

Três pontos principais da interferência da M.O. no sistema são destacados por Molle (2003):

(1) O fluxo e a transferência gasosa são afetados pela redução da porosidade devido à acumulação de materiais no meio filtrante. Essa interferência pode reduzir até 90% da permeabilidade do material;

(2) O transporte de solutos é afetado em razão do aumento do volume de trocas. Um filtro jovem pode ter seu tempo de transporte de um traçador reduzido em até 5 horas se comparado a um filtro com anos de funcionamento;

(3) Em filtros de fluxo vertical alimentados com efluente bruto, a M.O. se deposita na superfície do filtro formando o húmus (resíduo da decomposição, como minerais). Essa camada de húmus promove a mineralização — que corresponde a uma modificação no pH —, o que pode melhorar os processos de adsorção e trocas iônicas, favorecendo, assim, o tratamento.

- Material filtrante utilizado em filtros de fluxo horizontal:

Para determinar que material será empregado, é preciso realizar testes em laboratório. Normalmente, em sistemas de fluxo horizontal opta-se pelo uso de areia e brita a fim de melhorar a condutividade hidráulica e otimizar a adsorção do fósforo.

A granulometria desses materiais dependerá do tipo de efluente a ser tratado. Se o filtro for para tratamento terciário, o material utilizado poderá ser mais fino uma vez que é menor a concentração de sólidos que adentram o sistema, além de aumentar a superfície para o desenvolvimento das bactérias e melhorar a adsorção de fosfatos (GRISON, 1999).

Na literatura sobre o assunto, os tamanhos das partículas variam de areia fina de 0,5 mm de diâmetro a cascalhos grosseiros de até 20 mm, com altura em torno de 0,25 – 1 m (EME, 2012).

O material a ser utilizado deve ser lavado, evitando, assim, a presença de organismos indesejáveis e de partículas que possam colmatar o sistema. Deve também ser homogêneo, evitando, assim, caminhos preferenciais de fluxo. E, por fim, deve ser disperso (não compactado), garantindo o teor de umidade homogênea e constante do material.

A colmatção em fluxo horizontal ocorre pela deposição de sólidos na região de entrada do efluente no sistema e pela acumulação de material orgânico resistente à degradação microbiana. Pode ocorrer também pela deposição química precipitável no filtro, pela carga orgânica aplicada e pelo desenvolvimento excessivo das raízes das plantas que ocupam os espaços vazios entre os poros. Como consequência desses fatores, o filtro irá entupir ao longo do tempo, criando problemas operacionais no sistema, diminuindo a condutividade hidráulica e a eficiência no tratamento (KADLEC e WALLACE, 2009).

- Material filtrante utilizado em filtros de fluxo vertical:

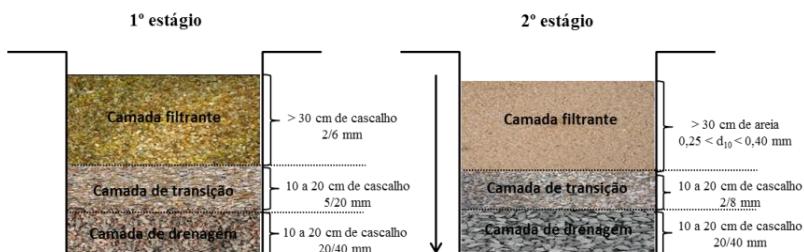
Os materiais comumente utilizados em filtros de fluxo vertical são areia e cascalho, dispostos alternadamente, geralmente com o material mais fino na camada superior do filtro. No âmbito de pesquisas experimentais, outros materiais também foram testados: cascas de coco (DAN *et al.*, 2011), escória de alto-forno (CUI *et al.*, 2010).

A altura do meio filtrante — camada de filtração e drenagem — varia de 0,25 m - 1,1 m, com média de 0,8 metros.

No que se refere ao material filtrante utilizado no Sistema Francês, este se difere de acordo com o estágio do sistema. No primeiro estágio — que recebe efluente bruto — é utilizado somente cascalho

com diferentes granulometrias, sendo mais fino na superfície e crescente ao longo da profundidade do filtro. Para o segundo estágio — que recebe efluente proveniente do primeiro estágio previamente tratado — pode ser usada areia fina lavada na superfície e cascalho nas duas camadas subseqüentes (MOLLE *et al.*, 2005). A granulometria dos materiais, bem como a altura de cada camada, pode ser visualizada na Figura 16.

Figura 16– Materiais recomendados para o Sistema Francês em cada estágio

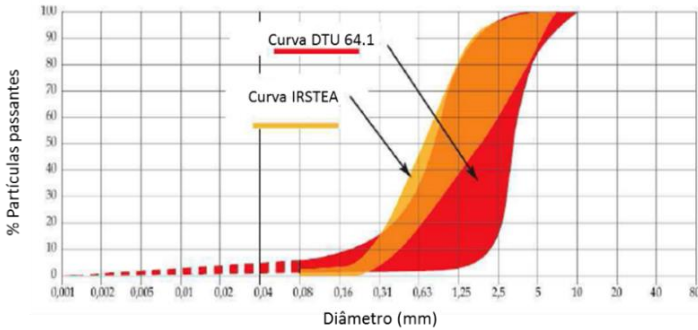


Fonte: autor.

Vale ressaltar que pelas mesmas razões já destacadas nos filtros de fluxo horizontal, nos filtros de fluxo vertical também é necessário um estudo granulométrico do material a ser utilizado. Pesquisas realizadas pelo IRSTEA, para o segundo estágio, aprimoraram a curva granulométrica — DTU – 64-1 — (regulamentação francesa para filtros de areia), o que permite validar ou não o material a ser empregado (Figura 17).

Além disso, foram desenvolvidos pelo IRSTEA alguns parâmetros em relação à areia, visto que esse tipo de material é mais susceptível a colmatção. A areia deve possuir as seguintes características: $0,25 < d_{10} < 0,40$ mm; $3 < CU < 6$; Teor de partículas finas (0,08 mm) $< 2,05 - 3\%$ e; Teor de calcário $< 4\%$ em massa - CaCO_3 .

Figura 17 – Curva granulométrica para validação do material filtrante



Fonte: Fonte: grupo de estudos IRSTEA - *étude DTU 64-1* (1998).

As características do material filtrante mencionadas nos parágrafos anteriores — *granulometria, porosidade, matéria orgânica, características estruturais e teor de água* — influenciam diretamente na permeabilidade, que é provocada por forças de gravidade e capilaridade. No entanto, o comportamento global dos filtros é um sistema complexo, ainda considerado como uma “caixa preta”, o que justifica maiores avanços nas pesquisas a fim de esclarecer a hidráulica do filtro e as interações biológicas que nele se dão.

Como a hidráulica pode ser diretamente influenciada pelo material filtrante utilizado — matriz porosa de material mineral e orgânico — o estudo de sua dinâmica pode ser considerado tarefa difícil a realizar. Estudos mais recentes passaram a utilizar a modelagem com alguns *softwares*, permitindo, assim, aprofundar as pesquisas sobre cada nível e variantes do processo (Molle, 2003; Langergraber e Šimůnek, 2006; Arias, *et al.*, 2014; Morvannou *et al.*, 2013).

O uso do *software* como o *Hidrus Wetland Module®* (LANGERGRABER e ŠIMŮNEK, 2006) vem contribuindo fortemente para o estudo do comportamento hidráulico, permitindo a identificação rápida do comportamento operacional e, por conseguinte, possibilitando a identificação de falhas operacionais. Molle *et al.* (2008) destacam que a eficiência do tratamento pode ser melhorada uma vez que o comportamento hidráulico seja melhor compreendido. Seguindo tal linha de pensamento, vários estudos relacionam o comportamento hidráulico e a eficiência do sistema (Molle *et al.*, 2006; Morvannou *et al.*, 2013; Weerakoon *et al.*, 2013; Boog *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2014; Silveira *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015; Morvannou *et al.*, 2015), nos

quais os resultados apontam para a importância do estudo hidráulico e sua interferência no tratamento.

A colmatação é outro fator que está diretamente relacionado com o material filtrante e a hidráulica do sistema. É definida como o entupimento do meio poroso, reduzindo, desse modo, a capacidade de infiltração e promovendo acúmulo de água na superfície, sendo, portanto, considerada como um grande problema operacional. Equilibrar a carga hidráulica aplicada — carga orgânica, alimentação e fluxo — e a escolha adequada do material filtrante a ser utilizado em um sistema de FPM é de grande importância pois estes fatores influenciam no processo de colmatação e, conseqüentemente, na eficiência do tratamento.

Em FPM de fluxo vertical, por exemplo, o problema da colmatação está diretamente relacionado com o transporte de oxigênio no maciço filtrante. Os processos de degradação mais importantes — degradação da matéria orgânica e nitrificação — requerem condições aeróbias e a colmatação pode levar a condições anaeróbias, ocorrendo, dessa forma, uma diminuição do desempenho do sistema.

2.1.4.2 Remoção dos poluentes

Os elementos atuantes – vegetais, micro-organismos e material filtrante –, são os grandes responsáveis pela remoção dos poluentes em FPM, tornando-os eficazes no tratamento da DBO (Demanda bioquímica de oxigênio), SST (Sólidos suspensos totais) e nutrientes como o N (nitrogênio) e P (fósforo).

Não menos importantes são os processos para a remoção de metais e agentes patogênicos. Dentre os processos de remoção, será dado destaque à remoção da matéria orgânica, à remoção de sólidos e à remoção/transformação do nitrogênio.

❖ Remoção da matéria orgânica

A remoção da matéria orgânica (M.O.) ocorre basicamente por meio da degradação por bactérias heterotróficas aeróbias ou anaeróbias, de acordo com os aceptores de elétrons disponíveis no meio e sua fonte de energia, ou seja, de acordo com a quantidade de carbono disponível.

Em filtros plantados com macrófitas, muito dos processos ocorridos possuem ligação com os compostos de carbono, que são provenientes de fontes externas (a partir de águas residuárias, por exemplo) ou são produzidos a partir de processos internos de decomposição.

Experimentalmente, a taxa de remoção da M.O. pode ser medida utilizando a Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) e a Demanda Química de Oxigênio (DQO). A DBO consiste em diferentes técnicas analíticas que são utilizadas para medir a quantidade de material orgânico disponível nas águas residuárias. Em resumo, a DBO é a resposta do consumo de oxigênio pelos micro-organismos na oxidação (perda de elétrons) da matéria orgânica (VON SPERLING, 1996).

Em relação à DQO, é um teste que mede a quantidade de produto químico oxidante, o dicromato de potássio, necessário para oxidar a matéria orgânica. Ou seja, ao contrário da DBO, que corresponde a um processo de oxidação bioquímica da matéria orgânica realizada por micro-organismos, a DQO corresponde a uma oxidação química da matéria orgânica.

Normalmente, o valor da DQO é superior ao da DBO devido ao oxidante possuir uma gama maior de detecção de compostos e devido à maior presença de materiais húmicos, o que por sua vez conduz maiores valores de DQO (a proporção descrita por Kadlec e Wallace (2009) é de aproximadamente $0,05 \text{ — } DBO_5 = 5 \text{ mg/L: DQO} = 100 \text{ mg/L}$).

Em relação ao Carbono Orgânico Total (COT), este é medido por oxidação química, seguido da análise de CO_2 . Kadlec e Wallace (2009) descrevem a relação entre DBO_5 : COT de aproximadamente $0,2 \text{ (} DBO_5 = 5 \text{ mg/L: COT} = 25 \text{ mg/L)}$.

Dentre as diversas formas do carbono em filtros plantados com macrófitas, o carbono orgânico é o mais representativo. Alguns autores citam a ordem de 58% de teor de carbono na matéria orgânica (KADLEC e WALLACE, 2009).

No que se refere à transformação do carbono conduzido pelas bactérias, conforme citado no primeiro parágrafo deste tópico, KADLEC e WALLACE (2009) relatam como predominante os seguintes processos: aeróbios, anaeróbios facultativos e anaeróbios obrigatórios, em que as várias reações químicas envolvidas no tratamento e em suas diferentes profundidades do filtro podem ser visualizadas na Figura 18.

Estudos recentes abordam uma importante questão no que diz respeito ao acúmulo da matéria orgânica em filtros plantados com macrófitas e sua interferência no comportamento hidráulico e biológico do sistema.

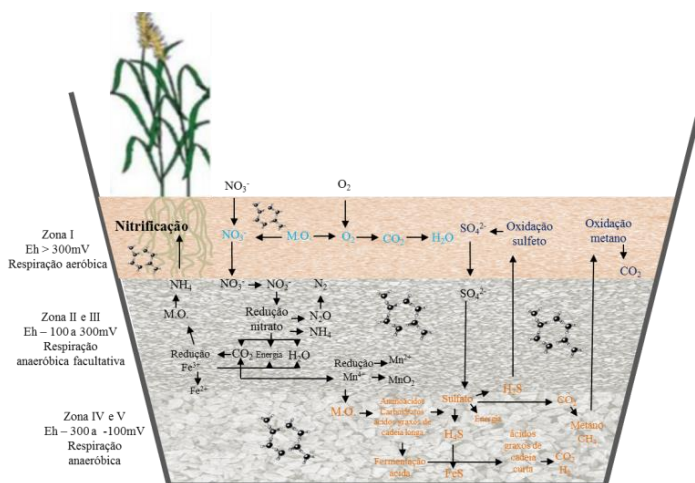
Em FPM — Sistema Francês — por apresentar a característica de aplicação de efluente bruto no primeiro estágio de tratamento, forma-se em sua superfície uma camada de lodo de aproximadamente 2,5 cm/ano. Esse acúmulo de M.O. é retratado em alguns estudos como sendo um

componente importante para a eficiência do tratamento (MOLLE, 2014). No entanto, algumas modificações tornaram-se necessárias a fim de evitar o processo de colmatação como, por exemplo, a substituição da areia por cascalho (2/6 mm).

Segundo Chazarenc e Merlin (2005), a M.O. acumulada parece desempenhar papel importante tanto na retenção de água (aumentando o tempo de percolação em 5 vezes) quanto no perfil biológico do sistema (podendo aumentar a diversidade microbiana), contrapondo o que foi relatado pela literatura em anos anteriores. A matéria orgânica acumulada em Sistema Francês indica uma melhora na eficiência do tratamento, sem haver entupimento em comparação com sistemas que utilizam areia na superfície.

A eficiência de remoção é condicionada a fatores como: retenção e mineralização da matéria acumulada sobre a camada filtrante; grande granulometria do meio suporte; ciclo de operação do sistema com alternância de alimentação — assegurando ao filtro um período de descanso e promovendo a digestão e desidratação do lodo.

Figura 18- Caminhos da decomposição de carbono orgânico e do nitrogênio em FPM em diferentes condições redox.



Fonte: adaptado de Kadlec e Wallace (2009).

Estudo recente realizado por Molle (2014) afirma a importância do acúmulo da matéria orgânica na camada de filtração. No entanto,

ressalta também a necessidade de uma melhor compreensão do papel desta camada de depósito em FPM – Sistema Francês. Neste mesmo estudo, Molle afirma que a camada orgânica é um elemento-chave que pode proporcionar um melhor desempenho ou limitar alguns processos do sistema em decorrência de algumas contribuições, tais como:

- O aumento da eficiência de filtração e, por conseguinte, a remoção de sólidos;
- Uma melhora no tempo de retenção da água, e o desempenho em condições aeróbias;
- Redução da permeabilidade do filtro, promovendo uma melhor distribuição do efluente sobre a superfície, com fluxo de volume constante e em menor velocidade;
- Favorecimento da adsorção da amônia na M.O. a ser nitrificada devido aos períodos de alimentação e repouso;
- Local de maior atividade biológica.

Apesar das contribuições supracitadas, vale ressaltar que as cargas hidráulicas e orgânicas, bem como ciclo de operação (período de alimentação e repouso) devem ser controlados. Caso contrário, o processo de formação desta camada apresentará problemas, tais como: colmatação; limitação de transferência de oxigênio (convecção e difusão) e diminuição da mineralização.

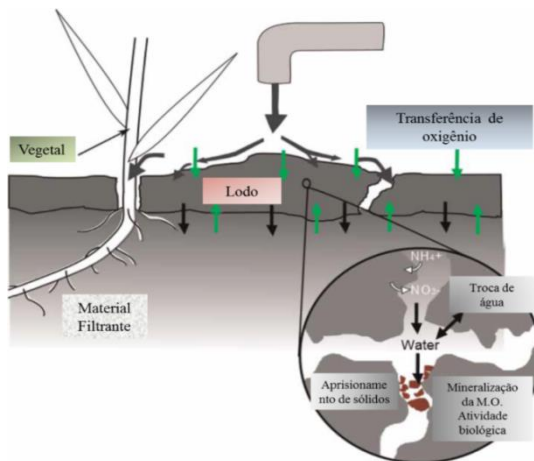
A Figura 19 a seguir apresenta a interdependência dos processos que ocorrem na formação da camada de depósito e a importância do equilíbrio desses processos para o bom funcionamento do sistema. Sabe-se que a colmatação no Sistema Francês é pertinente até o momento que esta não afete o equilíbrio e, por consequência, o desempenho do filtro. Portanto, um conjunto de fatores como design, operação, sistema de alimentação e condições externas (ambientais) deve ser observado na sua construção e implementação.

Em relação ao nitrogênio, o acúmulo da matéria orgânica favorece sua remoção, uma vez que a nitrificação direta é baixa no primeiro estágio, portanto, a amônia é absorvida na M.O., além de ser nitrificada principalmente entre as bateladas e durante o período de repouso (MOLLE, 2014).

Assim sendo, pode-se afirmar que a camada de lodo depositado é um componente-chave que influencia no desempenho obtido pelo Sistema Francês, uma vez que para tratar água e lodo simultaneamente é preciso mineralizar a M.O. — para evitar a colmatação e também permitir que esta camada drene e transfira o oxigênio corretamente. Além disso, a atividade biológica depende da mineralização, bem como da alternância do ciclo de alimentação. Ou seja, o comportamento

hidráulico, a transferência de oxigênio e a atividade biológica estão interligados, tornando o estudo da camada de M.O. essencial para sistemas que operam com efluente bruto (MOLLE, 2014).

Figura 19– Processos implicados na camada de matéria orgânica depositada.



Fonte: adaptado de Molle (2014).

❖ Remoção de sólidos

Os sólidos constituem uma fração dos contaminantes presentes na água residuária, sendo classificados de acordo com: tamanho e estado (em suspensão ou dissolvidos); características químicas (voláteis – fração que representa a matéria orgânica - ou fixos – fração representativa da matéria inorgânica ou mineral) e, decantabilidade (sedimentáveis ou não sedimentáveis) (VON SPERLING, 1996).

A remoção de sólidos suspensos totais (SST) é uma das principais características do tratamento por filtros plantados com macrófitas. Independente de qual configuração a ser aplicada, a ordem de eficiência média é acima de 80% de remoção e, 95% para o Sistema Francês. Esse resultado se dá devido a um conjunto de processos internos como filtração, sedimentação e degradação microbiana (aeróbia em filtros de fluxo vertical e anóxica ou anaeróbia em fluxo horizontal).

Em filtros de fluxo horizontal, o acúmulo dos sólidos ocorre nos primeiros centímetros do filtro, o que, por sua vez, pode gerar a colmatação, que pode ser evitada através de decantação primária. Já em filtros de fluxo vertical, os SST acumulam-se na superfície do filtro,

formando a camada de depósito de matéria orgânica. Essa camada, pode gerenciar a infiltração do efluente, auxiliando no funcionamento do filtro.

Os SST que adentram em um sistema de FPM podem exibir diferentes características, de acordo com sua origem. Águas residuárias, por exemplo, são constituídas normalmente por sólidos orgânicos, enquanto que águas agrícolas e de escoamento podem conter além de orgânicos, minerais (KADLEC e WALLACE, 2009). No entanto, sólidos que saem do sistema são em grande parte provenientes de partículas geradas no interior do filtro e carregadas pelo fluxo d'água. Este processo leva a uma concentração de saída de cerca de 10 a 20 mg/L, independente da concentração na entrada (GRISON, 1999).

❖ Remoção de Nutrientes

Apesar da boa eficiência dos FPM para remoção da matéria orgânica e dos sólidos suspensos, a remoção dos nutrientes ainda não é considerada satisfatória. Os nutrientes – principalmente o nitrogênio (N) e fósforo (P) – são essenciais para o ecossistema. No entanto, o excesso destes em águas residuárias, por exemplo, acarretam em sérios problemas ambientais, pois os caracterizam como poluentes, o que justifica, portanto, seu tratamento.

A remoção se dá basicamente através dos processos de sedimentação, adsorção, acúmulo de matéria orgânica, assimilação microbiana, nitrificação e desnitrificação (BRIX, 1994).

A remoção do fósforo por FPM é considerada muito baixa, a não ser que seja utilizado um meio suporte com alta taxa de sorção, como a apatita ($13,9 \text{ g P.kg}^{-1}$) (material recomendado para remoção do fósforo na França) (MOLLE *et al.*, 2011) e/ou um tratamento primário a montante com adição de químicos que irão reagir com o fósforo, promovendo sua redução.

Na sequência, dar-se-á ênfase ao elemento químico nitrogênio. Para maiores informações sobre a remoção de fósforo, é possível consultar os trabalhos de IWA (2000); Molle (2003); Kadlec e Wallace (2009); e Kim (2014).

2.1.4.3 Nitrogênio

O elemento químico nitrogênio (N) possui um ciclo biogeoquímico bastante complexo, com múltiplas transformações bióticas e abióticas que implicam em sete estados de valência (+5 a -3). Esse elemento é de extrema importância nas ciências biológicas por ser

um constituinte básico das células vivas e necessário para a síntese de macromoléculas essenciais, como os ácidos nucléicos e as proteínas (CERVANTES, 2009).

O nitrogênio encontra-se no solo sob duas formas — compostos orgânicos e inorgânicos —, sendo a forma orgânica a mais representativa. Esta forma é encontrada em aminoácidos, ureia (forma da amônia descartada por mamíferos quando aminoácidos são usados para a produção de energia), ácido úrico (produzido por aves e insetos) e purina e pirimidina (formação do DNA). No entanto, apesar da sua importância, quando encontrados em excesso em águas residuárias, esses compostos provocam sérios problemas ambientais como, por exemplo, a eutrofização.

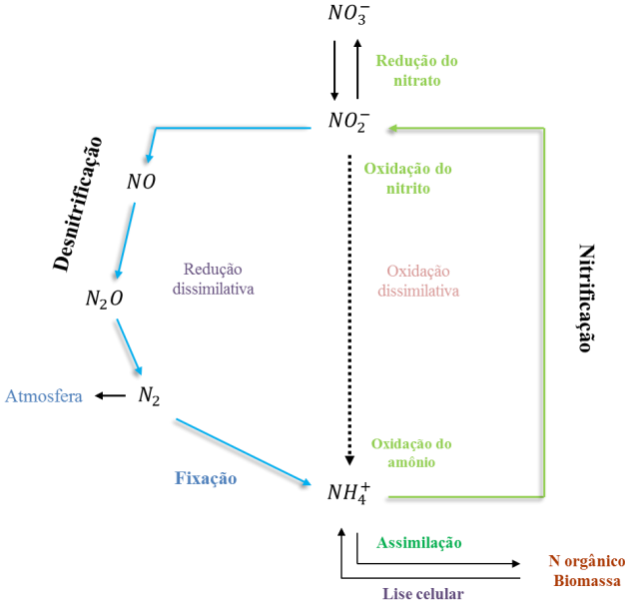
No que diz respeito à transformação do nitrogênio do meio ambiente, há uma série de reações bioquímicas envolvidas, tendo como produtos finais dessas reações compostos inorgânicos, sendo os mais representativos: amônio (NH_4^+), nitrito (NO_2^-), nitrato (NO_3^-), nitrogênio gasoso (N_2) e óxido nitroso (N_2O).

Por muito tempo acreditou-se que a rota – liberação do nitrogênio fixado para a atmosfera – fosse conduzida por dois caminhos: assimilação e dissimilação. Na assimilação o nitrato é reduzido pela síntese da biomassa. Na dissimilação, a redução ocorre por duas vias: 1) desnitrificação – redução do nitrato (NO_3^-) via redução do nitrito (NO_2^-), posteriormente redução para óxido nítrico (NO) e óxido nitroso (N_2O), como parte do metabolismo respiratório para geração de energia e consequente produto reduzido lançado como N_2 ; e, 2) amonificação ou redução do nitrato dissimilativo para amônio (CERVANTES, 2009). Tal processo por ser visualizado na Figura 20.

Entretanto, recentemente foram descobertas novas rotas de transformação do nitrogênio para estudar a eliminação deste nutriente em águas residuárias. Como exemplos, o processo de oxidação anaeróbia do amônio – ANAMMOX – para o nitrogênio molecular usando o nitrito como acceptor de elétron (STROUS *et al.*, 1999); o processo de reator único de alta atividade de remoção do amônio com o nitrito – SHARON –, desenvolvido para a remoção de amônio por nitrificação parcial e subsequente desnitrificação do nitrito (JETTEN *et al.*, 2002); a remoção do nitrogênio com o processo do nitrito, envolvendo a união da nitrificação parcial e o processo ANAMMOX com aeração intermitente – CANON – (SCHMIDT *et al.*, 2003, CERVANTES, 2009); a oxidação desnitrificante do amônio

(DIAMOX), dentre outros. Todos estes processos têm sido demonstrados em sistemas convencionais de tratamento.

Figura 20- Ciclo clássico do Nitrogênio.



Fonte: adaptado de Cervantes (2009).

No que se refere ao processo ANAMMOX, o qual é bastante estudado atualmente, cabe aqui salientar que para manter as bactérias ANAMMOX em quantidade e ativas é necessário que as condições – temperatura, potencial redox, tempo de detenção hidráulico – sejam bem determinados, o que a priori é algo difícil de garantir em ambientes complexos como os filtros plantados com macrófitas (DONG e SUN, 2007).

A remoção do nitrogênio em filtros plantados com macrófitas tem como reações predominantes a amonificação, nitrificação, desnitrificação, assimilação da biomassa, absorção pelas plantas, volatilização da amônia, adsorção, além das novas rotas, como: ANAMMOX, parcial nitrificação-desnitrificação e CANON (SAEED e SUN, 2012).

Os tópicos a seguir fornecem uma visão geral de alguns processos que promovem a transformação do nitrogênio em filtros plantados com macrófitas.

❖ Amonificação

Águas residuárias são ricas em compostos de nitrogênio orgânico, sendo, portanto, a amonificação a primeira etapa do processo de transformação do N em filtros plantados com macrófitas. Nesta etapa, ocorre liberação de energia por um processo bioquímico complexo onde os aminoácidos são submetidos à desaminação – liberação do grupo amina e produção de amônia (NH_3).

Cabe salientar que o nitrogênio orgânico pode ser convertido além da amônia (NH_3) em amônio (NH_4^+), dependendo da faixa de pH. Em pH próximo da neutralidade, prevalece o surgimento de amônio e dióxido de carbono, bem como íon hidroxila que pode afetar a acidez do meio. O intervalo de pH ótimo para o processo de amonificação é de 6,5 a 8,5. Além do pH, a taxa de amonificação é influenciada pela temperatura, pela relação carbono/nitrogênio (C/N), pelos nutrientes disponíveis no sistema, e das condições do solo como textura e estrutura (KADLEC e KNIGHT, 1996; IWA, 2000).

Em sistema FPM, tal processo é mais rápido na camada superior do filtro sob condição de oxigenação aeróbia, diminuindo progressivamente nas camadas inferiores devido ao estado de oxigenação anaeróbio facultativo ou obrigatório.

❖ Nitrificação

A nitrificação é a segunda etapa da transformação do nitrogênio. Dentre os compostos orgânicos presentes nas águas residuárias, o N-NH_4^+ é predominante, sendo o processo de nitrificação o primeiro passo para transformar a forma existente.

Esta etapa pode ser definida como a oxidação biológica da amônia e conduzida por dois estágios (IWA, 2009):

i) oxidação da amônia/amônio: onde o NH_4^+ , na presença de oxigênio, é convertido em nitrito (NO_2^-) por bactérias procarióticas quimiolitotróficas: bactérias que oxidam o amônio (AOB – do inglês *ammonia-oxidizing bacteria*), arqueas (AOA – *ammonia-oxidizing archaea*).

ii) oxidação do nitrito: onde este em seguida é convertido em nitrato (NO_3^-) por bactérias e as bactérias oxidantes do nitrito (NOB – *nitrite-oxidizing bacteria*).

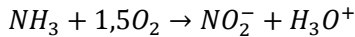
i) Oxidação da amônia

Esta é executada por bactérias oxidantes de amônia (AOB), principalmente as do gênero *Nitrosomonas*, filo Proteobacteria, estritamente aeróbias, que são inteiramente dependentes da oxidação da amônia para a geração de energia e crescimento (IWA, 2000). Mais comumente encontradas são: *N. europaea*, *N. eutropha*, *N. mobilis*, e *N. oligotropha* (IWA, 2009).

A oxidação é feita em duas reações, no qual a primeira reação é catalisada pela bactéria amônia mono-oxigenase (amoA), sendo a segunda, por uma oxidoreductase de hidroxilamina (HAO). NH_3 é utilizado como um doador de elétrons pela AOB, sendo o receptor final o oxigênio. Dois elétrons produzidos na segunda reação são usados para compensar o elétron acrescido na primeira reação, gerando uma força matriz que é a fonte de produção de ATP.

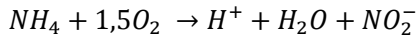
A Equação 6 representa, por fim, a transformação da amônia para nitrito:

Equação 6 – Oxidação da amônia



Essa via de transformação pode ser expressa também pela Equação 7, proposta por Reddy e Patrick (1984), em presença de amônio:

Equação 7 – Oxidação do amônio

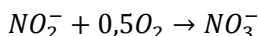


A entalpia (ΔG°) para a oxidação da amônia é $-275 \text{ kJ.mole}^{-1}$. Já o consumo de oxigênio é na ordem de 1,5 moles O_2 por moles de NH_3 , sendo 3,43 g de oxigênio por g de nitrogênio amoniacal.

ii) Oxidação do nitrito

O nitrito é oxidado a nitrato pelas bactérias *oxidantes de nitrito* (NOB) - principalmente do gênero *Nitrospira* – em uma única etapa, descrita pela Equação 8:

Equação 8 – Oxidação do nitrito



Essa reação é catalisada pelo grupo oxidoreductase de nitrito (NOR), sendo o nitrito o doador de elétrons para essas bactérias, enquanto que o oxigênio é o receptor final. A entalpia (ΔG°) para essa oxidação é de -74 kJ.mole^{-1} . Esse valor inferior tem como consequência o baixo rendimento no crescimento celular bacteriano se comparado com as bactérias AOB (SAEED e SUN, 2012).

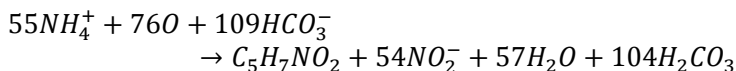
Assim, obtém-se a reação global da nitrificação, que é dada pela Equação 9:

Equação 9 - Reação global da nitrificação



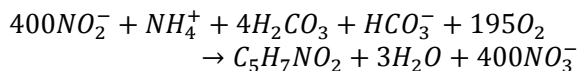
Tendo havido assimilação do nitrogênio pelas bactérias para sua própria síntese celular, a primeira etapa da nitrificação — biorreação — pode ser descrita pela Equação 10 (EPA, 1993):

Equação 10 – 1ª etapa da nitrificação



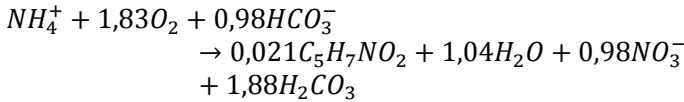
Sendo a segunda etapa é descrita pela Equação 11:

Equação 11 – 2ª etapa da nitrificação



Essas duas reações, por sua vez, podem ser combinadas para determinar a oxidação total da amônia e a síntese da biomassa celular representada na Equação 12 (Kadlec e Knight, 1996; Ge *et al.*, 2015):

Equação 12 - Oxidação total da amônia e síntese da biomassa celular



Ge *et al.* (2015) afirmam que nem todo o NH_4^+ é nitrificado, apesar desta molécula ser a fonte de energia para nitrificantes. Uma parte do NH_4^+ é utilizado para o crescimento de células, como fonte de nitrogênio em que o dióxido de carbono serve como fonte de carbono.

Saeed e Sun (2012) destacam várias conclusões que podem ser tiradas a partir da equação acima no que diz respeito às condições ambientais necessárias para a nitrificação, tais como:

- 1 mol de nitrogênio amoniacal produz 0,021 mol de biomassa microbiana (0,17g do peso seco da biomassa por grama de N amoniacal consumido) e, 3,22 g e 1,11 g de O_2 consumido por grama de NH_4^+ e NO_2^- oxidado, respectivamente. - 7,14 g de alcalinidade (CaCO_3) é consumido por cada g N- NH_4^+ oxidado, e 1,98 mol para H^+ é liberado para cada mole de N amoniacal consumido (Kadlec e Knight, 1996).

Segundo Cooper *et al.* (1996), as bactérias nitrificantes requerem aproximadamente 4,3mg O_2 por mg N- NH_4 oxidado. Portanto, quanto maior a concentração de amônia a ser oxidada, maior será a requisição de oxigênio.

Em relação à temperatura, diferentes opiniões compõem a literatura. Segundo IWA (2000), a temperatura ótima para a nitrificação em culturas puras varia de 25 a 35 °C e, no solo, de 30 a 40 °C. Para Metcalf e Eddy (1991), a temperatura ideal para a ocorrência da nitrificação em FPM está entre 20 e 25 °C. Philippi e Sezerino (2004) destacam que as baixas temperaturas afetam mais as bactérias formadoras de nitratos do que as formadoras de nitrito e, assim, o aumento do nitrito tende a prevalecer, o que, conseqüentemente, pode ser tóxico a outros organismos presentes. Cooper *et al.* (1996) destacam que a temperatura mínima para o crescimento de *Nitrosomonas* e *Nitrobacter* é 5 e 4 °C, respectivamente.

❖ Bactérias que medeiam o processo da nitrificação

As oxidantes de amônia (AOB) compõem uma diversidade microbiana encontrada em ambientes onde a amônia está disponível como, o solo, água doces e ambientes marinhos. São distinguidas pela morfologia de suas células e paredes celulares gram-negativas, locomovendo se por meio de flagelos.

Após o primeiro isolamento das AOB da década de 80, cinco gêneros de AOB em dois grupos distintos filogeneticamente – β e γ – subclasses do filo Proteobacteria foram relatados em vários trabalhos como de Purkhold *et al.* (2000); Koops e Pommerening-Roser (2001); Ge *et al.* (2015).

Com base nas suas sequências de gene 16S rRNA, são representantes: 1) betaproteobacteria (beta-AOB) principalmente gêneros *Nitrosomonas* (incluindo *Nitrosococcus mobilis*) e *Nitrospira* (incluindo *Nitrosolobus* e *Nitrosovibrio*); 2) gammaproteobacteria (gama-AOB), incluindo as espécies *Nitrosococcus* e *Nitrosococcus halophilus* (JUNIER *et al.*, 2010). Segundo Ge *et al.* (2015) até o momento um total de 25 espécies de AOB foram cultivadas a partir de várias amostras ambientais, sendo a *Nitrosomonas* e *Nitrospira* as mais extensivamente estudadas.

Em relação as bactérias oxidantes de nitrito (NOB), estas incluem os gêneros *Nitrobacter* e *Nitrococcus*, ambas constituintes da classe α -proteobacteria e, a *Nitrospina gracilis* pertencente a δ -proteobactéria, *Nitrococcus mobilis* se encontram no grupo das γ -proteobactéria e as espécies do gênero *Nitrospira* pertencem ao filo Nitrospira (SCHMIDELL *et al.*, 2007).

Segundo Daims *et al.* (2001) a *Nitrospira* dentre as NOB é apontada como a mais dominante em sistemas de tratamento de águas residuárias. Essa predominância pode estar associada a algumas estratégias de sobrevivência, como por exemplo, o seu baixo K_s , o qual faz com que elas sejam bactérias K -estratégicas, ou seja, bem adaptadas a baixas concentrações de nitrito e oxigênio. Por outro lado, a *Nitrobacter* – anteriormente considerada mais dominante em sistemas de águas residuárias - possui um rápido crescimento, sendo considerada r -estratégicas com baixa afinidade para nitrito e oxigênio, o que dá uma vantagem competitiva em ambientes com altas concentrações de substrato. A concentração de nitrato em reatores geralmente é baixa, gerando uma competição entre *Nitrobacter* e *Nitrospira* (CERVANTES, 2009).

Estudos como os de Vymazal (2007) reporta, além da nitrificação autotrófica, a nitrificação heterotrófica conduzida por grupos que produzem o $N-NO_3^-$, tais como: *Actinomycetes*, *Arthrobacter globiformis*, *Aerobacter aerogenes*, *Algae*, *Bacillus*, *Fungi*, *Mycobacterium phlei*, *Streptomyces griseus*, *Thiosphaera* e *Pseudomonas*. No entanto, a taxa de nitrificação realizada pelas *Nitrosomonas* e *Nitrobacter* é substancialmente mais elevada (> 1000 –

10.000 vezes) quando comparada com a de outras espécies e gêneros (SAEED e SUN, 2012).

❖ Desnitrificação

A desnitrificação biológica é o principal mecanismo para a remoção total do nitrogênio em filtros plantados com macrófitas e é definida como um processo no qual micro-organismos – bactérias facultativas – reduzem o nitrato a gás nitrogênio sob condições anóxicas e anaeróbias.

O processo da desnitrificação pode ser descrito como uma organização modular na qual cada reação é catalisada por uma enzima específica. Essas enzimas (Tabela 9) correspondem às *redutases*, que são sintetizadas quando as condições ambientais se tornam anóxicas (CERVANTES, 2009).

Tabela 9 – Enzimas que participam do processo da desnitrificação e sua localização

Enzima	Localização celular	Reação
Nitrato redutase (<i>Nar</i>)	membrana celular e espaço periplasmático	$NO_3^- + UQH_2 \rightarrow NO_2^- + UQ + H_2O$
Nitrito redutase (<i>Nir</i>)	espaço periplasmático	$NO_2^- + Cu^{1+} + 2H^+ \rightarrow NO + H_2O + Cu^{2+}$ $NO_2^- + C^+ + 2H^+ \rightarrow NO + H_2O + C^{3+}$
Óxido nítrico redutase (<i>Nor</i>)	membrana celular	$2NO + 2C^{2+} + 2H^+ \rightarrow N_2O + H_2O + 2C^{3+}$
Oxido nitroso redutase (<i>Nos</i>)	espaço periplasmático	$N_2O + 2C^{2+} + 2H^+ \rightarrow N_2 + H_2O + 2C^{3+}$

UQH₂: Coenzima Q10, UQ: coenzima; C²⁺: citocromo reduzido; C³⁺: citocromo oxidado

Fonte: adaptada de Cervantes (2009).

O processo bioquímico da desnitrificação, em geral, ocorre de acordo com quatro etapas sucessivas (BURVINGT e HEDUIT, 1987), conforme ilustra a Equação 13:

Equação 13 - Processo bioquímico da desnitrificação

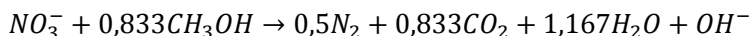


Sendo:

- i*) Redução do nitrato para nitrito pela enzima nitrato redutase (*Nar*) acopladas tanto na membrana celular quanto no espaço periplasmático;
- ii*) Redução do nitrito para óxido nítrico, mediado pela enzima nitrito redutase (*Nir*);
- iii*) Em seguida, redução do óxido nítrico para óxido nitroso pela enzima óxido nítrico redutase (*Nor*), à qual está localizada na membrana citoplasmática;
- iv*) Por fim, o óxido nitroso é reduzido a gás nitrogênio pela enzima óxido nitroso redutase (*Nos*).

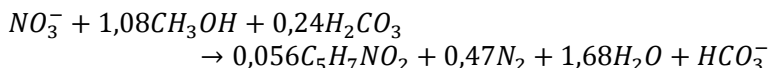
As formas gasosas NO e N₂O podem ser liberadas durante a desnitrificação, mas o principal produto é o N₂. A estequiometria da reação da desnitrificação pode ser expressa de acordo com a Equação 14 descrita pela EPA (1993):

Equação 14 - Estequiometria da reação da desnitrificação



Ou então conforme a Equação 15, descrita por Kadlec e Knight (1996):

Equação 15 - Estequiometria da reação da desnitrificação



Observando a Equação 15 é possível perceber a formação de alcalinidade — 3 g de bicarbonato (CaCO₃) é produzido por g de N-NO₃ reduzido. Além disso, mesmo com o potencial de utilizar nitratos como receptores de elétrons, o oxigênio é o mais utilizado em águas residuárias. Com base nisso, a concentração de oxigênio dissolvido

(OD) deve ser mantida entre $< 0,3$ e $0,5$ mg/L para que ocorra a redução (SAEED e SUN, 2012).

No que se refere às bactérias que medeiam as reações da desnitrificação, estas incluem uma variedade de bactérias facultativas. Além das bactérias, a capacidade de desnitrificar também foi associada a alguns representantes do domínio *Archaea* e do Reino Fungi.

Dentre os inúmeros gêneros de bactérias capazes de reduzir nitrato, os mais comuns estão descritos na Tabela 10. Normalmente, as bactérias desnitrificantes são encontradas em solos, em água doce, solos de zonas industriais, lodo de mar, florestas primárias, dentre outros (CERVANTES, 2009).

Tabela 10 - Alguns gêneros microbianos que efetuam o processo da desnitrificação

Gênero	Morfologia	Características fisiológicas
<i>Alcaligenes</i>	Bastonete	Organotróficas e litotróficas
<i>Pseudomonas</i>	Bastonete	Organotróficas e litotróficas
<i>Paracoccus</i>	Cocos	Organotróficas e litotróficas
<i>Thiobacillus</i>	Bastonete	Litotróficas
<i>Rhodopseudomonas</i>	Bastonete	Fototróficas
<i>Bacillus</i>	Bastonete	Fermentativas
<i>Rhizobium</i>	Bastonete	Organotróficas fixadoras de N ₂
<i>Neisseria</i>	Cocos	Organotróficas patogênicas
<i>Propionibacterium</i>	Bastonete	Organotróficas

Fonte: adaptada de Cervantes (2009).

Assim como para a nitrificação, a literatura (COOPER *et al.*, 1996; IWA, 2000) recomenda valores ótimos para alguns fatores que influenciam no processo de desnitrificação, a saber:

- Oxigênio dissolvido: a presença de OD suprime a enzima necessária para a desnitrificação. Portanto, trata-se de um parâmetro crítico que deve ser controlado;

- pH: o pH ótimo varia entre 7,0 e 8,2 para vários micro-organismos desnitrificantes. Estudos com *Pseudomonas denitrificans* apontam que um pH ótimo para crescimento e redução de nitrato e nitrito deve estar entre 7,2 e 7,6. Para cultura de *Comamonas denitrificans*, o pH favorável é em torno de 7,5. Entretanto, a produção de alcalinidade durante a desnitrificação pode resultar num aumento de pH;

- Temperatura: os micro-organismos são capazes de crescer numa vasta gama de temperaturas 4 – 45 °C, podendo ter um processo lento em temperatura inferior a 5 °C. *Pseudomonas stutzeri* e *Comamonas denitrificans* preferem temperaturas entre 20 e 37°C. Em geral, os micro-organismos desnitrificantes preferem a faixa entre 30 e 35°C.

Outro fator indispensável para que a desnitrificação ocorra é a disponibilidade de carbono orgânico, usado como fonte de energia pelas bactérias desnitrificantes. Esta fonte de carbono precisa ser suficiente nos efluentes ou estar contida no biofilme aderido ao material filtrante. Caso isso não ocorra, fontes externas podem ser adicionadas, como metanol, etanol ou ácido acético (PHILIPPI e SEZERINO, 2004).

❖ Assimilação pelas plantas

Como mencionado anteriormente, as macrófitas desempenham um papel fundamental no sistema de FPM. Vários estudos indicam que filtros plantados com esses vegetais possuem um desempenho superior em comparação a filtros não plantados. Além disso, alguns estudos afirmam que as macrófitas: a) favorecem a formação do biofilme devido à rizosfera; b) melhoram a oxigenação do meio, ajudando na nitrificação (BRIX, 1997); c) liberam *exsudatos*, que são fonte de carbono, otimizando a remoção orgânica e o processo da desnitrificação (REDDY *et al.*, 1989); d) contribuem para a remoção do nitrogênio (STEFANAKIS e TSIHRINTZIS, 2012; JAMPEETONG *et al.*, 2012; KANTAWANICHKUL *et al.*, 2009).

Uma variedade de processos biológicos converte formas inorgânicas do nitrogênio para compostos orgânicos que servem de reserva para as células e os tecidos das plantas. As duas formas de nitrogênio geralmente utilizadas são a amônia e o nitrato (KADLEC e KNIGHT, 1996).

A assimilação do nitrogênio pelas plantas varia de acordo com as configurações do sistema, com os intervalos de alimentação, os tipos de águas residuárias e as condições ambientais, sendo relatada por alguns estudos (KANTAWANICHKUL *et al.*, 2009; BIAŁOWIEC *et*

al., 2012) uma taxa de assimilação entre 0,5 e 40 % do nitrogênio total. Vymazal (2005) aponta para um potencial de retirada de nitrogênio via assimilação e a subsequente poda (sob condições de clima tropical e subtropical) valores de até 10%. No entanto, a remoção do nitrogênio pelos vegetais é negligenciável em comparação com os processos físico-químicos de remoção.

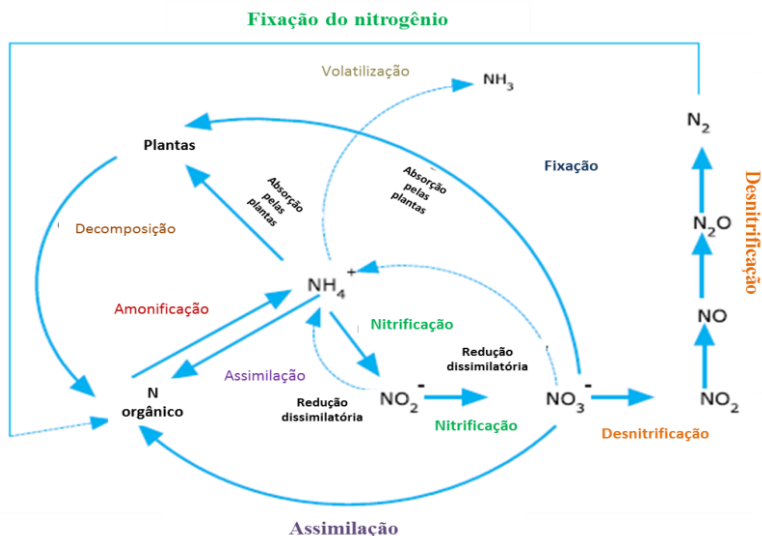
❖ Volatilização e adsorção da amônia

A volatilização pode ser um caminho importante para a remoção de nitrogênio em sistemas de filtros plantados com macrófitas. Esse processo ocorre quando há um desenvolvimento de algas que criam condições que elevam o valor do pH durante o dia através da sua atividade fotossintética (VYMAZAL, 2010). A elevação do pH, geralmente com valores acima de 9,3, gera o aumento da alcalinidade do meio que, por consequência, promove a conversão de íons de NH_4^+ para íons de NH_3 e, por fim, conversão a N_2 , que sob forma gasosa é devolvido para a atmosfera (COOPER *et al.*, 1996). Segundo Saeed e Sun (2012), a volatilização da amônia em filtros com fluxo subsuperficial é insignificante em pH abaixo de 9,3.

Em relação à adsorção, esta é regida por meio de processos específicos que promovem a troca de cátions entre o material filtrante, o NH_4^+ e a água. Materiais com propriedades de troca de cátions tem sido utilizado em FPM a fim de otimizar a remoção do nitrogênio (CUI *et al.*, 2010; SAEED e SUN, 2012).

A Figura 21 representa o conjunto de processos que promovem a transformação biológica do nitrogênio em filtros plantados com macrófitas. Nessa figura, alguns dos processos citados anteriormente podem ser visualizados, bem como outros processos que ocorrem como, por exemplo, as novas rotas de transformação do N.

Figura 21 - Principais vias de remoção do nitrogênio em filtros plantados com macrófitas



Fonte: adaptado de Saeed e Sun (2012).

2.2 POTENCIAL REDOX

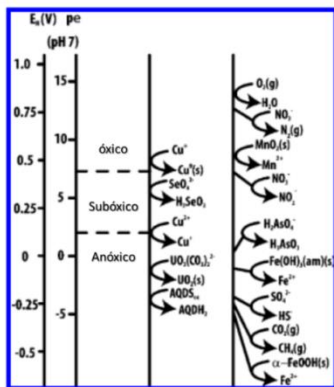
Alguns autores (PEDESCOLL *et al.*, 2011; CORBELLA *et al.*, 2014) afirmam que a eficiência de remoção de alguns poluentes em filtros plantados com macrófitas depende, entre outros fatores, do potencial redox (Eh).

Há algumas décadas o uso dessa ferramenta vem sendo relatado em estudos como sendo uma forma interessante de medição devido sua rapidez e baixo custo, sendo então adotada como um parâmetro qualitativo para interpretar mudanças de solubilidade em nutrientes e poluentes, bem como da atividade biológica (HUNTING e VAN DER GEEST, 2011).

No meio ambiente (como, por exemplo, solos mal drenados ou alimentados com águas subterrâneas, zonas ribeirinhas, pântanos, lagos, estuários, entre outros) é encontrado um gradiente de concentração de Eh devido suas diferenças e/ou variáveis específicas de cada local. A Figura 22 ilustra alguns exemplos da sequência de reações de oxidação-redução que ocorre ao longo do gradiente redox no tempo ou no espaço

dependendo da composição química e/ou da atividade microbiana (BORCH *et al.*, 2009).

Figura 22- Gradiente redox de elementos pares redox no meio ambiente. Pares redox foram calculados a pH 7, utilizando técnicas padrão



Fonte: adaptado de Borch *et al.* (2009).

Segundo Faulwetter *et al.* (2009), são os micro-organismos os maiores responsáveis por decompor poluentes orgânicos em substâncias consideradas produtos finais, tais como: dióxido de carbono (CO_2), gás nitrogênio (N_2) e água (H_2O), através dos processos de respiração e fermentação. O processo de respiração é predominante. Nele a biota atuante induz uma transferência de elétrons de um composto doador de estado mais elevado de energia (geralmente de carbono orgânico) para um receptor de elétrons de estado inferior, utilizando o diferencial de energia para o crescimento e reprodução. Assim, a remoção de poluentes depende da reação de redução-oxidação (redox).

Autores como Tanner *et al.* (2002); Diáková *et al.* (2006); Dusek *et al.* (2008) citam três diferentes condições redox, a saber: aeróbio, anaeróbio e anóxico onde um alto potencial redox está associado a um ambiente oxidado e promove processos aeróbios, como a nitrificação. Em compensação, o potencial redox mais baixo está associado a condições reduzidas, promovendo processos anaeróbios, como redução do sulfato e metanogênese. A Tabela 11 apresenta o tipo de respiração microbiana e a faixa de valores de potencial redox adotada por vários autores.

Tabela 11 - Reações microbianas de oxidação-redução

Processos	Elétron receptor (ER)	Produtos finais	Moles de e ⁻ por mole de ER	ΔG° (kJ/mole e ⁻)	Potencial redox - Eh (mV)
Respiração aeróbica	O ₂	H ₂ O	4	- 125,1	300 a 700
Redução do nitrato	NO ₃ ⁻	N ₂ , NO _x	5	- 118,8	100 a 350
Redução do manganês	Mn ₄ ⁺	Mn ²⁺	2	- 94,5	-100 a 300
Redução do ferro	Fe ₃ ⁺	Fe ²⁺	1	- 24,3	- 100 a 200
Redução do sulfato	SO ₄ ²⁻	S ²⁻	8	- 25,4	- 200 a - 100
Metanogêneses	CO ₂	CH ₄ , CO ₂	8	- 23,2	- 350 a - 100

Fonte: adaptado de Diáková *et al.* (2006); IWA (2000); Kadlec e Knight (1996); Laanbroek (1990); Sahrawat (2004); Faulwetter *et al.* (2009)

O Eh pode ser considerado um bom indicador das condições biológicas e do estado redox de um filtro, fornecendo respostas sobre os parâmetros que influenciam no desempenho do sistema (DUSEK *et al.*, 2008).

No entanto, cabe salientar que apesar dos valores expostos na Tabela 11 serem adotados como padrão de referência, sabe-se que os processos microbianos são complexos e que podem resultar numa variação dos valores de Eh diferente do esperado, tornando a medição do Eh bastante difícil.

Alguns autores (WIESSNER *et al.*, 2005; DUSEK *et al.*, 2008; GARCÍA *et al.*, 2010) relatam a dificuldade de medição do Eh devido a vários fatores, como: condições específicas de cada configuração/design adotada, do tipo de fluxo aplicado, do ciclo operacional, da carga orgânica aplicada, da complexidade do sistema redox na rizosfera. Tais condições geram especificidades de funcionamento, diferentes gradientes de concentração, a presença de vegetais, flutuações no nível da água, evapotranspiração, intensidade da luz e temperatura, dentre outras condições ambientais instáveis.

Em termos gerais, a variação em FPM é de grande intensidade (flutuação de várias centenas de *milivolts* em poucas horas) (DUSEK *et al.*, 2008), em profundidade, ao invés do comprimento (GARCÍA *et al.*, 2003), e especialmente pronunciada nas primeiras horas da manhã. Cada

uma dessas variáveis pode promover um estado redox específico, variando com o tempo de tratamento e/ou espacialmente dentro do filtro, o que, por sua vez, gera uma variedade de processos biológicos e subsequente remoção de poluentes.

Uma vez tendo o conhecimento do Eh, os parâmetros operacionais podem então ser manipulados de acordo com a gama de redox desejada, e por consequência, otimizar a remoção de um determinado poluente. Essa manipulação das condições de redox pode ser alcançada através da alteração das variáveis aplicadas, tais como a taxa de carga orgânica, a taxa hidráulica, o modo de funcionamento e a escolha da macrófitas utilizada (FAULWETTER *et al.*, 2009).

A literatura é bastante ampla nos estudos de potencial redox. Porém, tratam-se de estudos pontuais, que não levam em consideração a variabilidade temporal e espacial, negligenciando assim os processos biogeoquímicos amplamente variáveis em sistemas como os filtros plantados com macrófitas.

Como uma forma de minimizar erros, o monitoramento contínuo pode ser adotado. O uso de eletrodos redox permanentes instalados demonstrou que *in situ* as condições redox podem apresentar grandes variações espaciais e temporais (variando de -400 a 100 mV durante vários dias) e podem variar até a 200 mV em ciclos diários, dados que comprovam a variabilidade da condição redox e a importância do monitoramento contínuo.

O conhecimento dos processos redox pode proporcionar novas oportunidades para elaborar estratégias de remediação e, assim, compreender os processos biogeoquímicos de interfaces redox no meio ambiente, conhecimento que é fundamental para prever e proteger a qualidade da água e do ecossistema (BORCH *et al.*, 2009).

2.3 BIOLOGIA MOLECULAR

Apesar da importância dos mecanismos de remoção de poluentes em tratamento de águas residuárias, tais como sedimentação, filtração, precipitação, volatilização, dentre outros, sabe-se que a remoção de tais poluentes se dá principalmente pela atividade microbiana presente em amostras ambientais (KADLEC e KNIGHT, 1996; FAULWETTER *et al.*, 2009). Devido a este fato, fica evidente que, para a otimização do desempenho de um sistema de tratamento, é fundamental o estudo da biota envolvida no processo.

Por muito tempo o estudo das estações de tratamento era limitado a análises físico-químicas de entrada e saída de uma instalação com o objetivo de adequar o efluente aos requisitos impostos pela legislação ambiental em vigor, tendo a parte biológica negligenciada ou apenas limitada em algumas análises microscópicas de organismos indicadores de qualidade do efluente, como protozoários e metazoários. O estudo das bactérias que compõem 95% da microbiota — e que realizam as reações, por vezes mal compreendidas — ainda é praticamente obscuro, sendo considerado uma “caixa preta”. Assim sendo, para a caracterização de um sistema de tratamento de efluentes são necessárias análises não apenas físico-químicas, mas também biológicas, a fim de analisar a relação entre os micro-organismos e os processos biogeoquímicos ali existentes (DEZOTTI *et al.*, 2011).

Todavia, para a caracterização da capacidade de um sistema para tratar determinado tipo de poluente, o microbiologista deve responder a várias questões relacionadas às bactérias, como: Quem? Quantos? Como?

Entretanto, métodos microbiológicos tradicionais, ditos pasteurianos, não respondem completamente a essas questões. Esses métodos são limitados exclusivamente a técnicas microscópicas, de enriquecimento e cultivo em placas de *petri*. Muitas vezes, tais métodos não fornecem maiores informações quanto à composição microbiana devido às dificuldades inerentes às condições ideais para o cultivo e o isolamento dos micro-organismos, uma vez que alguns deles são bastante seletivos quanto ao meio de cultivo e suas variáveis (MUYZER *et al.*, 1993; JUZAN *et al.*, 2012).

Autores como Muyzer *et al.* (1993) e Huybens *et al.* (2009) afirmam que o processo microbiológico de cultura não fornece informações reais sobre a comunidade bacteriana de uma amostra, além de ser simultaneamente demorado e seletivo. Ou seja, os métodos de cultura permitem a avaliação de apenas uma pequena parcela dos micro-organismos presentes em uma amostra, subestimando a real diversidade existente.

Com o propósito de superar os problemas das técnicas de cultivo, a utilização de métodos moleculares da genética que utilizam os ácidos nucléicos – DNA e RNA – como base do estudo surgiram como excelente alternativa. Esses métodos dispensam o cultivo, reduzindo assim os erros dos métodos pasteurianos e permitindo a caracterização dos micro-organismos numa amostra, cultivada ou não, no seu ambiente natural (HUYBENS *et al.*, 2009).

A análise do DNA propicia, por exemplo, informações sobre a diversidade estrutural de amostras ambientais e presença ou ausência de certos genes funcionais. No entanto, analisar unicamente do DNA não permite conclusões a respeito da atividade metabólica bacteriana (OSBORN e SMITH, 2005).

Essa lacuna de informação pode ser solucionada a partir da análise do RNA, mais precisamente de sequências gênicas² codificadoras de proteínas, sequências de aminoácidos³ e de genes que possuam regiões altamente conservadas⁴ entre as espécies analisadas, tal como a molécula de RNA ribossomal (rRNA). Essa molécula é parte integrante do ribossomo⁵ e a análise dela em detrimento de outras é feita devido não só pelo fato de ser uma molécula altamente conservada — o que diminui as mutações ao longo do processo evolutivo, sendo considerada a “impressão digital” de um organismo —, mas também por ser uma molécula presente em todos os seres vivos, ser derivada de um ancestral comum e ser geneticamente estável (DEZOTTI *et al.*, 2011).

Além disso, essa molécula possui um tamanho adequado para que algumas técnicas se tornem possíveis de serem realizadas. O rRNA utilizado é a subunidade ribossomal presente em todas as células procarióticas⁶ 16S (HUYBENS *et al.*, 2009).

Em resumo, as características da molécula rRNA permitem que sejam feitas comparações de organismos dentro de um único domínio, além de possibilitarem diferenciar estirpes⁷ de mesma espécie e, assim, classificar de forma filogenética⁸ a diversidade microbiana. Em outras palavras, o que antes era comparado de maneira morfológica e muito subjetiva pelas técnicas de cultura, agora é tratado de modo mais

² Sequência: ordem da cadeia dos nucleotídeos. Nucleotídeos: unidades básicas dos ácidos nucléicos (DNA e RNA) – são constituídos por uma base nitrogenada, por uma pentose e um grupo fosfato. Bases nitrogenadas: Adenina, Guanina Timina, Citosina e Uracil.

³ Os aminoácidos são moléculas orgânicas formadas por átomos de carbono (C), hidrogênio (H), oxigênio (O) e nitrogênio (N). Alguns podem conter enxofre em sua composição. Eles se unem através de ligações peptídicas formando as proteínas.

⁴ Sequências de DNA idênticas encontradas em todos os micro-organismos, ao contrário de regiões variáveis.

⁵ Estrutura celular responsável pela síntese de proteínas.

⁶ Células que dentre várias características, não possuem envoltório celular. Encontrada em organismos primitivos como as bactérias, por exemplo.

⁷ Grupo de descendentes com um ancestral comum que compartilham semelhanças morfológicas ou fisiológicas.

⁸ Refere-se à classificação dos seres vivos com o objetivo de informar o grau de parentesco entre as espécies e, portanto, sua história evolutiva (ou filogenia).

objetivo com a biologia molecular devido à análise de sequências ribossômicas obtidas diretamente de amostras ambientais de organismos não cultiváveis, tornando-se possível revelar novas espécies, mudar antigos paradigmas ou até mesmo reestruturar a taxonomia⁹ de grupos funcionais (MUYZER *et al.*, 1993; OSBORN e SMITH, 2005; DEZOTTI *et al.*, 2011).

A aplicação da biologia molecular em estações de tratamento de efluentes é de extrema relevância, considerando que é de grande valia a identificação dos micro-organismos-chave que estão envolvidos nos processos ocorrentes, uma vez que esses são os maiores responsáveis pela remoção de poluentes, objetivo principal das estações de tratamento (DEZOTTI *et al.*, 2011).

Nos últimos anos, pode-se constatar uma enorme aplicação das técnicas da biologia molecular a fim de obter resultados mais precisos, tanto qualitativos como quantitativos, no que se refere à identificação de espécies específicas ou grupos funcionais que estão relacionados à remoção de poluentes (Miller *et al.*, 1999; Truu *et al.*, 2005; Sundberg *et al.*, 2007; Pholchan *et al.*, 2010; Fernandes *et al.*, 2013a; Fernandes *et al.*, 2013b; Adrados *et al.*, 2014; Ansola *et al.*, 2014).

Em relação aos filtros plantados com macrófitas, alguns estudos já vêm usando a biologia molecular para ampliar os conhecimentos sobre a atividade microbiana (Baptista *et al.*, 2003; Ibekwe *et al.*, 2007; Tietz *et al.*, 2008; Baptista *et al.*, 2008; Ruiz-Rueda *et al.*, 2009; Calheiros *et al.*, 2010; Mustafa e Scholz, 2011; Adrados *et al.*, 2014; Ansola *et al.*, 2014...).

Porém, apesar de nos últimos anos ter havido uma evolução na aplicação dessas técnicas em filtros plantados com macrófitas, as variadas formas de configuração, diferentes fluxos, diferentes afluentes e tipos de material filtrante confundem a compreensão sobre a estrutura da comunidade microbiana, sua distribuição espacial e suas atividades, tornando a maioria dos estudos realizados baseados em suposições ou evidências (FAULWETTER *et al.*, 2009). Tendo isso em vista, fica evidente a necessidade de estudos mais completos sobre o assunto, principalmente em relação à diversidade espacial e temporal, ampliando, assim, o conhecimento das transformações que ali ocorrem e, conseqüentemente, melhorando o projeto e a eficiência do tratamento (TRUU *et al.*, 2009).

⁹ Classificação dos seres vivos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ESTUDO EM ESCALA PILOTO

A fim de compreender o funcionamento de modo detalhado, aprofundar conhecimentos do ponto de vista operacional e caracterizar o desempenho sob condições reais de implementação sem que, para isso, haja gastos elevados e procedimentos passíveis de erro efetuados em grande escala, é necessário primeiramente realizar estudos em escala piloto para, então, transpor de forma clara e eficaz os conhecimentos adquiridos a uma estação de tratamento de efluentes em escala real.

3.1.1 Descrição do sistema de tratamento

3.1.1.1 Localização

Os filtros pilotos denominados de Filtro plantado com macrófitas piloto 1 (FPM/P1) e Filtro plantado com macrófitas piloto 2 (FPM/P2) foram instalados dentro de uma estufa na plataforma experimental chamado *Feysine*, localizado na região metropolitana de Lyon (França) (Figura 23).

Ao lado da plataforma está situada a estação de tratamento de efluentes domésticos chamada *Suez Environnement* (400.000 EH) que, por intermédio de um acordo com o IRSTEA, fornece ininterruptamente efluente real oriundo de diferentes fases de tratamento. Isso permite, então, que cada experimento do IRSTEA apresente condições bem próximas à realidade, possibilitando testar o comportamento das diferentes unidades de tratamento ali estudadas. Já a estufa foi construída a fim de simular as condições de temperatura, mantendo uma média de 26°C no verão e 10°C no inverno.

Uma vez na plataforma experimental, os efluentes dos diferentes tipos e estágios de tratamento são armazenados em reservatórios com um sistema de “*Overflow*” a fim de manter e garantir boa qualidade do material coletado.

3.1.2 Concepção e Dimensionamento

Neste experimento, foram utilizados dois filtros individuais em escala piloto que representam cada um a primeira das três células do primeiro estágio do Sistema Francês para o tratamento de efluente bruto.

Figura 23 – Conjunto das estações de tratamento.

a) Estação de Tratamento *Suez Environnement*; b) plataforma experimental Feysine/IRSTEA (estufa destacada em pontilhado) e, c) estufa que abriga os pilotos.

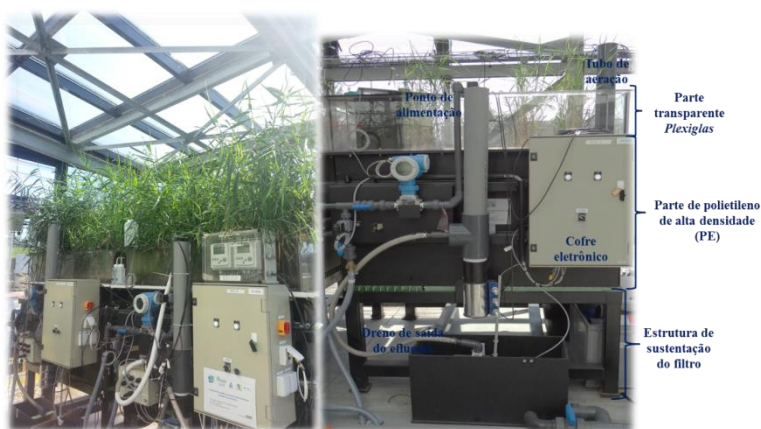


Fonte: autor.

O dimensionamento dos pilotos foi estabelecido de acordo com os critérios propostos pelo IRSTEA em 97/98 (BOUTIN *et al.*, 1997; LIÉNARD *et al.*, 1998), baseado na carga orgânica aplicada expressa em superfície do filtro por número de habitantes. As cargas aceitáveis para filtro em funcionamento utilizadas para o dimensionamento foram: 37 cm/d de taxa hidráulica, e cargas de 300g DQO/m²/d, 150 SST/m²/d e 25 – 30 NK/m²/d (MOLLE *et al.*, 2005). Durante a fase de experimentos, os pilotos foram alimentados de acordo com as cargas citadas. A visão geral dos filtros pode ser observada na Figura 24.

Cada filtro possui uma superfície de 2 m², com altura de 1 m dividido em duas partes. A primeira parte possui 30 cm e é constituída por Plexiglas (matéria plástica constituída de polimetacrilato de metila) transparente, tendo como função evitar o transbordamento do efluente caso haja colmatção, além de permitir o desenvolvimento da camada de lodo mineralizado.

Figura 24 – Visão geral dos filtros em escala piloto. Pilotos de 1º estágio do Sistema Francês (à esquerda); estruturas básicas que compõem os filtros (à direita).



Fonte: autor.

A segunda parte possui 70 cm de altura e é constituída de polietileno de alta densidade (PE), material que possui várias características importantes para o contexto do tratamento, como: superfície opaca (evitando, assim, o contato com a luz e os raios UV e o desenvolvimento de micro-organismos indesejáveis, como as algas); resistência térmica e mecânica; resistência à água pluvial; inerte quimicamente; estanqueidade a gases.

Entre essas duas estruturas (*Plexiglas* e PE) foi utilizado um sistema de vedação, a fim de evitar possíveis vazamentos.

O fundo de cada filtro possui uma inclinação que parte das extremidades para o centro e da parte posterior para frente de aproximadamente 0,5% para garantir uma boa drenagem. Essas características do dimensionamento estão resumidas na Tabela 12.

Como é possível observar na Figura 24, os filtros estão sobrepostos em uma estrutura feita de aço. Há também um painel de controle localizado na fachada dos filtros que comporta o conjunto de automação do sistema e alguns instrumentos de mensuração.

Tabela 12 – Dimensionamento dos pilotos


Piloto	Unidade
Superfície total	2,0 m ²
Largura	1,40 m
Altura inferior (parte opaca)	0,70 m
Altura superior (parte transparente)	0,30 m
Inclinação da parte inferior do filtro	0,5 %

Fonte: autor.

3.1.2.1 Material filtrante

Na região do PE encontra-se o material filtrante de sílica composto por três camadas de granulometria diferentes com altura de 70 cm. A Tabela 13 resume as camadas de filtração e suas características.

Tabela 13 – Material filtrante e suas características

Camada	Granulometria	Características	Altura (cm)	Visual
Filtrante	2/6 mm d60: 4,98/d10:2,69 CU: 1,85	Rolado - Lavado	35	
Transição	8/20 mm	Rolado - Lavado	20	
Drenagem	20/40 mm	Rolado - Lavado	15	

Fonte: autor.

A fim de assegurar uma boa qualidade no tratamento, foi dada atenção particular ao material utilizado para a composição da camada filtrante. De acordo com Molle *et al.* (2005), a granulometria apresentada na Tabela 13 é recomendada para o primeiro estágio do tratamento francês, possuindo as seguintes características: coeficiente de uniformidade com limite <5%, taxa de partículas finas (<80µm) com limite <3% e, teor de carbonatos <10%.

3.1.2.2 Condições de oxigenação

Os pilotos foram projetados para otimizar o desempenho no tratamento do nitrogênio, garantindo a compactação da estrutura. Por isso, foram criadas no interior dos filtros diferentes condições de oxigenação necessárias para o tratamento biológico do nitrogênio.

A parte superior de cada filtro corresponde à zona aeróbia. Na parte inferior da camada filtrante foi inserido diagonalmente um dreno intermediário (diâmetro de 70mm), em forma de U, a fim de aumentar sua oxigenação. Esse dreno foi perfurado com orifícios de 1cm de largura na sua face inferior, sendo estes orifícios distribuídos a cada 10 cm, isto é, há perfuração em aproximadamente 1/3 de seu perímetro. Além disso, o dreno possui contato com a atmosfera através de suas extremidades, sendo que uma diferença de altura em uma das pontas foi criada a fim de garantir o bom movimento convectivo do fluxo de ar no interior do filtro.

Na parte inferior, criou-se uma condição de saturação, originando, portanto, uma zona saturada anaeróbia que gera condições para que o filtro promova a desnitrificação. O nível de saturação é controlado por um sifão, que é variável, permitindo assim o estudo da influência do volume de saturação no processo da desnitrificação.

A zona saturada foi operada sob duas condições, denominadas de fases, a saber:

- Fase 1: ambos os filtros operaram por 12 meses, com nível de saturação de 25 cm. Essa fase foi implementada para testar a similaridade do comportamento de ambos os pilotos.

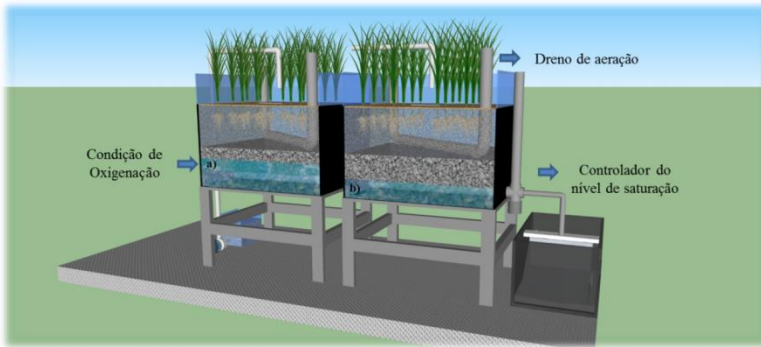
- Fase 2: o piloto FPM/P2 passou a operar com uma camada saturada de 15 cm por um período de 4 meses, a fim de testar qual o limite de saturação favorável ao processo de nitrificação/desnitrificação simultâneas.

As condições de oxigenação, o dreno de aeração, bem como o sifão podem ser visualizados na Figura 25.

3.1.2.3. Sistemas de distribuição do afluyente

O sistema de distribuição do afluyente bruto é constituído de tubulação (DN40) e, tendo em vista a superfície dos pilotos (2 m²), cada filtro foi composto por um único ponto de alimentação. Logo abaixo do ponto de alimentação foi inserida uma placa de PVC para garantir uma boa repartição do efluyente, evitando caminhos preferenciais.

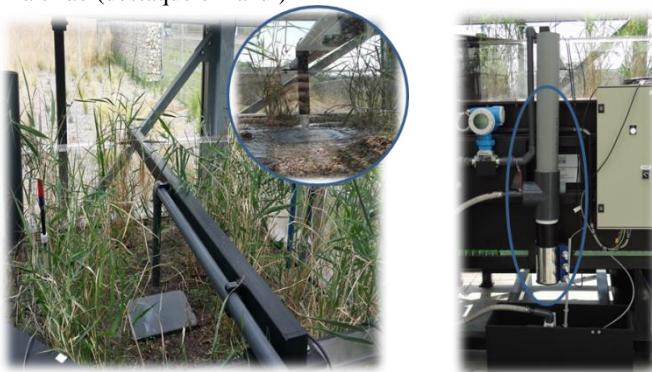
Figura 25 – Filtros pilotos nas diferentes condições de oxigenação
As setas indicam: as condições de oxigenação: a) 25 cm de saturação, b) 15 cm de saturação -; o dreno de aeração; o controlador de nível (sifão).



Fonte: autor.

A drenagem e saída do efluente foram realizadas por meio de um dreno (70 mm de diâmetro) localizado na parte inferior de cada filtro. Após a passagem pelo dreno, o efluente passava pelo sifão de controle do nível de saturação sendo, posteriormente, encaminhado por tubulação para o controlador de vazão de saída, localizado no reservatório para efluente tratado. Esse sistema pode ser visualizado na Figura 26. **Figura 26**

Figura 26 – Ponto de alimentação e saída do efluente
Sistema sifão (destaque em azul)



Fonte: autor.

Em relação às plantas, foram utilizadas, a uma densidade de 6 plantas/m², plantas da espécie *Phragmites communis* com dois anos de idade (Figura 27).

Figura 27 – *Phragmites communis*



Fonte: autor.

3.1.3 Parâmetros operacionais

No que diz respeito aos parâmetros operacionais, primeiramente o efluente era encaminhado para os filtros através de uma bomba com vazão variável de 0,3 à 2m³/h. Um sistema de purga na tubulação foi automatizado para funcionamento de alguns minutos antes e depois da passagem do efluente em cada batelada, a fim de melhorar a qualidade do efluente que entrava no piloto e também evitar que o mesmo ficasse armazenado na tubulação. Da mesma forma, um sistema *bypass*, regido por duas válvulas (que operaram em sentido inverso), permitiu enviar o efluente diretamente à rede de esgoto.

O circuito de entrada e saída do efluente foi operado automaticamente. Sua instrumentação será descrita a seguir:

❖ Painel de controle

Um painel de controle foi instalado na fachada dos pilotos. Esse cofre foi projetado para conduzir a bomba principal e as três válvulas

motorizadas que separam diferentes circuitos de água e da bomba dosadora.

❖ Medidas de vazão

Em cada piloto foi instalado um medidor de vazão magnético (*Endress Hauser®*) a fim de contabilizar continuamente a vazão de entrada. Esse medidor registrava em tempo real as informações necessárias de alimentação dos pilotos (taxa de fluxo e volume) e, posteriormente, enviava os valores capturados para a central analítica, onde então eram contabilizados e registrados.

Devido à vazão de saída ser inferior à de entrada, o controle da vazão de forma contínua tornou-se mais difícil quando medido por um sistema igual ao utilizado para medir a vazão de entrada. Assim, para medir a vazão de saída foi utilizado um sistema do tipo Medidor de balde de aço inoxidável de comunicação no princípio do Tudo-ou-nada (TOR).

Quando um dos lados do balde de volume conhecido era preenchido, ele basculava (alternância de lado), enviando neste momento um impulso observado por um sensor de pulso magnético. Esse processo ocorria para ambos os lados do balde. Desse modo, para cada passada do efluente, o seu volume era medido e registrado automaticamente. A vazão de saída pôde também ser medida através da redução do volume acumulado correspondente ao número de alternâncias por unidade de tempo. A calibração em triplicata do sistema foi feita utilizando uma proveta graduada e uma balança.

❖ Instrumentação Interna – Sondas

❖ Sonda Redox

A fim de estudar a incidência do fundo saturado no desempenho do sistema, o conhecimento das condições redox do meio em diferentes profundidades do filtro se fez necessário visto que, a partir dessa análise, obtêm-se informações importantes para estimar as populações bacterianas majoritárias ativas e os processos biológicos predominantes em função da condição de oxigenação adotada. Dessa forma, três sondas de potencial redox foram colocadas no interior de cada piloto com o objetivo de avaliar o potencial redox em função da profundidade e das diferentes zonas de oxigenação.

O potencial redox foi monitorado de acordo com o método descrito por Veneman e Pickering (1983) por meio de três componentes

principais: sonda redox, eletrodos de referência e ponte salina, descritos abaixo.

- Sonda redox (Paleo Terra®): fabricada em fibra de vidro com um comprimento total de 30 cm ligado a um sensor de platina anular. Foram instalados dois tipos de sonda redox dentro do piloto:

i) Sonda redox simples — uma em cada piloto —, postas a uma profundidade de 49 cm no FPM/P1 e 46 cm no FPM/P2;

ii) Sonda redox com um sensor de temperatura Pt100 — duas por piloto —, postas a uma profundidade de 38 cm e 62,5 cm no FPM/P1 e, 35 cm e 68 cm de profundidade no FPM/P2.

Essas sondas foram colocadas na vertical, ligeiramente inclinadas dentro do material filtrante e envoltas por um tubo *plexiglas*, a fim de proporcionar proteção e permitir a manutenção. As extremidades dos tubos foram então cobertas por uma tela, assegurando o contato entre o sensor e o ambiente.

- Eletrodos de referência (ProSense®): também fabricados em fibra de vidro com dimensões 12*120 mm, compostos por Ag/AgCl saturado, KCl (3M). Somente um eletrodo de referência (QM714X) foi instalado em cada filtro e posto em contato com as sondas redox através da ponte salina.

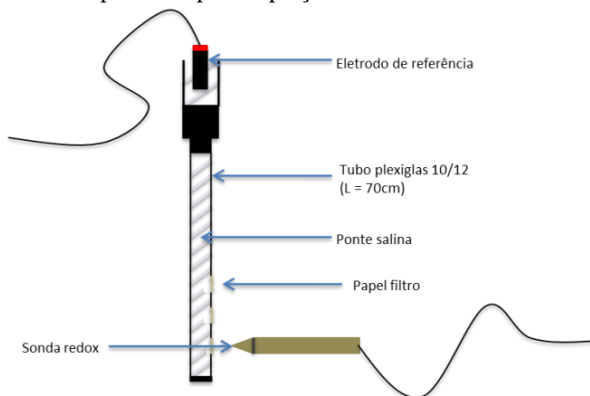
- Ponte salina: utilizada para permitir o contato entre as sondas redox e o eletrodo de referência, garantindo um bom contato entre eles. Além disso, o uso de uma ponte salina melhora a estabilização do sinal, assegurando a obtenção de dados “limpos”, necessitando apenas que a sonda seja umedecida no mínimo uma vez por semana. A ponte salina era composta por 300 ml de solução saturada de KCl (350g/L), 8 mg de ágar-ágar e alguns cristais de fenol para evitar a colonização de micro-organismos indesejáveis. O conjunto desses componentes pode ser visualizado na Figura 28.

Todos os eletrodos envolvidos na medição do redox foram ligados à central de aquisição de dados Campbell CR1000.

Além das sondas redox internas, uma sonda redox com temperatura foi colocada no reservatório para efluente tratado a fim de acompanhar, em tempo real, a evolução das características do efluente de saída do filtro. Essa sonda é diretamente conectada à central de supervisão da plataforma experimental, onde os dados são registrados. Além disso, é possível acompanhar os resultados através de um monitor situado ao lado dos filtros.

Figura 28 – Sonda Redox.

Conjunto dos componentes para captação dos valores da sonda redox.



Fonte: autor.

❖ Sonda de Oxigênio

Instaladas a 10 e 25 cm das profundidades, as sondas (Apogee®) foram utilizadas com objetivo de acompanhar de forma contínua o teor de oxigênio na camada filtrante, o consumo de oxigênio após uma alimentação e os fenômenos de reoxigenação do filtro.

❖ Sonda de temperatura

Cada filtro recebeu em seu interior quatro sondas de temperatura. Estas sondas foram colocadas de modo a obter-se um perfil de toda a profundidade do filtro. Duas sondas foram posicionadas em 10 e 25 cm, respectivamente, no material filtrante, no mesmo nível que as sondas de oxigênio. Além disso, como descrito anteriormente, duas sondas redox por piloto com medidor de temperatura permitiram a análise da temperatura nas camadas mais inferiores do filtro.

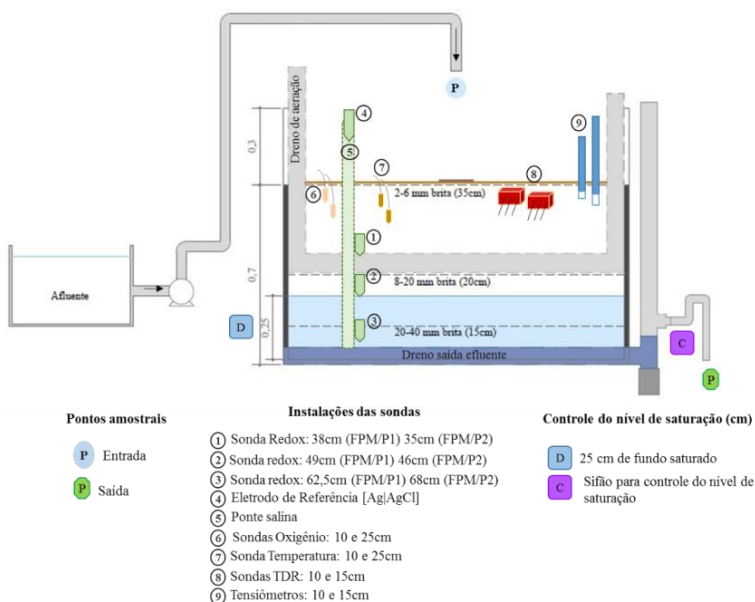
As análises foram efetuadas de maneira contínua por sondas metálicas em platina. A resistência elétrica de um condutor metálico aumenta progressivamente à medida que a temperatura aumenta; dessa forma, é possível determinar a temperatura adjacente ao captor.

❖ Sonda ultrassom

Uma sonda ultrassom foi inserida a aproximadamente 30 cm de profundidade da superfície com o objetivo de observar a formação ou não de lâmina d'água na superfície do filtro e possível colmatção.

Além disso, essa sonda forneceu informações interessantes em relação à formação da camada de lodo depositada na superfície e sua mineralização, permitindo, assim, correlacionar esses dados com o desempenho de filtração do filtro. Essa sonda também emite seus valores diretamente para a central de supervisão. A instrumentação interna pode ser observada na Figura 29.

Figura 29– Instalações das sondas no interior dos filtros.



Fonte: autor.

❖ Central de aquisição de dados – Campbell CR1000

A central Campbell CR1000 foi utilizada pela maior parte dos instrumentos de análises e sondas — TDR, tensiômetros e sonda oxigênio —, que foram conectados diretamente à central. O guia da central pode ser visualizado no seguinte link: <http://climate.sdstate.edu/howto/hydraprobe-analog/cr1000.pdf>

3.1.4 Protocolo experimental

3.1.4.1 Regime de alimentação

Os filtros pilotos foram colocados em funcionamento no mês de julho de 2012, operando em batelada a fim de simular as mesmas condições de operação dos filtros em escala real.

Como já mencionado, os pilotos foram automatizados e o lançamento de um ciclo de operação se dava por meio da central de supervisão.

Os parâmetros aplicados no sistema em função da carga hidráulica diária estipulada no projeto foram então inseridos no programa da central. Esses diferentes parâmetros são os seguintes: vazão de entrada, volume de uma batelada, tempo de abertura das válvulas, tempo entre as bateladas, duração do ciclo de alimentação e duração do ciclo de repouso. Uma vez efetuada a programação, bastou lançar a alimentação na central de supervisão. Os valores da programação, bem como outras características do projeto, podem ser visualizados na Tabela 14.

Tabela 14– Valores de programação e características de projeto dos pilotos.

Piloto		Unidade
Número de bateladas	12	Batelada d ⁻¹
Volume por batelada	0,06	m ³ .b
Duração de cada batelada	5	min
Vazão de cada batelada	0,03	m ³ /h
Vazão	0,72	m ³ /d
Tempo entre as bateladas	2	h
Tempo de abertura das válvulas	120	s
Duração do ciclo de alimentação	3,5	dia
Duração do ciclo de repouso	3,5	dia
Carga hidráulica projetada	0,36	m/d
Altura da lâmina de água formada em cada batelada	3,0	cm
TDH (25 cm de saturação)*	6,66	h
TDH (15 cm de saturação)*	4,0	h

* Tempo de detenção hidráulica (TDH) teórico.

O ciclo de operação projetado foi dividido em um período de alimentação e um período de repouso. Durante o período de alimentação (3,5 dias), os pilotos foram projetados para operarem conforme descrito a seguir: o efluente era enviado para os filtros através de uma bomba

com taxa de fluxo de $1\text{m}^3/\text{h}$. Um sistema de purga era ativado alguns minutos antes e depois de cada batelada a fim de garantir uma alimentação com água residuária "fresca", ou seja, evitando possível estocagem de efluente na tubulação. Cada piloto foi projetado para receber um volume por batelada de $0,03\text{ m}$ (60 litros), ou seja, $0,06\text{m}^3$, considerando a área superficial de 2m^2 a cada 2 horas, produzindo carga hidráulica projetada diária de $0,36\text{ m/d}$.

O tempo de detenção hidráulica foi calculado de acordo com a área superficial do filtro (2m^2) vezes a altura de cada zona saturada (25 cm e 15 cm) e a porosidade do material filtrante (40%) para o volume ($0,06\text{ m}^3$) e tempo entre as bateladas (2h). Como exemplo para 25 cm de saturação, segue-se:

$$\begin{aligned} 2\text{m}^2 \times 0,25\text{m} &= 0,5\text{m}^3 \\ 0,5\text{m}^3 \times 0,4 &= 0,2\text{m}^3 \\ 0,06\text{m}^3 \times 0,2\text{m}^3 &= 3,33 * 2\text{h} = \mathbf{6,66\text{h}} \end{aligned}$$

3.1.4.2 Amostragem

As amostras para as análises físico-químicas foram coletadas duas vezes por semana, no início e fim de cada período de alimentação de cada piloto. Dois pontos amostrais foram monitorados: (i) entrada do filtro e (ii) saída do filtro.

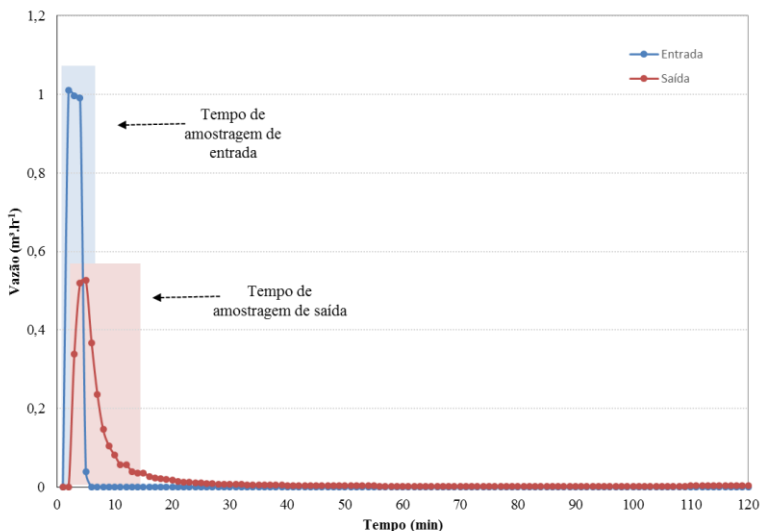
Como a amostragem era realizada com base de uma batelada e não sobre 24 horas, tornou-se necessário fazer testes a fim de garantir a representatividade das amostras de uma batelada. Para isso, foram estabelecidos diferentes modos e tempos de amostragem para cada ponto de coleta. Durante o período de alimentação a frequência entre duas bateladas era de 2 horas. Segue, então, a descrição da amostragem:

1. Entrada: Para esse ponto de amostragem, as coletas foram realizadas durante todo o tempo de alimentação, que era de aproximadamente cinco minutos. O frasco de coleta foi colocado abaixo do tubo de alimentação sobre a placa de repartição do efluente. O tempo de amostragem de entrada correspondeu à duração total da alimentação.
2. Saída: A amostragem de saída foi efetuada após 6 minutos do início da alimentação e durou um período de 10 a 15 minutos, onde a cada 1 minuto 250 mL de efluente era coletado. Essa análise gerou, portanto, a representatividade da amostragem de saída, que é apresentada pela Figura 30.

A partir de análises das vazões de saída, destaca-se para esse método de amostragem que o volume recuperado representa em torno de 90% de uma batelada sobre 2h de drenagem. As concentrações em pequenas vazões, no fim de uma drenagem, são mais baixas que no início de uma batelada (MORVANNOU *et al.*, 2014), portanto, ocorria uma maior amostragem em elevadas concentrações, característica que subestima a performance do tratamento.

A cada coleta eram recolhidos 2 L de amostras e, em seguida, tais amostras eram transportadas para análise imediata no laboratório de química que se encontra no mesmo local em que foram implantados os filtros pilotos (plataforma experimental *Feysine*).

Figura 30 – Representatividade das vazões de entrada e saída de uma batelada. O retângulo azul representa o tempo (min) de entrada e amostragem do afluente. O retângulo vermelho representa o tempo (min) de amostragem do efluente.



Fonte: autor.

3.1.5 Análises físico-químicas

O quadro de análises foi feito em duas situações: i) duas vezes por semana no laboratório da plataforma experimental da estação, através de Kits comerciais e, ii) a cada quatro meses as amostras eram

encaminhadas para análise no Laboratório de Química do Instituto. Essa segunda condição teve como objetivo garantir o conhecimento da qualidade das análises realizadas pelos Kits.

Os parâmetros analisados foram os seguintes: Sólidos suspensos totais (SST), Amônio (N-NH_4^+), Nitrato (N-NO_3^-) Nitrito (N-NO_2^-), e Demanda Química de Oxigênio - dissolvida (DQO).

Cada amostra era dividida em duas alíquotas. A primeira era utilizada para análise dos Sólidos suspensos totais (SST), de acordo com *French standard methods* (AFNOR, 2005). A segunda alíquota de 100 mL do efluente coletado era filtrada para as análises dos parâmetros dissolvidos. A filtração foi feita através de filtros de 0,45 μm (Sartorius Minisart®).

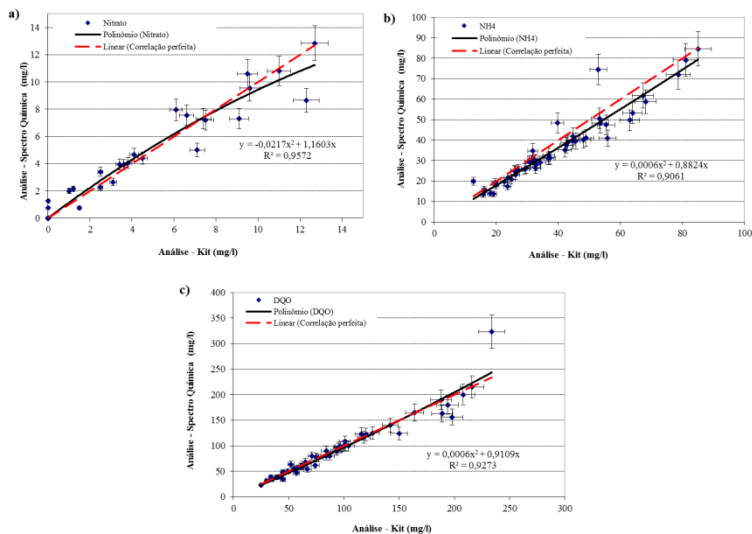
Para o procedimento da DQO foi utilizado Kit da marca WTW® - gama C4/25 e C3/25. O Kit C4/25 foi utilizado para a gama de concentração de 25 – 1500 mg/l nos procedimentos efetuados com efluente de entrada que possui maior concentração em termos de DQO. Já o Kit C3/23, a gama detectada foi de 10 – 150 mg/l, sendo utilizado geralmente em termos de DQO de saída. Após sua filtração, a amostra era então oxidada por uma solução sulfúrica quente de dicromato de potássio com sulfato de prata como catalisador — procedimento este fornecido pela própria empresa (análoga a métodos convencionais - ISSO 15705). Após a reação, a amostra foi determinada por fotometria (com a utilização do aparelho *Photo Lab 6100 Vis Series WTW®*).

O Kit da WTW® também foi utilizado para a análise de nitrato (0,5 – 18,0 mg/l NO_3 em N). A amostra foi imersa em ácido sulfúrico concentrado, fazendo com o que os íons de nitrato se juntassem a um derivado de ácido benzoico, formando um composto nitrato avermelhado, que foi dosado por fotometria (aparelho *Photo Lab 6100 Vis Series WTW®*).

No que diz respeito à análise do N-NH_4^+ , foi usado o método de *Nessler* com a utilização do Kit da HACH® (*Ammonia reagente Set, Nessler*, Cat. ID. 2458200). A correlação entre as análises realizadas com o auxílio dos Kits comerciais e as realizadas pelo laboratório de Química do Instituto pode ser observada na Figura 31. No qual é possível observar nos gráficos que os Kits comerciais são, portanto, confiáveis para sua utilização.

Figura 31– Correlação das análises entre o laboratório de Química e Kits comerciais.

Onde: a) análise de Nitrato b) análise de amônia e, c) análise de DQO. (Percentual de erro das análises realizadas pelo laboratório de química: 5%).



Fonte: autor.

3.1.6 Análise estatística dos dados

Neste trabalho, foram analisados os seguintes tópicos de estatística:

1) Período de funcionamento do sistema na Fase 1 - ambos os filtros operando com 25 cm de saturação.

2) Período de funcionamento do sistema na Fase 2 - tempo de operação do sistema, em que o FPM/P1 operou com saturação de 25 cm e o FPM/P2 com saturação de 15 cm.

Em relação aos parâmetros físico-químicos avaliados durante a pesquisa para a verificação do comportamento de similaridade entre os filtros em ambas as fases de funcionamento foram aplicados: teste de variância - Teste U de *Mann-Whitney* e teste *t* de *Student*, com a diferença mínima significativa [LSD] no nível de $p < 0,05$ ou $p < 0,025$.

Previamente, todos os dados foram submetidos a um teste de normalidade dos dados - teste de *Komogorov-Smirnov*.

Para os dados que apresentam normalidade foi então aplicado o teste *t de Student*. Já os dados que não apresentaram normalidade, aplicou-se o teste de hipótese *Mann Whitney*. Onde, teste de U de *Mann-Whitney*: relação de variáveis - Comparação de postos; teste *t de Student*: relação de variáveis - Comparação de médias - Amostras Homocedásticas. Amostras Não Homocedásticas.

3) Verificação de similaridade em relação às diferentes estações do ano. Neste caso, foram utilizados os testes ANOVA e ANOVA F-*Kruskal-Wallis*, com diferença mínima significativa [LSD] no nível de $p < 0,05$, sendo que, para os testes na Fase 2 também foi aplicado o Teste U de *Mann-Whitney*.

Onde, para Análise de Variância (ANOVA - Teste F): relação de variáveis - Comparação de médias. Análise de Variância (ANOVA - Teste de *Kruskal-Wallis*): relação de variáveis - Comparação de postos.

4) Avaliação de similaridade entre o primeiro e último dia do ciclo de alimentação. Para esta variável, foi utilizado o teste *t de Student*, sendo a diferença mínima significativa [LSD] no nível de $p < 0,05$.

Todos os testes foram realizados com o auxílio da ferramenta de estatística SEstaNet (sestanet.ufsc.br) desenvolvido pelo Departamento de Estatística da Universidade Federal de Santa Catarina.

3.2 IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA ATRAVÉS DO USO DE TÉCNICAS MOLECULARES

As análises moleculares foram realizadas em duas condições: em filtros pilotos de escala experimental e filtros de escala real. Portanto, essa seção será dividida em dois tópicos:

- ❖ Procedimentos para análises dos filtros em escala piloto;
- ❖ Procedimentos para análises dos filtros em escala real.

3.2.1 Procedimentos para análises dos filtros em escala piloto

Essa etapa foi realizada com o objetivo de compreender a atividade biológica que ocorre no interior do filtro de um FPM, através dos objetivos específicos propostos – relacionar os resultados microbiológicos e o desempenho dos filtros; avaliar a heterogeneidade e distribuição espacial, temporal e sazonal das populações bacterianas presentes e, assim, nortear novas pesquisas.

Foram feitas 6 (seis) amostragens em cada filtro piloto (três filtros pilotos – denominados FPM/P1, FPM/P2 e FPM/P3) a uma profundidade de 20 cm de sua superfície. Em ambos os lados (direito e esquerdo) do ponto de alimentação foram realizadas as seguintes amostragens:

- i)* a 15 cm do ponto de alimentação;
- ii)* a 30 cm do ponto de alimentação;
- iii)* a 45 cm do ponto de alimentação.

Dois filtros (FPM/P1 e FPM/P2) estavam sob condição aeróbia com fundo saturado anaeróbio, onde foram realizadas duas campanhas de coleta – uma no inverno e a outra no verão. Já para o terceiro filtro (FPM/P3) – para o qual foram realizadas amostras a fim de explorar os dados de condição saturada – foram feitas duas campanhas de amostragem, a saber:

- i)* inverno e totalmente anaeróbio (saturado);
- ii)* verão e totalmente aeróbio

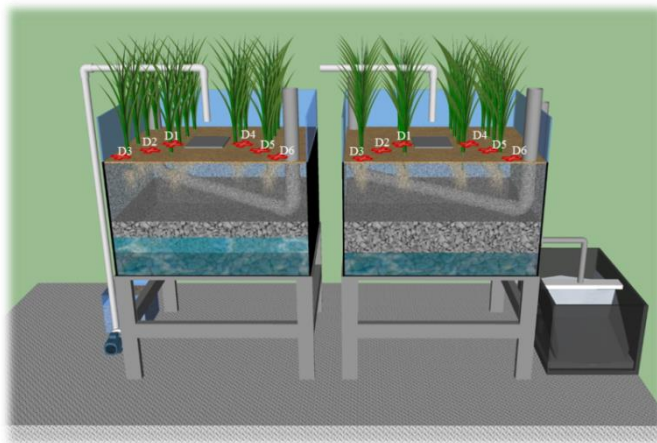
Os pontos de amostragem para a realização das análises da comunidade microbiana podem ser visualizados na Figura 32.

A coleta das amostras foi feita com o auxílio de uma seringa esterilizada de 50 ml cortada na sua base. Um mínimo de 60g foi coletado em cada ponto amostral.

Após a coleta, as amostras foram preservadas em caixas plásticas esterilizadas específicas para análises moleculares até que fossem encaminhadas para o laboratório de Biologia Molecular do IRSTEA/Lyon, onde foram preservadas a - 20°C até o momento de sua utilização.

Figura 32 – Pontos de amostragem para as análises da comunidade microbiana nos filtros pilotos.

Os números representam os pontos de coleta – distância do ponto de alimentação.



Fonte: autor.

As legendas/códigos adotados para os pontos amostrais estão descritos na Tabela 15.

Tabela 15 – Informações sobre as legendas/códigos dos pontos amostrais utilizados para coleta e exposição dos dados.

Filtros	Legenda/código	Informações
FP1	FP1_D1_i a FP1_D6_i	<u>Onde:</u> FP1 = Filtro piloto 1 – FPM/P1 FP2 = Filtro piloto 2 – FPM/P2
	FP1_D1_v a FP1_D6_v	<u>Sendo:</u> D1 e D4 = 15cm do ponto de alimentação D2 e D5 = 30cm do ponto de alimentação D3 e D6 = 45cm do ponto de alimentação
FP2	FP2_D1_i a FP2_D6_i	i = inverno
	FP2_D1_i a FP2_D6_v	v = verão

Continuação da Tabela 15 - Informações sobre as legendas/códigos dos pontos amostrais utilizados para coleta e exposição dos dados.

		<u>Onde:</u> FP3 = Filtro Piloto 3 – FPM/P3
	FP3_D1_An a FP3_D6_An	D1 a D6 = distância do ponto de alimentação. D1 e D4 = 15cm do ponto de alimentação
FP3	FP3_D1_Ae a FP3_D6_Ae	D2 e D5 = 30cm do ponto de alimentação D3 e D6 = 45cm do ponto de alimentação An = completamente anaeróbio/inverno Ae = complemento aeróbio/verão

Fonte: autor.

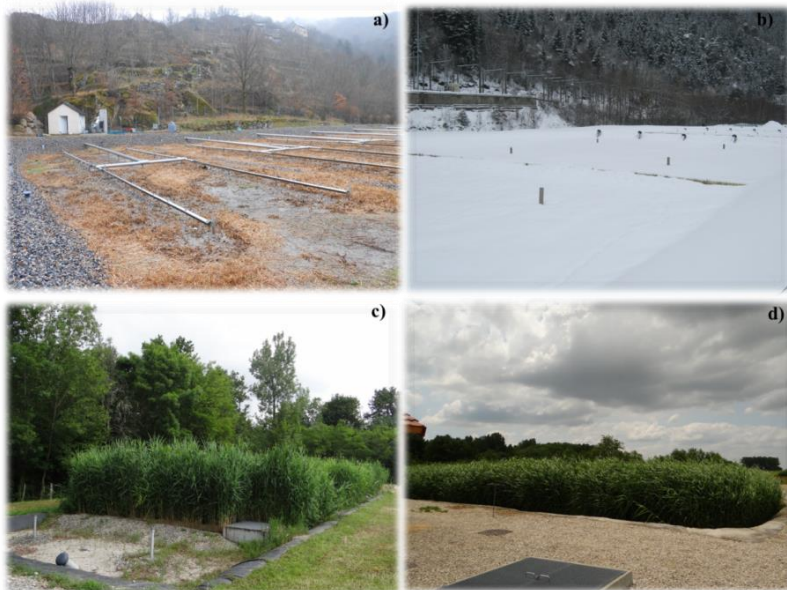
3.2.2 Procedimentos para análises dos filtros em escala real

Os objetivos para a etapa em escala real foram os mesmos estabelecidos para os filtros em escala piloto. O que motivou a realização dessa etapa foi o fato de que o estudo mais aprofundado das comunidades bacterianas ainda é pouco explorado, sendo que a obtenção de informações dessas comunidades bacterianas em escala real mostra-se necessária para que, então, seja possível interpretar corretamente os resultados obtidos em escala piloto. Além disso, a amostragem em escala piloto pode interferir negativamente no processo do tratamento.

Um total de 4 (quatro) estações do Sistema Francês para tratamento de efluente doméstico em escala real foi utilizado para as análises da microbiota dos filtros. As estações escolhidas foram as seguintes: Estação de *Pont de Montvert* (denominada de E1); Estação de *Orelle* (denominada de E2); Estação de *Évieu* (denominada de E3) e; Estação de *Culin* (denominada de E4), destacadas na Figura 33.

Figura 33 – Filtros Plantados com macrófitas em escala real.

Onde, a) Estação de *Pont de Montvert* – E1; b) Estação de *Orelle* – E2; c) Estação de *Évieu* – E3; d) Estação de *Culin* – E4



Fonte: autor.

Essas estações foram escolhidas de acordo com algumas características pré-determinadas, como: filtros em período de funcionamento/período de repouso, estação “jovem” – curto tempo de operação, estação “velha” – longo tempo de operação — e período de verão e inverno.

Duas campanhas de coleta foram realizadas: uma no inverno e outra no verão. As estações 1 e 2 foram avaliadas no inverno e as estações 3 e 4 no período de verão.

A seguir, estão apresentadas, detalhadamente, as características de cada estação escolhida para a realização das análises:

- **E1:** estação com ciclo de alimentação normal, ou seja, 3,5 dias de alimentação e 7 dias de repouso; caracterizada como “Jovem” pois não apresenta camada de lodo depositado.

- **E2:** estação com ciclo de alimentação normal; porém, no momento da amostragem, tal estação se encontrava em repouso há 10

dias e com camada de neve em sua superfície; é caracterizada como “Velha”, ou seja, apresenta depósito de lodo.

- **E3:** estação com ciclo de alimentação normal; caracterizada como “Velha” em funcionamento há 10 anos com depósito de lodo.

- **E4:** estação com ciclo de alimentação normal; caracterizada como “Jovem”, estando em funcionamento há menos de 3 anos e sem camada de lodo depositado.

Para a coleta do material filtrante foi utilizado um trado específico de 100 cm de comprimento e 5 cm de diâmetro (Figura 34), no qual, em seu interior, encontram-se 3 tubos de *plexiglas* de 30 cm cada, gerando, portanto, um total de 90 cm possíveis de serem coletados.

Um mínimo de 60 g foi coletado em cada ponto amostral, que se deu em diferentes distâncias e profundidades. Em relação à distância, a coleta foi realizada a 1 e 2 m do ponto de alimentação, e em relação à profundidade, ocorreu em três seções: superfície/lodo, 15 cm e 30 cm. No entanto, nas estações jovens, por não haver lodo, a coleta ocorreu somente nas duas profundidades: 15 e 30 cm.

Cada estação do Sistema Francês é composta por dois estágios, sendo o primeiro estágio composto por três filtros a fim de alternar as fases de alimentação e repouso, evitando a colmatação e promovendo, assim, a boa oxigenação do filtro. Diante deste fato, mostrou-se necessário coletar amostras nos três filtros a fim de garantir a representatividade do primeiro estágio e atingir o objetivo de analisar as comunidades bacterianas ao longo do ciclo de operação. Esse tipo de campanha foi seguido para as estações E3 e E4. Já para as estações E1 e E2, as amostragens foram realizadas apenas em um momento – em um dia de alimentação para a E1 e, em um dia de repouso para a E2.

A Figura 35 representa os dias do ciclo de operação e os filtros escolhidos para a realização das análises nas estações E3 e E4.

Após a coleta as amostras foram preservadas da mesma forma que as amostras coletadas nos filtros em escala piloto. A Tabela 16 detalha as informações dos pontos amostrais.

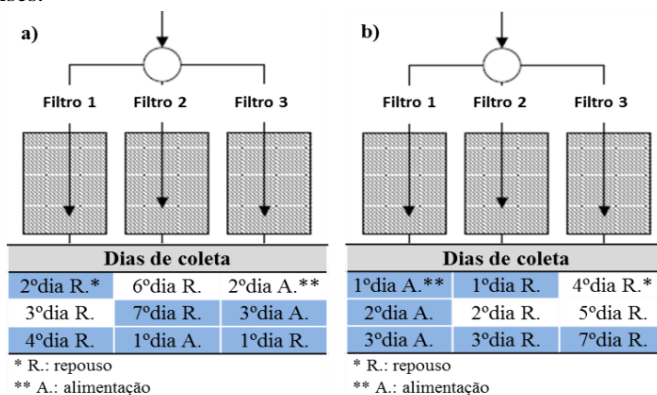
Figura 34 – Coleta das amostras para análises moleculares
Amostragem, b) com destaque para o trado e, c) tubo de *plexiglas*.



Fonte: autor.

Figura 35 – Representação dos três filtros do 1º estágio do Sistema Francês e dias de coleta.

a) E3; b) E4. Em azul estão em destaque os dias utilizados para a realização das análises.



Fonte: autor.

Tabela 16 – Informações sobre as legendas/códigos dos pontos amostrais utilizados para coleta e exposição dos dados.

Filtros	Legenda/código	Informações
E1	E1_D1_15	<u>Onde:</u> E1 = Estação 1 em escala real
	E1_D1_30	D1 = distância do ponto de alimentação – 1 m
	E1_D2_15	D2 = distância do ponto de alimentação – 2 m
	E1_D2_30	15 = 15 cm de profundidade 30 = 30 cm de profundidade
E2	E2_D1_0	<u>Onde:</u> E2 = Estação 2 em escala real
	E2_D1_15	D1 = distância do ponto de alimentação – 1 m
	E2_D1_30	D2 = distância do ponto de alimentação – 2 m
	E2_D2_0	0 = 0 cm – superfície/lodo
	E2_D2_15	15 = 15 cm de profundidade
E2_D2_30	30 = 30 cm de profundidade	
E3	E3_D1_0 (...)*	<u>Onde:</u> E3 = Estação 3 em escala real
	E3_D1_15 (...)	D1 = distância do ponto de alimentação – 1 m
	E3_D1_30 (...)	D2 = distância do ponto de alimentação – 2 m
	E3_D2_0 (...)	0 = 0 cm – superfície/lodo
	E3_D2_15 (...)	15 = 15 cm de profundidade
	E3_D2_30 (...)	30 = 30 cm de profundidade
	*(...) = 1A; 3A; 1R; 2R; 4R ou 7R	1A e 3A = primeiro e terceiro dia de alimentação do filtro 1R, 2R, 4R e 7R = primeiro, segundo, quarto e sétimo dia de repouso do filtro
E4	E4_D1_15 (...)*	<u>Onde:</u> E4 = Estação 4 em escala real
	E4_D1_30 (...)	D1 = distância do ponto de alimentação – 1 m
	E4_D2_15 (...)	D2 = distância do ponto de alimentação – 2 m
	E4_D2_30 (...)	15 = 15 cm de profundidade
		30 = 30 cm de profundidade
	(...)* = 1A; 2A; 3A; 1R; 3R ou 7R	1A, 2A e 3A = primeiro, segundo e terceiro dia de alimentação do filtro 1R, 3R e 7R = primeiro, terceiro e sétimo dia de repouso do filtro

Fonte: autor.

3.2.3 Análises Moleculares

Os procedimentos de análise foram realizados no laboratório de Ecologia microbiana de ecossistemas aquáticos (EMHA) do

IRSTEA/Lyon, conjuntamente com a equipe de Tratamentos de águas residuárias/Engenharia de Processos/Microbiologia de Processos do IRSTEA de Paris e do Laboratório Integrado de Meio Ambiente (LIMA), na UFSC, Brasil.

Para a análise da comunidade microbiana foram adotadas as seguintes técnicas de biologia molecular:

- PCR (Reação em cadeia da polimerase), seguido de
- DDGE (Eletroforese em gel de gradiente desnaturante)
- Sequenciamento
- qPCR (Reação em cadeia de polimerase em tempo real).

3.2.3.1 Métodos de preparação para as amostras: obtenção do biofilme para análise

Pelo fato de o material filtrante ser composto por britas e não haver dados suficientes na literatura em relação à retirada do biofilme desse tipo de material filtrante foi necessário desenvolver um protocolo para a remoção da biomassa aderida. Para isso, vários procedimentos foram testados a fim de obter um protocolo adequado com a maior concentração de DNA.

Após testar esses diferentes procedimentos — dentre os quais havia o uso de ultrassom, de diferentes tempos de agitação, do uso de substâncias químicas —, foi feita em triplicata a extração do DNA da amostra e, em seguida, a dosagem do DNA.

O procedimento que obteve a maior concentração de DNA e que possuiu o maior grau de repetitividade foi, então, o escolhido como método a ser aplicado para a retirada da biomassa. A descrição dos testes dar-se-á no item dos Resultados e Discussões, visto ser um procedimento desenvolvido nesta tese. O detalhamento do protocolo encontra-se em Apêndice A.

3.2.3.2 PCR - Reação em cadeia da polimerase

Para que esse procedimento fosse realizado, três etapas foram seguidas:

- 1^a - Extração do DNA genômico;
- 2^a - Reação em cadeia da polimerase (PCR) propriamente dita;
- 3^a - Verificação do DNA amplificado em gel de agarose.

O DNA genômico foi extraído utilizando o Kit de extração *KIT POWER SOIL™ DNA ISOLATION KIT (MOBIO® Laboratórios)* de acordo com o protocolo do fabricante.

Após a extração do DNA, o material foi armazenado à -80 ou -20°C até o momento de sua utilização.

A qualidade do DNA extraído foi verificada em gel de agarose 1,5% e, após sua verificação, o DNA foi quantificado pelo equipamento QUBIT® *Invitrogen*. Após a dosagem, o DNA foi submetido a diluições a fim de garantir que cada amostra contivesse 5ng/μl.

Feito a extração, dosagem e diluição, o DNA foi então submetido à amplificação por PCR, utilizando diferentes iniciadores.

Posterior à extração do material genômico, foi executada a técnica de amplificação PCR utilizando iniciadores específicos para DDGE — procedimento complementar necessário para obtenção dos fragmentos do RNA 16S.

Os iniciadores utilizados para a realização da PCR estão apresentados na Tabela 17.

Além dos iniciadores citados na Tabela 17, as soluções utilizadas no procedimento foram as seguintes: Buffer ABgene®, MgCl₂, dNTP Thermo®, T4Gene® e a Taq polimerase ABgene®. A composição total do Mix pode ser visualizada na Tabela 18.

Tabela 17 – Sequência e características dos iniciadores utilizados para a PCR.

<i>Primers</i>	GC-grampo	Sequência	Tamanho / Ref. Bibliográfica
CTO 189f A/B ^b GC	CCG CCG CGC GGC GGG CGG GGC GGG GGC ACG GGG	GGA GRA AAG CAG GGG ATC G	465 pb
CTO 189f C ^b GC	β- AOB CCG CCG CGC GGC GGG CGG GGC GGG GGC ACG GGG	GGA GGA AAG TAG GGG ATC G	Kowalchuk (1997)
CTO 654R		CTA GCY TTG TAG TTT CAA ACG C	

Fonte: autor.

Tabela 18 – Composição do Mix para o grupo de Bactérias Nitrificantes

Soluções	[C] final
PCR Buffer	1X
MgCl ₂	1,5 mM
dNTP	250 µM
T4	
CTO 189F AB	0,32 µM
CTO 189F C	0,16 µM
CTO 654 R	0,48 µM
Taq polimerase	0,625 U
H ₂ OΔ	x
DNA	2,5 µl

Fonte: autor.

As reações de amplificação foram executadas em Termociclador « PCR (*Eppendorf Mastercycler pros*) » sob as seguintes condições desejadas, descritas a seguir na Tabela 19.

Tabela 19 – Condições de amplificação para as bactérias nitrificantes

Bactérias Nitrificantes		
	Duração = 1h30	Temperatura
Ativação Hot Start	15 min	95°C
Desnaturação	30 s	94°C
Hibridização	30 s	57°C
Alongamento	1 min	72°C
Alongamento final	5 min	72°C

Fonte: autor.

Um esquema representativo da técnica da PCR encontra-se como Apêndice B.

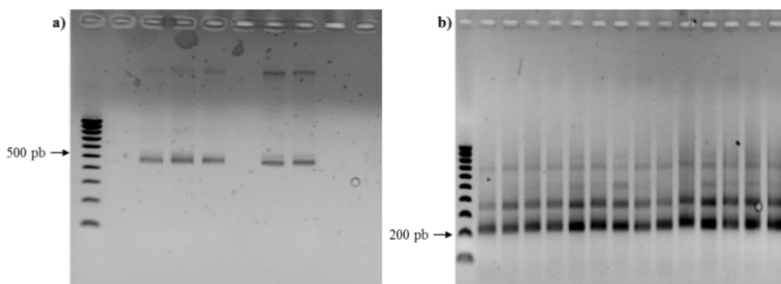
A análise dos produtos amplificados foi feita por eletroforese em gel de agarose 1.5% (Invitrogen®), corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL) (Sigma®) em tampão TAE 1X (40 mM Tris; 19 mM ácido acético glacial; 1 mM EDTA) e visualizados sob luz UV.

Os tamanhos dos fragmentos amplificados, que podem ser visualizados na

Figura 36, foram determinados por comparação com o marcador molecular de 100 pb – 1Kb (Sigma-Aldrich®).

Figura 36 – Padrão dos fragmentos dos grupos de bactérias analisados no estudo.

a) gel da amplificação do grupo das CTO (nitrificantes) – tamanho de amplificação: 465 pb. b) gel da amplificação do grupo das bactérias totais – tamanho de amplificação: 233 pb.



Fonte: autor.

Após amplificação, o produto da PCR foi conservado a 4°C até o momento de sua utilização na etapa subsequente de separação dos segmentos amplificados na PCR usando Eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE).

3.2.3.3 Eletroforese em gel de gradiente desnaturante – DGGE

Após a PCR, as amostras foram depositadas em um gel de acrilamida/bisacrilamida com concentração de 0,8% (v/v) de agarose com diferentes gradientes de concentrações desnaturantes de formamida e ureia. Posteriormente, foram submetidas à migração eletroforese com tampão TAE 50X (Tris-Acetato-EDTA).

Durante a migração, os fragmentos de DNA em condição desnaturante cada vez maior entram em processo de desnaturação das bandas compostas de bases A-T e G-C. O gradiente utilizado foi de 15 e 55%, sendo previamente preparadas as soluções estoque de 0% e 100% (0% = Acrilamida 40%, TAE 50X e H₂O ultrapura; 100% = Acrilamida 40%, TAE 50X, Ureia, formamida).

Cada solução desnaturante recebeu 100 µl de Persulfato de amônio 10% (APS) e 10 µl de Tetrametiletlenodiamina (TEMED). Após a solidificação do gel (aproximadamente 1h), as placas foram transferidas para cuba de DGGE. Nessa cuba foram adicionados 7L compostos por 70 ml de TAE 50X e 6930 ml de água destilada.

As características de “corrida” foram as seguintes: temperatura de corrida do gel foi constante: 60°C; voltagem de 200 V e duração de

6h. Essas condições foram baseadas no trabalho de Kowalchuk *et al.* (1997), no qual tais autores utilizaram os mesmos iniciadores deste trabalho.

Após o término da corrida, o gel foi retirado da cuba e imerso para coloração por 30 minutos em solução de Gel Red (10,000x 0,5mL concentrado ID: 41003. Uniscience®) em tampão TAE 50X.

Posterior a coloração, as aquisições das imagens dos géis foram feitas em aparelho Fotodocumentador L-PIX STi image (Loccus Biotecnologia®). Os perfis das amplificações foram analisados com o programa GelCompar II versão 6.5 (BioSystematica®, Wales, UK).

A fim de aprofundar o conhecimento sobre as espécies detectadas pelos géis, o DNA de interesse contido em cada banda obtida foi recolhido com o auxílio de uma micropipeta estéril. O conteúdo recolhido foi diluído em 50 μ L de água ultra purificada, para posteriormente ser utilizado como molde no produto de PCR que foi purificado para ser usado nas análises de sequenciamento.

Para o sequenciamento do DNA das bandas separadas por DGGE foi utilizada a técnica de PCR nas mesmas condições citadas anteriormente.

As etapas deste procedimento podem ser visualizadas no Apêndice C.

❖ Análises estatísticas

As estruturas da comunidade bacteriana das amostras foram analisadas com o programa GelCompar II versão 6.5 (BioSystematica, Wales, UK) a partir da análise de agrupamento hierárquico, utilizando índice de *Jaccard* e o modelo de agrupamento por UPGMA.

Para o teste estatístico de similaridade foi utilizada a ferramenta estatística Escalonamento Multidimensional Não Métrico (NMDS). Uma técnica de ordenação que tem por objetivo descrever a estrutura de uma matriz complexa. O princípio desta técnica é construir uma matriz de distâncias entre os sítios amostrais usando informações das espécies em cada sítio. Algumas dessas distâncias levam em consideração a composição das amostras, como, por exemplo, lista de espécies, dados de presença e ausência das espécies nas amostras, entre outras. Assim, calcula-se a distância entre todos os pares possíveis de amostras, uma vez calculadas elas são arranjadas numa matriz.

O resultado do NMDS é um diagrama de dispersão que melhor reflete a matriz. Quando duas amostras possuem um baixo valor de distância, elas ficam posicionadas em locais próximos uma da outra. A

interpretação dos resultados consiste em verificar a semelhança entre as amostras, indicada pela proximidade espacial ao longo dos eixos de ordenação (bi ou tridimensional) (MELLO e HEPP, 2008).

3.2.3.4 qPCR (Reação em cadeia de polimerase em tempo real)

Para essa técnica quantitativa, o princípio do procedimento é o mesmo da PCR convencional, com a diferença na amplificação do DNA, que é medido continuamente utilizando agentes intercalantes de cadeia dupla de DNA ou de sondas fluorescente.

Os iniciadores utilizados estão apresentados na Tabela 20.

Tabela 20 – Sequência e características dos iniciadores utilizados para a qPCR

<i>Primers</i>	<i>Sequência</i>	<i>Tamanho Amplicon</i>	<i>Referência</i>
1055f	ATGGCTGTC GTCAGC T	352 pb	Ferris <i>et al.</i> (1996)
16S	ACGGGC GGTGTG TAC		Lane (1991) Ye e Zhang (2010)
AmoA-1f AmoA-2r	Nitrificantes GGG GTT TCT ACT GGT GGT CCC CTC KGS AAA GCC TTC TTC	491 pb	Rotthauwe <i>et al.</i> (1997)

Fonte: autor.

A composição do Mix para os dois grupos de bactérias analisados neste estudo – nitrificantes e totais - pode ser visualizada na Tabela 21.

Tabela 21 - Mix da qPCR para o grupo de bactérias totais e nitrificantes

<i>Soluções</i>	<i>[C] final</i>
Iq buffer	1X
1055 F	0,6 µM
1392R	0,6 µM
H ₂ O	
Total	0,5 µM
Iq buffer	1X
AmoA 1F	0,4 µM
AmoA 2R	0,4 µM
H ₂ O	x

Fonte: autor.

A qPCR foi realizada pelo aparelho (*BioRad/CFX96 Real-Time System C1000 cycleur thermique*) de acordo com as características desejadas para o procedimento (Tabela 22).

Tabela 22 - Condições da amplificação para os grupos analisados pela qPCR

Bactérias Totais		
Duração	Temperatura	
3 min	95°C	
30s	95°C	
30s	60°C	x 40
30s	72°C	
10 min	65°C --> 95°C	
Bactérias Nitrificantes		
Duração	Temperatura	
3 min	95°C	
30s	95°C	
30s	56°C	x 40
45s	72°C	
10 min	65°C --> 95°C	

Fonte: autor.

Após o término da amplificação, as amostras foram armazenadas na geladeira a 4°C. Os resultados da qPCR foram automaticamente registrados no aparelho, no qual, num segundo momento, foi possível recuperar os dados e analisá-los com a ajuda do Logicial Bio-Rad®CFX *Manager Quantity One*.

As curvas padrão foram obtidas através de uma diluição em série de um plasmídeo contendo o gene bacteriano *amoA* ou 16S de de 1E07 à 1E02 cópias de gene por microlitro.

As etapas do procedimento da qPCR foram resumidas e encontram-se no Apêndice D. Bem como, um fluxograma – Apêndice E – das técnicas utilizadas para averiguação da comunidade bacteriana presente nos filtros plantados com macrófitas deste estudo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este capítulo dar-se-á em duas unidades, sendo a primeira referente aos resultados da avaliação físico-química dos pilotos de filtros plantados com macrófitas — construídos para avaliação da remoção do nitrogênio total, mediante saturação parcial em um único estágio do Sistema Francês – Artigo 1 (publicado). — e a segunda na qual são apresentados os resultados microbiológicos — com ênfase nos microorganismos envolvidos no processo da remoção do nitrogênio – Artigo 2 e 3 (em andamento).

4.1 Resultados físico-químicos dos FPM em escala piloto

4.1.1 Características gerais da água

As características gerais da qualidade da água de entrada em relação aos parâmetros analisados (concentrações médias de entrada e carga hidráulica) durante o período experimental estão resumidas na Tabela 23.

Os dados apresentados nesta tabela estão divididos de acordo com a condição de saturação dos filtros (Fase 1 e Fase 2 — lembrando que a Fase 1 corresponde ao período em que ambos os filtros operaram com 25 cm de fundo saturado, e a Fase 2, ao período no qual filtro 1 continuou a operar com 25 cm e o filtro 2 passou a operar com 15 cm de saturação).

Em relação às concentrações de entrada e saída (mg.L^{-1}) para os parâmetros analisados são retratados em suas diferentes situações de saturação através de gráficos *box plot* expostos na Figura 37 e Figura 38.

No que se refere às concentrações para os parâmetros SST e DQO, é possível observar que as concentrações de entrada variaram durante todo o experimento (na Fase 1, para o FPM/P1, variação de SST foi de 25 - 675 mg.L^{-1} e para DQO: 41 - 218 mg.L^{-1} ; para o FPM/P2, variação de SST: 32 - 887 mg.L^{-1} ; DQO: 16 - 216 mg.L^{-1} . Na Fase 2, para o FPM/P2 a variação de SST foi de 98 - 434 mg.L^{-1} e DQO: 42 - 173 mg.L^{-1}).

Para as formas de nitrogênio (N-NH_4^+ e NTK) (Figura 38) variações menores foram encontradas, com médias de 51 mg.L^{-1} e 65 mg.L^{-1} , respectivamente. Porém, houve alguns valores bastante diluídos, ocasionados provavelmente pelos eventos de chuva. Cabe lembrar que a rede de esgotos da França é em conjunto com rede pluvial.

Tabela 23 – Características de entrada dos pilotos FPM/P1 e FPM/P2 durante as diferentes fases de saturação. A tabela reúne todos os valores durante o período de operação e, estão expressos na unidade mg.L^{-1} , exceto quando indicado.

Parâmetros	Fase 1 ^a				Fase 2 ^b				Fase 2 ^b			
	FPM/P1 - 25 cm				FPM/P2 - 25 cm				FPM/P2 - 15 cm			
	Concentração (mg.L^{-1})				Concentração (mg.L^{-1})				Concentração (mg.L^{-1})			
	Média	Σ^c	95% SEM ^d	n ^e	Média	Σ^c	95% SEM ^d	n ^e	Média	Σ^c	95% SEM ^d	n ^e
DQO^f	124	34	0,44	74	132	32	0,52	58	108	38	1,32	26
NTK	65	24	0,28	67	68	25	0,4	49	57	21	0,83	25
N-NH₄⁺	51	21	0,26	67	54	22	0,35	49	44	17	0,70	25
SST	263	128	1,43	89	264	170	2,69	67	252	107	4,5	25
Carga hidráulica (m/d)^g	0,23	0,06	-	-	0,23	0,06	-	-	0,23	0,06	-	-

Figura 37 – Concentrações em termos de entrada e saída para os diferentes parâmetros ao longo do tratamento. FPM/P1 (25 cm de fundo saturado), FPM/P2 com as diferentes fases de saturação (25 cm e 15 cm de fundo saturado). a) DQO dissolvida; b) sólidos suspensos totais.

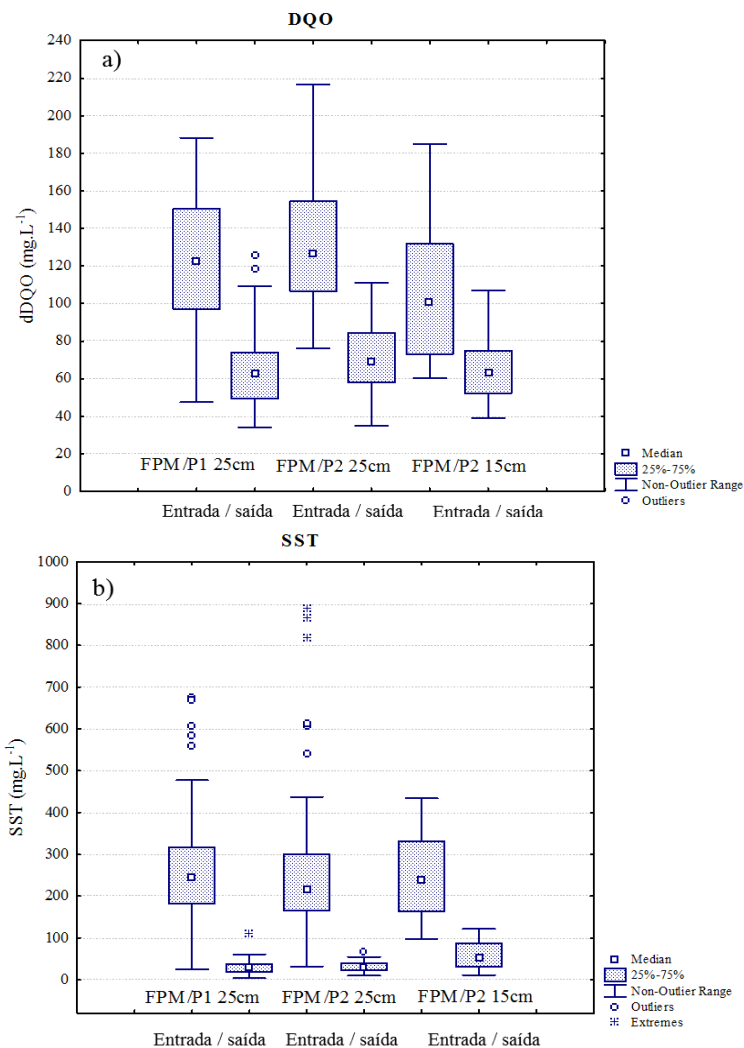
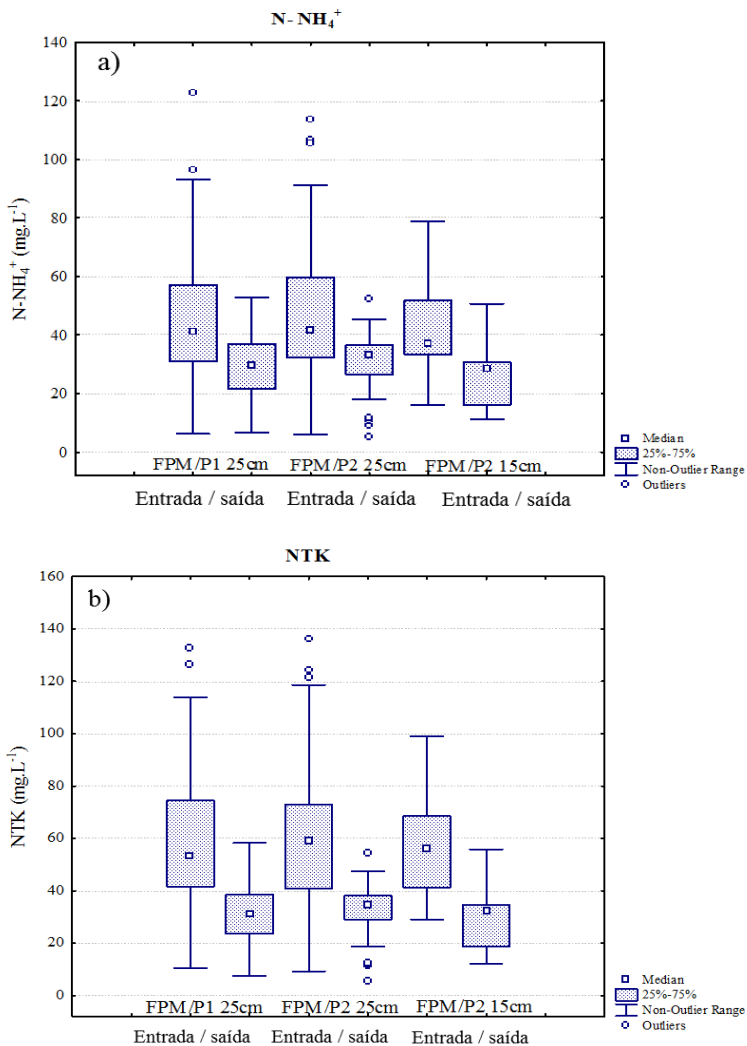


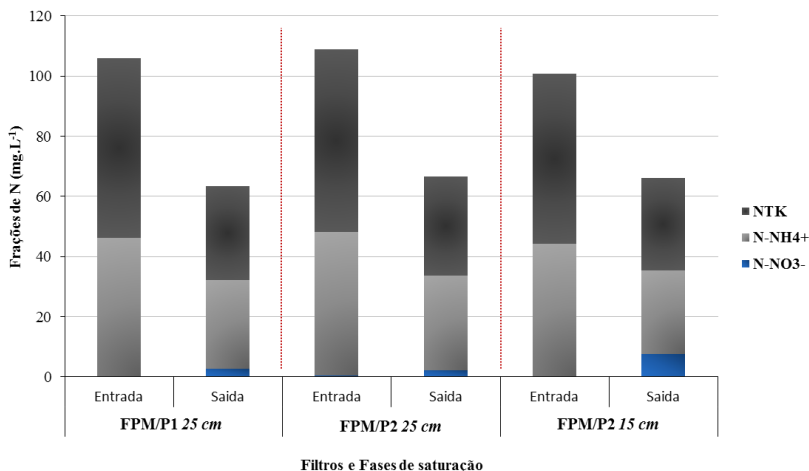
Figura 38 – Concentrações em termos de entrada e saída para os diferentes parâmetros ao longo do tratamento

FPM/P1 (25 cm de fundo saturado), FPM/P2 com as diferentes fases de saturação (25 cm e 15 cm de fundo saturado) a) amônio; b) nitrogênio total.



Os valores em concentrações de entrada e saída para o nitrogênio também podem ser visualizados na Figura 39, a qual representa os valores médios das frações de N ao longo do experimento para ambos os filtros em suas fases de saturação.

Figura 39 – Frações de nitrogênio ao longo do experimento. (mg.L^{-1} de N-NO_3^- , N-NH_4^+ e NTK)



Os valores de concentração para NTK foram obtidos através de uma estimativa pela Equação 16:

Equação 16 – Concentrações para NTK

$$N - \text{NH}_4^+_{\text{entrada}} + \text{SST}_{\text{entrada}} \times 0,05$$

Onde 0,05 é a porcentagem de Norg/SST de entrada em águas residuárias com base em medições. Esse valor – 0,05 – está de acordo com os valores obtidos por Molle, (2003), nos quais o autor afirma que a porcentagem de nitrogênio orgânico nos sólidos em suspensão em águas residuárias é de 3 a 5%, onde, 0,7% são depositados na superfície do filtro e o restante é transformado pela nitrificação. Sendo que a nitrificação é calculada a partir dos rendimentos observados em NTK (nitrogênio dissolvido + particulado). Essa aproximação é considerada mais realista do que os cálculos baseados em concentrações de nitrato,

visto que existe certa dificuldade em saber o balanço exato do nitrogênio devido aos fenômenos de estocagem e liberação no período de alimentação e repouso.

Com base em estudos feitos anteriormente, o cálculo de saída também foi realizado com o valor de 0,05, em que, teoricamente, a quantidade de efluente que adentra no filtro é a mesma que sai. Vale ressaltar que a evapotranspiração não é um fator negligenciável, porém neste trabalho não foram realizadas medições deste parâmetro. De todo modo, foi realizada uma análise mais aprofundada de vazão de entrada e saída em todo o período do experimento, fator que permite afirmar que o valor de perda por evapotranspiração foi por volta de 10%.

As concentrações de entrada e saída para os parâmetros analisados nas duas Fases ao longo do tempo, também podem ser visualizados nos gráficos da Figura 40 e Figura 41.

Os valores para os parâmetros N-NH₄⁺, N-NO₃⁻ e DQO dissolvida foram obtidos através da utilização dos Kits comerciais WTW®, como descrito em Materiais e Métodos. Após a realização das análises, os valores obtidos através dos Kits foram submetidos a uma correlação com os valores obtidos pelas análises realizadas no laboratório de química do IRSTEА (erro = 5%). Fez-se necessária essa correlação a fim de validar os resultados obtidos através dos Kits comerciais. As correlações obtidas para as formas de nitrogênio (N-NH₄⁺ e N-NO₃⁻) e para a DQO foram de R²= 0,9061; R²= 0,9572 e R²= 0,9273, respectivamente. Portanto, os resultados obtidos pelos kits podem ser considerados confiáveis.

Para filtros de primeiro estágio em escala real do Sistema Francês, a carga hidráulica projetada é em torno de 0,36m/d (2m² EH-1) (MOLLE et al., 2005). Para este estudo a carga hidráulica real aplicada ao longo do experimento para cada filtro no período de alimentação foi em torno de 0,23 m/d.

Figura 40 – Concentrações de DQO dissolvida e SST de entrada e saída (mg.L^{-1}) e eficiência (%) ao longo do período de operação.

a) FPM/P1 – 25 cm saturação; b) FPM/P2 – 25 cm e 15 cm de saturação.

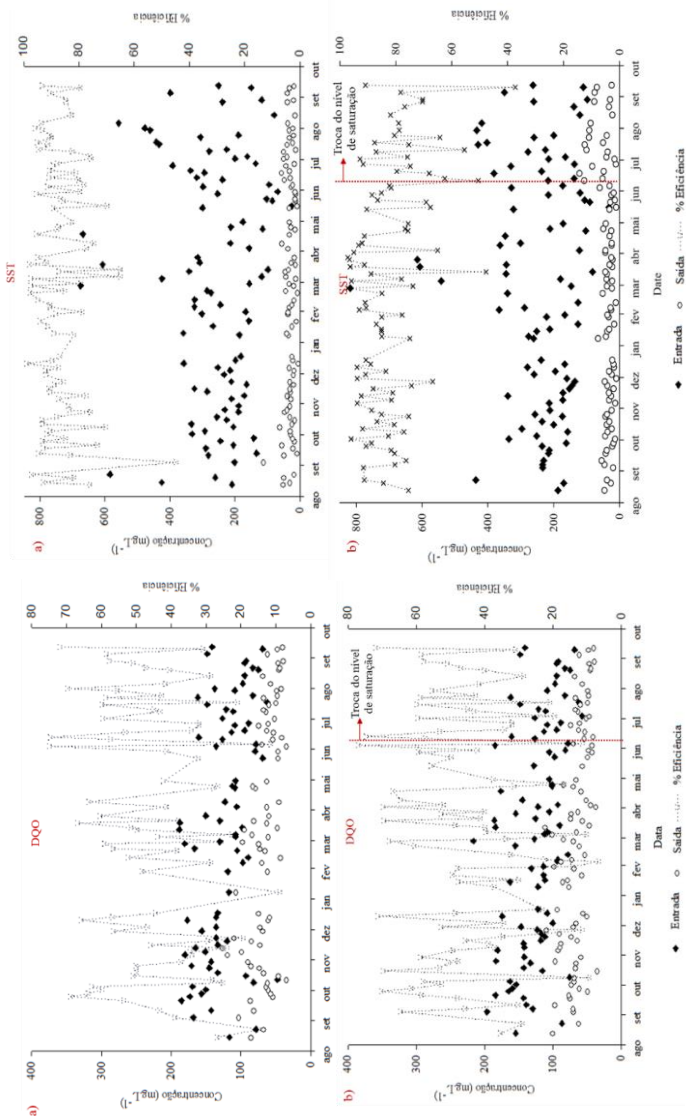
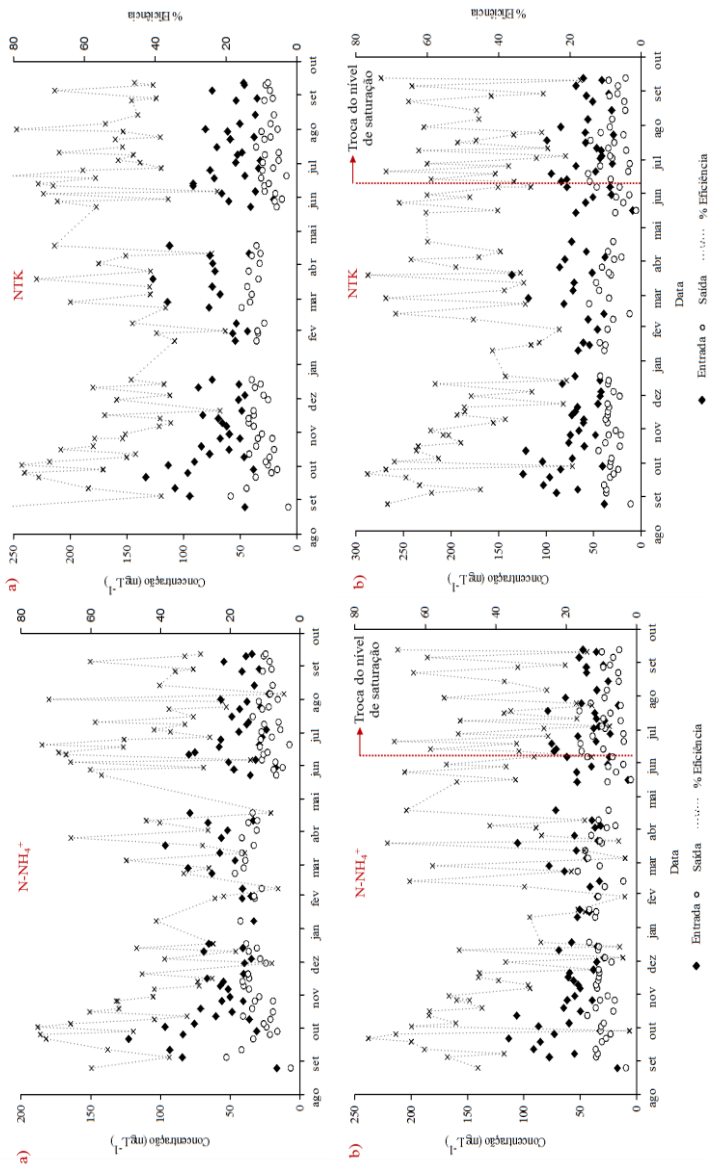


Figura 41– Concentrações de N-NH_4^+ e NTK de entrada e saída (mg.L^{-1}) e eficiência (%) ao longo do período de operação.

a) FPM/P1 – 25 cm saturação; b) FPM/P2 – 25 cm e 15 cm de saturação.



4.1.2 Propriedades de funcionamento do filtro

4.1.2.1 Hidráulica

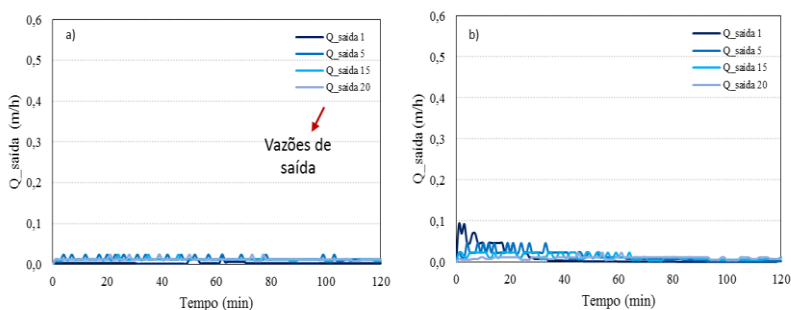
Durante o experimento, as taxas de infiltração variaram de acordo com a estação do ano, com o desenvolvimento dos vegetais e o acúmulo de matéria orgânica depositada na superfície do filtro, o que ocasiona impacto no fluxo e na oxigenação.

Taxas de infiltração maiores foram observadas no início de operação dos filtros, em razão da baixa densidade das macrófitas (resultado também visualizado pelo trabalho de Molle et al., 2006) e sobretudo durante o inverno, quando a matéria orgânica foi fracamente mineralizada devido às baixas temperaturas.

Durante o primeiro inverno do experimento, ambos os filtros pilotos passaram por um período de colmatção, o que por sua vez acarretou em problemas de oxigenação, em lenta drenagem e valores baixos e constantes de velocidade máxima. Esse fato pode ser visualizado na Figura 42. A colmatção também foi verificada através das sondas de oxigênio, redox e sondas ultra-som, as quais registram a formação ou não de lâmina d'água na superfície do filtro indicando uma possível colmatção.

Figura 42 – Comportamento hidráulico das vazões de saída ao longo de uma batelada - período de colmatção.

a) FPM/P1 e b) FPM/P2 (ambos com 25cm de saturação)



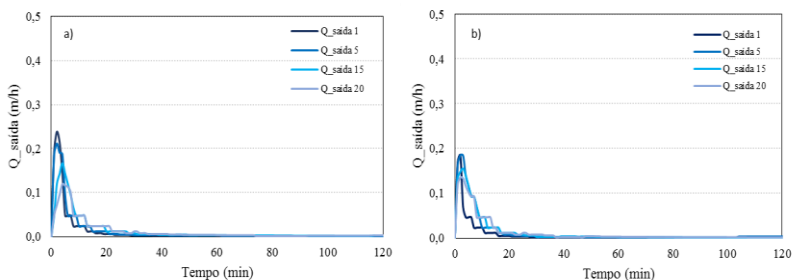
Os picos de velocidade máxima de drenagem foram de aproximadamente 0,02 e 0,05 m/h para FPM/P1 e 2, respectivamente, no inverno.

Após a constatação da colmatção, o ciclo de operação projetado foi alterado de 3,5 para 2,5 dias de alimentação e então 4,5 dias de repouso. A partir dessa mudança e da elevação da temperatura, os filtros mostraram a sua capacidade de resiliência com uma boa recuperação.

Ao longo do período restante do estudo, ambos os filtros passaram a ter um comportamento hidráulico semelhante com picos de velocidade máxima entre 0,10 -0,45 m/h. Com a chegada do verão e maior desenvolvimento das plantas, os filtros apresentaram mais estabilidade e melhor comportamento hidráulico (Figura 43).

Figura 43 – Comportamento hidráulico das vazões de saída ao longo de uma batelada – período não colmatado.

a) VFCW 1: 25cm de saturação; b) VFCW 2: 15cm de saturação



Cabe salientar que a alteração do nível de saturação no FPM/P2 entre a Fase 1 e Fase 2 ocorrida após 12 meses de funcionamento também implicou em alterações no fluxo hidráulico. Nesse período de transição foi observado um aumento da velocidade máxima de 0,10 para 0,25 m/h, sendo maior que a velocidade máxima do FPM/P1, que continuou a operar com 25 cm de saturação. Após uma semana da mudança de saturação houve a estabilização hidráulica do sistema.

Assim, vimos que, hidraulicamente, temos um sistema em termos de bateladas que evoluiu significativamente sua condição de funcionamento do inverno para o verão. Isso certamente influenciou na condição de oxigenação e potencial redox no interior do filtro, o que significa que a condição hidráulica influencia na eficiência do tratamento do nitrogênio.

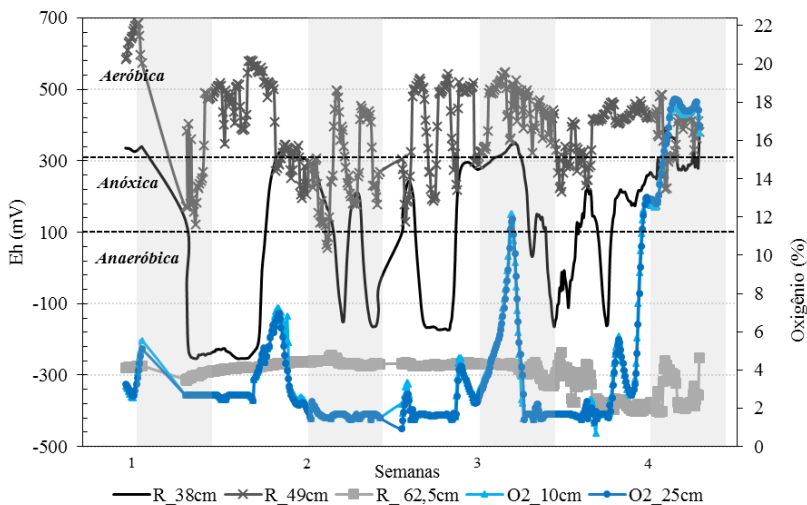
4.1.2.2 Oxigênio e Potencial redox (Eh)

No que diz respeito aos resultados para o oxigênio e potencial redox, foi possível observar que mudanças nas condições de fluxo impactaram tanto o Eh quanto o teor de oxigênio no meio filtrante de ambos os filtros.

Além disso, quando os filtros estavam em condição de colmatção, a renovação de oxigênio pela superfície foi limitada, agravando as condições oxidantes. Esse fato é apresentado, a título de exemplificação, na Figura 44, que indica o Eh em relação ao eletrodo padrão de hidrogênio (SHE) e o teor de oxigênio no FPM/P1 durante a colmatção no final do inverno.

Figura 44 – Evolução das Eh e teor de oxigênio durante o período de colmatção para FPM/P1.

Legenda: as listras cinza e branco representam os períodos de alimentação e repouso, respectivamente. As linhas pontilhadas dividem as camadas de oxigenação em função do potencial redox.



As zonas de condição redox (aeróbica, anóxica e anaeróbica) demarcadas na Figura 44 são bem definidas por alguns autores (Tanner *et al.*, 2002; Diáková *et al.*, 2006; Dusek *et al.*, 2008) e também foram apresentadas no item da Revisão bibliográfica desta tese.

Valores abaixo de - 300 mV indicam a atividade de bactérias metanogênicas. No entanto, o valor de Eh pode diminuir temporariamente para valores inferiores ao esperado caso os processos microbianos possuam atividade intensa (DUSEK *et al.*, 2008).

Durante esse período em que os filtros estiveram colmatados é possível observar que a sonda instalada na zona aeróbia (Eh_38 cm) registrou valores de 300 a -200 mV, correspondendo a condições anóxicas e anaeróbias. Esses valores negativos demonstram a condição limitada da presença de oxigênio, o que também pode ser visto pelos valores das sondas de O₂ que são extremamente baixos, em torno de 2 a 6%.

Para a sonda intermediária (Eh_49 cm), os valores permaneceram na faixa de 100 a 500 mV. Lembrando, esta sonda sofre influência do dreno de aeração, explicando os valores aeróbios registrados.

A sonda localizada na zona anaeróbia (Eh_62,5 cm) manteve seus valores constantes sem sofrer influência pela colmatção devido à sua localização, pois esta foi instalada na zona de saturação anaeróbia.

Em outras palavras, exceto para o potencial redox medido a uma profundidade de 49 cm, todas as medições (oxigênio e Eh) apresentaram continuamente baixas condições de oxidação e alta redução. Em períodos de colmatção e alimentação, pouco ou nenhum oxigênio foi introduzido para o interior do filtro, tendo até mesmo a parte superior dos filtros privada de oxigênio.

Todavia, nota-se que no final do período apresentado houve uma melhoria gradual dos valores da sonda Eh_38 cm e de oxigênio, indicando o fim da colmatção. Este fato ocorreu com a introdução progressiva do oxigênio durante o período de repouso do filtro, juntamente com outros fatores como o aumento da temperatura, desenvolvimento das plantas e aumento dos dias de repouso, o que acarretou na melhoria progressiva da taxa de infiltração e difusão do oxigênio.

A Figura 45 apresenta a evolução do redox e teor de oxigênio nos filtros FPM/P1 e FPM/P2 no início da Fase 2, sob condições de fluxo normais, sem colmatção.

É possível observar que as condições de oxidação/redução foram fortemente afetadas pelo ciclo de alimentação e repouso, exceto na parte inferior do filtro onde as condições anóxicas estavam presentes. As zonas insaturadas tornaram-se menos oxidativas durante o período de alimentação devido ao aumento do consumo de oxigênio pela biomassa, voltando a condições bem oxidadas durante o período de repouso.

Para o FPM/P1 na Fase 1 (Figura 45a) observaram-se valores de Eh para a sonda R_38 cm variando entre 100 e 450 mV. Esses valores positivos encontrados indicam que nessa zona prevalece a condição aeróbia.

Já para a sonda R_49 cm foram registrados valores na faixa de 30 e 400 mV. Valores inferiores aos encontrados na zona aeróbia são esperados, visto que ela está localizada na zona anóxica do filtro. No entanto, pelo fato do dreno de aeração estar localizado também nessa altura, os valores de Eh foram então influenciados pela entrada do O₂ através do dreno, o que gerou um aumento destes valores. Além disso, a sonda, estando localizada entre o meio aeróbio e o meio anaeróbio de 25 cm, sofre bastante variação em seus valores, o que pode ser observado claramente através do gráfico.

Para a sonda localizada no fundo do filtro (R_62,5 cm), os valores permaneceram estáveis entre -200 a -300 mV, revelando as condições anaeróbias do fundo saturado, condição esta que permite afirmar que a zona de saturação se manteve em condições adequadas para a desnitrificação durante o experimento. Não foram registrados valores indesejados abaixo de -300 mV, que indicariam uma atividade metanogênica.

Outros estudos também relatam valores similares nas diferentes zonas de oxigenação (TANNER *et al.*, 2002; DIÁKOVÁ *et al.*, 2006; DUSEK *et al.*, 2008; HUNTING e VAN DER GEEST, 2011; CORBELLA *et al.*, 2014).

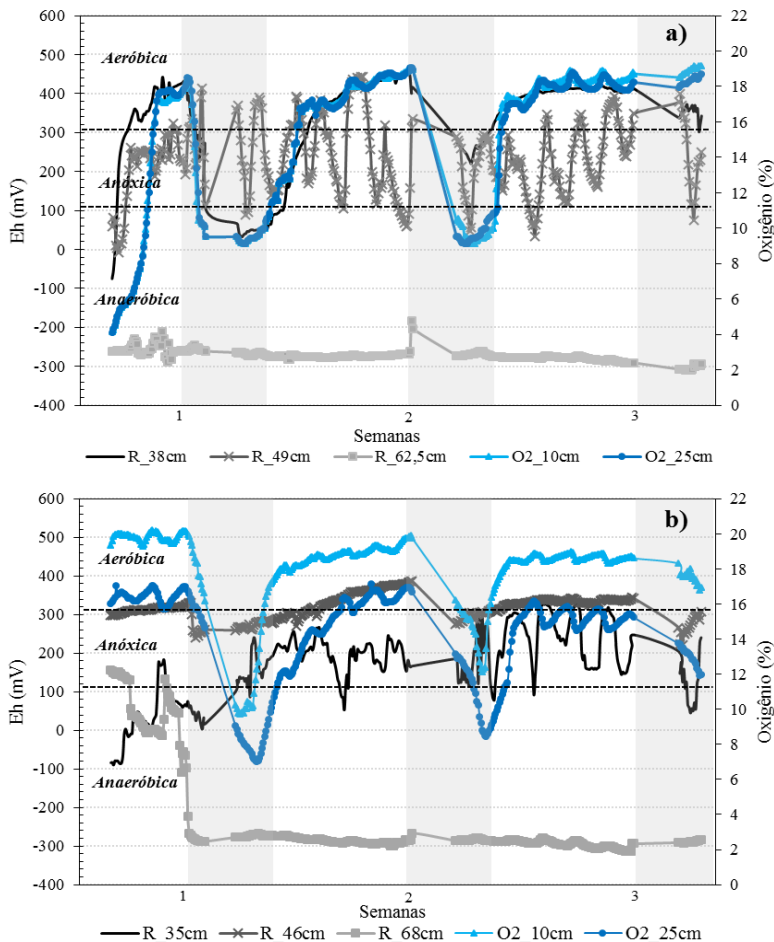
Em relação ao FPM/P2 (Figura 45b), o gráfico representa o momento em que houve a troca do nível de saturação (Fase 2).

Como pode ser observado em relação à sonda R_35 cm, esta apresenta uma grande variação no início do gráfico, ou seja, no período transitório de mudança do nível, apresentando um comportamento de tendência de elevação dos valores ao longo do tempo.

A sonda R_46 cm manteve-se estável com valores na média de 350mV. Esse valor mais elevado comparado com a fase de 25 cm de saturação é explicado justamente pela troca do nível, onde é gerado um aumento da condição aeróbia e anóxica. Além disso, como já ressaltado anteriormente, o dreno de aeração localizado nessa altura também contribui para o aumento dos valores da sonda.

Figura 45 – Evolução do Eh e teor de oxigênio no início da Fase 2.

(a) FPM/P1: zona de saturação de 25 cm e, (b) FPM/P2: zona de saturação de 15 cm. As listras cinza e branco representam os períodos de alimentação e repouso, respectivamente. As linhas pontilhadas dividem as camadas de oxigenação em função do potencial redox.



Para a sonda R_68 cm, nota-se claramente a influência da troca do nível de saturação. Nessa fase transitória, onde houve o esvaziamento da zona saturada, foram registrados valores positivos. Assim que a zona saturada foi novamente alimentada, retornou-se a valores negativos, que

permaneceram estáveis e em torno de -300 mV. Apesar da diminuição do nível de saturação, foram observadas as condições anóxicas estáveis, o que representa um ambiente adequado para desnitrificação.

Em resumo, é possível afirmar que o potencial redox e o oxigênio sofreram influência pelos períodos de alimentação e repouso. É notável que durante o período de alimentação, os valores das sondas de Eh da zona aeróbia decaem, o que é resultado do impacto do efluente recebido que flui entre as zonas, gerando uma menor oxigenação. Durante o período de repouso, os valores se elevam novamente. Esse comportamento também foi observado para as sondas intermediárias, que tiveram uma maior variação dos valores devido a seu posicionamento entre as zonas aeróbia e anóxica e pelo dreno de aeração. Na zona anaeróbia, as sondas tiveram um comportamento homogêneo, o que é o esperado, visto que tais sondas estão posicionadas na zona saturada anaeróbia, ou seja, sem interferência do O₂.

4.1.3 Eficiências de remoção

As análises do desempenho do tratamento em relação aos parâmetros avaliados foram calculadas sob a forma de concentrações do parâmetro considerado e expressas em porcentagem. Resultados da eficiência de concentração e da carga removida nos diferentes períodos de saturação foram reunidos na Tabela 24.

Esses resultados foram obtidos nos dois pontos de coleta nos filtros (entrada e saída) no início e final de cada ciclo de alimentação.

Para a primeira fase, quando ambos os pilotos tiveram um nível de saturação de 25 cm, a análise estatística revelou eficiências de remoção semelhantes para todos os parâmetros avaliados (valores de p : 0,1023 para SST; 0,4862 para DQO; 0,3249 para N-NH₄⁺ e 0,2792 para NTK). Sendo assim, os pilotos podem ser considerados idênticos durante a Fase 1. Esta conclusão também foi apoiada pelas tendências semelhantes para o teor de oxigênio e potencial redox avaliados durante esta fase.

Durante a segunda fase, a análise estatística apresentou eficiências diferenças entre os pilotos para SST e DQO (valores de p : 0,0001 para SST e 0,0048 para DQO), fato não observado para o amônio.

Tabela 24– Eficiência de remoção de massa (%) durante o tratamento e sob as diferentes condições de saturação do FPM/P2, expressos em média $\pm \Sigma$ (N). Os valores do período de colmatação foram excluídos.

Fase 1^a					
Parâmetros	FPM/P1 - 25 cm				
	Entrada (mg.L⁻¹)	Saída (mg.L⁻¹)	Carga recebida (g.m².d)	Carga Tratada (g.m².d)	Eficiência (%)
DQO^d	115 \pm 34 (40)	57 \pm 14 (40)	25	13	47
SST	261 \pm 126 (48)	31 \pm 18 (48)	60	52	86
N-NH₄⁺	50 \pm 24 (39)	24 \pm 9 (39)	11	5,6	47
NTK	63 \pm 25 (39)	25 \pm 9,6 (39)	13,8	8,25	56
N-NO₃⁻	0,1 \pm 0,4 (39)	3,1 \pm 2,1 (39)	7,2	6,5	85
Fase 2^b					
Parâmetros	FPM/P2 - 25 cm				
	Entrada (mg.L⁻¹)	Saída (mg.L⁻¹)	Carga recebida (g.m².d)	Carga Tratada (g.m².d)	Eficiência (%)
DQO^d	133 \pm 36 (17)	63 \pm 15 (17)	26	14	50
SST	212 \pm 88 (22)	30 \pm 12 (22)	46	40	84
N-NH₄⁺	61 \pm 29 (18)	26 \pm 10 (18)	12	7,1	51
NTK	72 \pm 31 (18)	28 \pm 10 (18)	14,8	9,1	58
N-NO₃⁻	0,4 \pm 0,5 (18)	2,3 \pm 1,8 (18)	8,3	7,9	85

$\pm \Sigma$: Desvio padrão

N: Número de amostras

^aFase 1: zona de saturação, 25 cm (12 meses de operação)

^bFase 2: zona de saturação, 15 cm (4 meses de operação)

^cLQ: limite de detecção

^dDQO: demanda química de oxigênio dissolvida

Continuação da Tabela 24 - Eficiência de remoção de massa (%) durante o tratamento e sob as diferentes condições de saturação do FPM/P2, expressos em média $\pm \Sigma$ (N). Os valores do período de colmatação foram excluídos.

Fase 2^b					
Parâmetros	FPM/P2 - 15 cm				
	Entrada (mg.L⁻¹)	Saída (mg.L⁻¹)	Carga recebida (g.m².d)	Carga Tratada (g.m².d)	Eficiência (%)
DQO^d	108 \pm 36 (26)	65 \pm 19 (26)	26	10	36
SST	252 \pm 107 (25)	60 \pm 32 (25)	60	45	75
N-NH₄⁺	44 \pm 17 (25)	28 \pm 12 (25)	10	3,8	36
NTK	57 \pm 20 (25)	31 \pm 16 (25)	13,2	5,9	45
N-NO₃⁻	<LQ ^c \pm 0,3 (25)	7 \pm 3 (25)	3,6	1,8	65

$\pm \Sigma$: Desvio padrão

N: Número de amostras

^aFase 1: zona de saturação, 25 cm (12 meses de operação)

^bFase 2: zona de saturação, 15 cm (4 meses de operação)

^cLQ: limite de detecção

^dDQO: demanda química de oxigênio dissolvida

Essa diferença estatística representa a mudança (diminuição) do nível de saturação, o que impactou negativamente na remoção dos sólidos totais e na DQO, podendo ser explicada pelos seguintes detalhes:

- O aumento na concentração de saída em SST pode ter sido ocasionado pela transição da Fase 1 para a Fase 2. Nesse período houve uma menor atenuação da passagem do efluente, o que, por sua vez, fragilizou a comunidade bacteriana ali já desenvolvida, gerando um desprendimento do biofilme, provocando uma maior liberação da biomassa (principalmente durante a primeira batelada nos períodos de alimentação). A diminuição do nível de saturação provocou um aumento do fluxo de água dentro dos meios porosos inicialmente saturados.
- Além disso, quando a zona de saturação passou a ter 15 cm houve uma menor velocidade de infiltração.

- O tempo de detenção hidráulica diminuiu de 6,66 horas para 4 horas, ocasionando uma menor decantação, o que pode ter afetado o aprisionamento dos sólidos.

Dessa forma, conclui-se que o conjunto de todos esses fatores promoveu um aumento da concentração de SST em termos de saída.

Uma vez que a comunidade bacteriana foi restabelecida e a taxa de drenagem manteve-se constante (em torno de 0,20 m/h), a concentração de saída de sólidos diminuiu e a eficiência do tratamento aumentou novamente.

Em relação ao N-NH_4^+ na Fase 2, não foi observada diferença significativa na taxa de remoção (p : 0,2227), o que indica que a diminuição da eficiência de remoção do amônio da Fase 1 para a Fase 2 no FPMVF 2 ocorreu devido à redução na concentração de entrada.

Portanto, durante a Fase 2, ambos os filtros tiveram um comportamento semelhante em relação ao N-NH_4^+ . Essa estabilidade do amônio provavelmente está relacionada ao aumento da camada insaturada, tendo em vista que, com a diminuição da zona de saturação, ocorreu um aumento da camada de transição composta por brita fina (8-20 mm). Consequentemente, o papel na retenção do amônio e nitrificação pelo aumento da zona de transição e tamanho da partícula parece ser negligenciável em comparação com a camada de filtração. Sendo assim, melhor seria aumentar a camada de filtração, promovendo assim o aumento da eficiência da nitrificação.

No que se refere às concentrações e eficiência de remoção do nitrato, foram observados aumentos na saída logo após o período de repouso, aumento este justificado pela oxigenação do filtro durante essa fase e pela nitrificação contínua durante esse período, causando descargas de nitrogênio orgânico estocados no filtro. A partir do início do período de alimentação, não foram detectados valores de concentração de nitrato na saída, enquanto que as concentrações de amônio permaneceram estáveis, demonstrando, por sua vez, que os nitratos formados pela nitrificação foram desnitrificados pela zona saturada.

No entanto, a troca do nível de saturação (Fase 2 - FPM/P2) teve um forte impacto sobre a desnitrificação. Considerando que a concentração de nitrato de saída era baixa quando o filtro operava com 25 cm, o uso da saturação de 15 cm afetou claramente a desnitrificação (valor p : <0.000001), apresentando concentrações de saída de N-NO_3^- de aproximadamente 7 mg $\text{N-NO}_3^-/\text{L}$, com uma máxima de 10 mg $\text{N-NO}_3^-/\text{L}$.

Para o nitrogênio total *Kjeldahl* (NTK), foi observada estatisticamente uma diferença entre as fases de saturação (p : 0,0033). Essa diferença é possivelmente atribuída à ligação existente entre o NTK e os SST, isto é, os sólidos suspensos contêm uma porcentagem de nitrogênio orgânico. Por sua vez, o nitrogênio orgânico e o amoniacal constituem o nitrogênio total *Kjeldahl*. Em outras palavras, se na Fase 2 houve uma diferença de comportamento em relação aos sólidos, é justificável a diferença para o NTK.

Globalmente, as performances de remoção para SST e NTK ficaram próximas a valores encontrados no primeiro estágio do Sistema Francês (MOLLE *et al.*, 2005; 2008), demonstrando a eficiência do filtro no tratamento.

A Figura 46 e Figura 47 demonstram a eficiência em relação aos parâmetros avaliados em função da carga aplicada e removida. Sendo a primeira representando o FPM/P1 com 25 cm de saturação e a segunda para o FPM/P2 com as duas fases de saturação 25 cm e 15 cm.

Figura 46– Cargas tratadas de SST, DQO, N-NH₄⁺ e N-NO₃⁻. Fase 1

Onde: a, b correspondem ao FPM/P1 com 25 cm de saturação. * Para o nitrato, a carga recebida é a carga produzida pela nitrificação. A carga tratada é a massa de nitrato, que é eliminada.

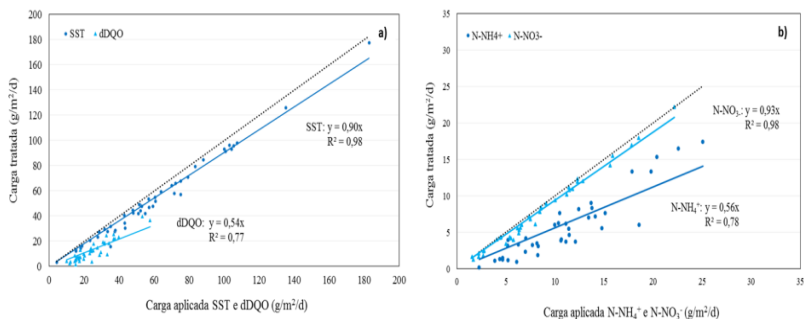
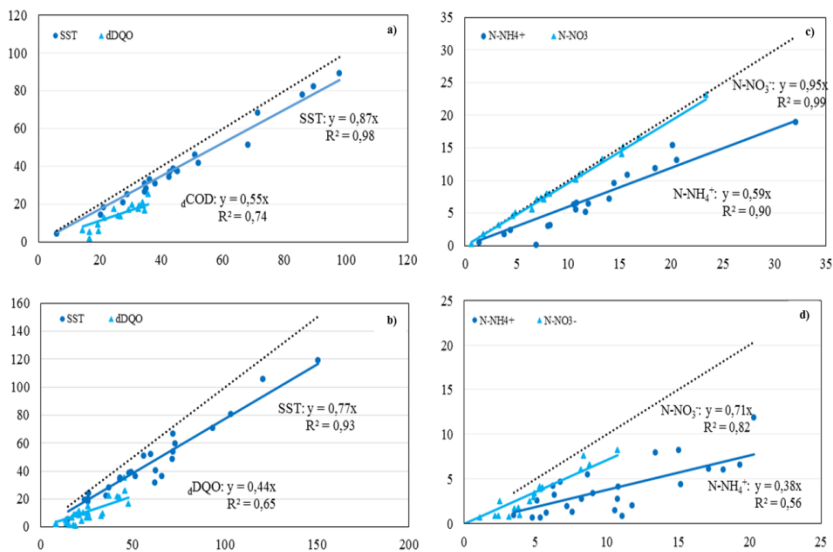


Figura 47 – Cargas tratadas de SST, DQO, N-NH_4^+ e N-NO_3^- *. Fase 2
 Onde (a, c) FPM/P2 com 25 cm de saturação; (b, d) FPM/P2 com 15 cm de saturação (a carga aplicada de nitrato foi calculada de acordo com a nitrificação). * Para o nitrato, a carga recebida é a carga produzida pela nitrificação. A carga tratada é a massa de nitrato, que é eliminada.



Pode-se observar que, embora a eficiência tenha sido bastante estável para SST, isso não foi observado no que diz respeito aos outros parâmetros. No entanto, as cargas aplicadas não pareceram ser a causa da variabilidade.

4.1.4 Fatores que afetam a eficiência de remoção

4.1.4.1 Período de alimentação

Os valores dos parâmetros analisados foram comparados no primeiro e último dia de um ciclo de alimentação usando análise estatística. Como os filtros possuíam uma condição de saturação que proporcionava um efeito tampão, ambos apresentaram como resultado comportamento semelhante em relação a esta variável (valores p : SST: 0,3655; DQO: 0,2112; N-NH_4^+ : 0,1687 e NTK: 0,1424).

4.1.4.2 Temperatura e estação do ano

A partir dos valores obtidos pelas medições de temperatura no interior dos filtros em diferentes profundidades (10 cm e 25 cm), foi conduzida uma análise de correlação para verificar a influência da temperatura sobre a eficiência da nitrificação.

Como resultado, não foi observada correlação. No entanto, houve uma tendência de aumento da eficiência com o aumento da temperatura na temporada de verão, aspecto que também se correlaciona com o crescimento das plantas e com a recuperação de boas taxas de infiltração.

Além disso, muitos outros fatores influenciam na nitrificação, tais como: o tempo de retenção hidráulico, o teor de matéria orgânica e o ciclo de operação de alimentação/repouso.

No que se refere ao sistema hidráulico, foram constatados, como anteriormente mencionado, diferentes eventos de colmatação, tornando difícil isolar o impacto da temperatura. Desse modo, um estudo estatístico da variável sazonalidade foi conduzido para observar o comportamento dos filtros em diferentes épocas do ano. Os resultados foram agrupados na Tabela 25.

Embora não houvesse efeito significativo da estação para SST e DQO em ambos os filtros, foi possível observar um efeito estatisticamente significativo para a nitrificação.

As temperaturas de inverno promoveram um efeito maior. No entanto, esse período correspondeu ao período de colmatação. Sendo assim, não se pode afirmar que as temperaturas do inverno podem ser consideradas como um indicador de influência sobre o funcionamento do filtro.

Após a troca de nível de saturação (Fase 2), não foi possível analisar todas as estações do ano já que este período se deu na primavera e verão. As análises estatísticas realizadas demonstraram que durante esse período houve uma diferença significativa apenas para o amônio no FPM/P1 ($p: 0,0349$).

Tabela 25 – Resultados das análises estatísticas em relação ao efeito da sazonalidade nos parâmetros avaliados por ambos os filtros na Fase 1.

Fase 1¹				
FPM/P1				
Primavera	Verão	Outono	Inverno	p value
85,06	85,86	87,50	87,45	0,765
45,72	44,86	45,57	42,07	0,915
15,59 ^{a,b}	32,05 ^b	40,41 ^b	-3,51 ^a	0,005
26,91 ^{a,b}	41,84 ^b	42,07 ^b	14,19 ^a	0,017
FPM/P2				
Primavera	Verão	Outono	Inverno	p value
83,96	82,69	85,97	84,66	0,694
51,00	44,35	45,42	38,74	0,259
14,52 ^{a,b}	42,79 ^{b,c}	32,87 ^{a,c}	6,37 ^a	0,027
19,98	42,70	35,00	16,04	0,052

Letras diferentes na mesma linha diferem significativamente ($P < 0,05$).

¹Fase 1: Zona de saturação 25 cm

4.2 ANÁLISES DA COMUNIDADE MICROBIANA POR TÉCNICAS MOLECULARES

4.2.1 Protocolo do desprendimento do biofilme

Para que o estudo da diversidade microbiana se torne possível, é necessário que este biofilme seja liberado das superfícies onde estão anexados. Vários estudos (CAMPER *et al.*, 1985; GAGNON e SLAWSON, 1999; GROVE *et al.*, 2004; BÖCKELMANN *et al.*, 2003), indicam formas eficientes de retirar as bactérias aderidas no biofilme. Dentre os procedimentos mais utilizados, podem-se destacar: os métodos de raspagem, de esfregaço, de agitação, de ultrassom, de mistura, de adição de enzimas, além de várias abordagens de digestão (WEBER e LEGGE, 2010).

O estudo das comunidades bacterianas em filtros plantados com macrófitas ainda é bastante limitado, sendo sua maioria restrito às comunidades bacterianas intersticiais devido às dificuldades inerentes da retirada do biofilme do material utilizado no meio filtrante. Mesmo no

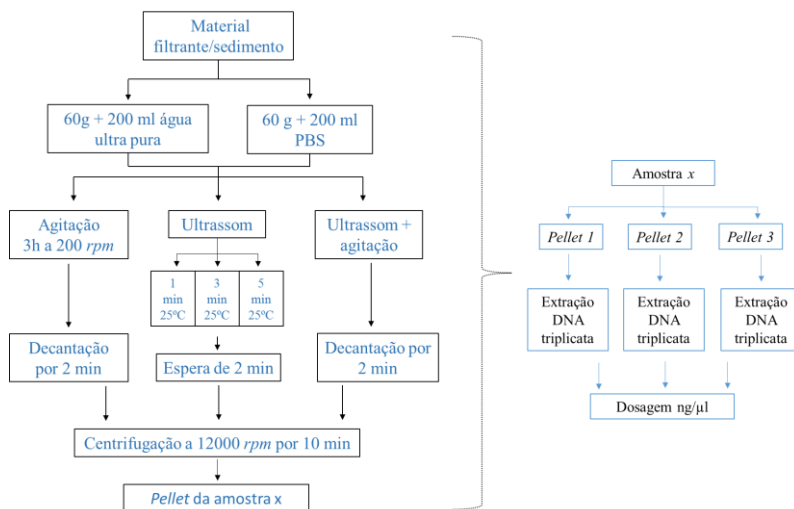
que se refere a tal microbiota, há pouquíssimas publicações que indicam qual a melhor forma de retirá-la.

Um protocolo realizado por Weber e Legge (2010) foi considerado eficaz e é tomado como referência para novos estudos. O protocolo consiste em 25g de sedimento (material filtrante) submetidos a uma agitação de 3 horas com uma solução tampão de fosfato 10 mM (PBS - pH de 7 com 8,5 g/L NaCl) alterada com lipase (50 un/g de cascalinhos - *peagravel*). Esse mesmo protocolo também foi utilizado para retirada do biofilme da rizosfera.

Sabe-se que a retirada do biofilme é tão importante quanto as técnicas utilizadas para a detecção das bactérias. Trata-se do primeiro passo, que deve ser cuidadosamente realizado para que o maior número de bactérias seja detectado, tornando a amostra a mais representativa possível.

Nesse propósito, foram realizados alguns testes a fim de definir qual a melhor forma de retirada do biofilme do material filtrante utilizado nos filtros plantados com macrófitas desta tese. Os testes realizados por este estudo podem ser visualizados na Figura 48.

Figura 48 – Regime experimental da retirada do biofilme



Fonte: autor

Após a realização dos testes com as diferentes condições, as amostras foram submetidas a uma extração de DNA em triplicata 2³ fatorial e, posteriormente, foi realizado a dosagem do DNA extraído pelo equipamento QUBIT® *Invitrogen*.

A partir dos resultados da dosagem do DNA, foi possível verificar qual método é mais eficiente em termos de concentração (ng/μl) de DNA extraído. Como resultado, obteve-se o seguinte protocolo:

- 60 g de sedimento + 200 ml de água ultra pura;
- Agitação durante 3 horas, a 200 rpm;
- Centrifugação durante 10 minutos a 12000 rpm.

Desse modo definiu-se o protocolo utilizado nesta tese para a retirada do biofilme do material filtrante (Apêndice A).

Cabe salientar que, assim como para o protocolo definido no estudo realizado por Weber e Legge (2010), este protocolo pode ser adaptado a outros sistemas de biofilme/substrato. Porém, é importante destacar que outros testes podem ser requeridos para avaliar a eficácia do protocolo em cada situação, mesmo que, para este protocolo tenha sido realizado testes com diferentes amostras – provenientes de diferentes filtros – a fim de testar a reprodutibilidade, e o resultado foi positivo, ou seja, independente do filtro testado e suas particularidades, com a utilização deste protocolo chegou-se a um mesmo resultado.

4.2.2 Quantificação da comunidade microbiana por PCR em tempo real – qPCR

4.2.2.1 qPCR – Filtros em escala piloto

Conforme já citado, cada filtro analisado apresentou diversas variáveis. Para os filtros em escala piloto, foram apresentadas as seguintes variáveis: D1; D2; D3; D4; D5 e D6, referentes às distâncias do ponto de alimentação, onde três pontos foram postos à esquerda e três à direita. Em relação à profundidade, esta foi de 20 cm. Duas coletas foram realizadas: uma no inverno e outra no verão.

❖ FPM/P1 e FPM/P2

A Figura 49 representa os gráficos das bactérias nos filtros em escala piloto: FPM/P1 e FPM/P2. O valor do log representa a média dos valores obtidos para os seis pontos de coleta, sendo que, pela análise estatística, não foi detectada diferença significativa entre os pontos. Esse resultado provavelmente está relacionado ao fato de que os filtros pilotos possuem um ponto de alimentação para 2m², permitindo dessa

forma uma boa distribuição superficial da água. Isso explica a ausência de diferença significativa entre os pontos de coleta.

A partir da análise dos gráficos, é possível observar que entre os filtros (FPM/P1 e FPM/P2) os valores obtidos de cópias do gene da comunidade bacteriana são bastante similares. Essa similaridade também foi detectada para ambos os filtros nas análises físico-químicas, conforme apresentado no item 4.1.

Em relação à variável estação do ano — inverno e verão — a quantidade de bactérias nitrificantes e totais foram mais expressivas no período do inverno. Para as bactérias nitrificantes, obteve-se log 06 e 07 no verão para o FPM/P1 e FPM/P2, respectivamente. Para as bactérias totais, log 11 no inverno e log 07 no verão.

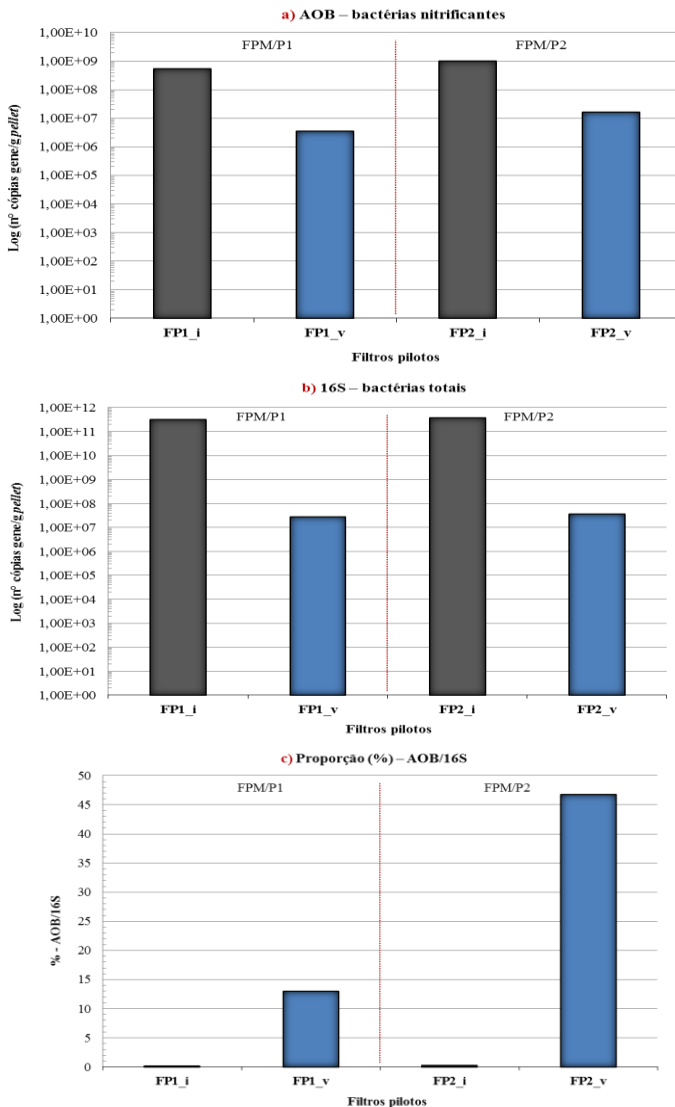
Esse resultado é, a princípio, contrário ao esperado, pois o número de bactérias nitrificantes foi menor no período de verão. Porém, o número de bactérias totais também foi menor. Sendo assim, analisando a proporção (%) de bactérias nitrificantes em relação às bactérias totais, elas são mais representativas no verão, como mostra o gráfico da Figura 49a representa os gráficos das bactérias nos filtros em escala piloto: FPM/P1 e FPM/P2.

No que se refere às bactérias totais, as suas variações geralmente são explicadas pela relação com a carga de matéria orgânica aplicada: quanto mais matéria orgânica, maior será a quantidade de bactérias totais. Além disso, a quantidade de sedimentos ou de partículas finas também influencia: quanto menor a granulometria das partículas, mais a superfície será colonizada por essas bactérias.

No entanto, isto não se aplica neste estudo, visto que a carga hidráulica, bem como as concentrações de entrada não apresentaram mudanças significativas para as diferentes estações do ano, sendo assim a carga orgânica também foi similar. Portanto, o fato de haver maior quantidade de bactérias totais no inverno, não se justifica a partir do efeito de carga.

Figura 49 – Quantificação das bactérias nitrificantes e totais para os filtros pilotos FPM/P1 e FPM/P2.

a) bactérias nitrificantes; b) bactérias totais; c) % bactérias nitrificantes/bactérias totais. Onde: i = inverno; v = verão.



Em relação às bactérias nitrificantes, o mesmo resultado foi observado. Diante deste fato, e devido a pouca quantidade de informações sobre a evolução da densidade bacteriana entre os períodos de inverno e verão para FPM, criam-se hipóteses como uma tentativa de melhor compreender e explicar os resultados:

a) A primeira coleta para as análises de microbiologia foi realizada no período de inverno (fevereiro) com temperatura média de 10°C - medida pelas sondas de temperatura instaladas a 10 cm e 25 cm de profundidade no interior dos filtros. Esta coleta foi feita após seis meses do início de operação do sistema. Portanto, os resultados obtidos no inverno indicam que a comunidade microbiana havia se estabelecido de forma positiva durante o período de verão precedente, mantendo-se ainda presente no período da coleta.

b) A temperatura e a concentração de oxigênio podem ter contribuído para o aumento das bactérias no inverno, haja vista, que algumas bactérias preferem temperaturas mais baixas, e são mais resistentes em ambientes com menor teor de O₂. O mesmo foi observado em estudo realizado por Tietz *et al.*, (2007).

Durante todo o período de inverno registraram-se baixas temperaturas (<10°C) e pouco teor de oxigênio (≈10%). Agravando esse quadro, no mês de março foi o período em que os filtros estiveram em fase de colmatção. Esses fatores podem ter afetado a comunidade bacteriana presente nos filtros, fazendo com que esta tardasse a se desenvolver novamente. O que por sua vez, pode ter refletido na resposta da coleta de verão, a qual se deu no mês de junho – início da estação.

A temperatura média de junho foi de 22°C, porém cabe ressaltar que esse mês houve grandes oscilações de temperatura (7°C a 35°C).

Assim sendo, levanta-se a hipótese de que provavelmente os resultados encontrados refletem o que aconteceu com a comunidade bacteriana durante o período do inverno precedente.

Para os filtros em escala real (discutido no próximo item), também foi visualizada uma maior quantidade de bactérias no período de inverno, no entanto, esses filtros não passaram por um período de colmatção, o que indica que um tempo suficientemente longo requerido para as bactérias se reestabelecerem pode estar atrelado ao fator da temperatura. Isto significa que o inverno impactou similarmente todos os filtros – pilotos e escala real.

As bactérias responsáveis pela nitrificação possuem uma baixa taxa de crescimento. Este fato é bem documentado por alguns autores,

os quais indicam que a recuperação da comunidade nitrificante pode levar muito tempo. Essas bactérias são autotróficas, ou seja, utilizam CO_2 como fonte de carbono, ou, são quimiolitotróficas, que oxidam compostos inorgânicos para obtenção de energia caracterizando-se, portanto, por serem bactérias de crescimento lento (SCHMIDELL *et al.*, 2007). Esse lento crescimento pode ser na ordem de até 100 dias, segundo Truu *et al.* (2009).

Ainda que o efeito temporal seja uma hipótese, é visível que mesmo com a menor quantidade de bactérias presentes no verão, estas contribuíram para um bom desempenho dos sistemas. Como descrito no item 4.1. Resultados físico-químicos dos FPM em escala piloto, os filtros apresentaram maior eficiência na remoção do nitrogênio durante o verão, demonstrando que mesmo com menor quantidade de cópias do gene quantificado pela qPCR, as bactérias estavam ativas, realizando o processo da transformação do nitrogênio.

c) A interferência do teor de oxigênio. O valor médio do teor de O_2 no período da coleta foi de 15% para ambos os filtros.

Baixo teor de oxigênio limita o crescimento das bactérias NOB (oxidantes de nitrito). Já as bactérias AOB (oxidantes da amônia) possuem vantagem em ambientes com essa condição (SCHMIDELL *et al.*, 2007).

d) Evapotranspiração como uma atividade das plantas que interferem no sistema. Pela transpiração das plantas pode ocorrer um efeito de “seca” no meio filtrante durante o período de repouso, o que por sua vez, pode provocar o aceleração da lise bacteriana. Ou seja, lise bacteriana no verão poderá ser mais rápida do que no inverno e eventualmente a variação da cinética da lise será mais importante que o seu crescimento entre verão e inverno em razão da evapotranspiração.

Sendo assim, surge a hipótese de haver uma acumulação de bactérias no inverno (bactérias não ativas, visto que houve uma diminuição da nitrificação) e uma degradação no período de verão.

Além disso, em período de colmatção poderá também ocorrer a acumulação. É possível verificar essa hipótese a partir dos resultados para o FPM/P3 o qual em período de anaerobiose obteve maior quantidade de bactérias – acumulação – porém não ativas. No entanto, a proporção bactérias nitrificantes/bactérias totais demonstra que as nitrificantes foram afetadas, e quanto mais oxigênio, maior a quantidade de bactérias nitrificantes. Esses resultados serão detalhados posteriormente.

Além das hipóteses supracitadas, outra questão importante a ser mencionada é o fato da qPCR ser uma análise somente quantitativa. Os

resultados indicam o nº de cópias do gene da bactéria amplificada, mas não avalia a atividade funcional, ou seja, elas podem estar presentes em quantidade, mas inativas devido a diversos fatores. Isso é claramente visível pelos resultados obtidos nesta tese, onde os rendimentos da nitrificação são inferiores no inverno, mesmo com uma maior quantidade de bactérias detectadas pela qPCR.

Além disso, é importante enfatizar que as bactérias quantificadas pela qPCR foram apenas as do gênero AOB, devido ter sido utilizado iniciadores amoA, ou seja, os resultados aqui expostos não representam a quantidade de bactérias oxidantes de nitrito (NOB) que também estão presentes no sistema, como observado nos resultados da DGGE descritos a seguir.

Outro ponto a ser destacado é que os resultados da qPCR são referentes ao nº de bactérias/g de matéria orgânica retirada do material filtrante, ou seja, não representam a quantidade de bactérias por m² ou m³ do filtro. Além disso, cabe aqui lembrar que a quantidade de matéria orgânica pode variar ao longo do tempo, provocando as hipóteses antes mencionadas – acumulação no período de alimentação e diminuição no período de repouso, ou mesmo em uma escala de tempo como, por exemplo, acumulação no inverno e mineralização mais representativa no verão.

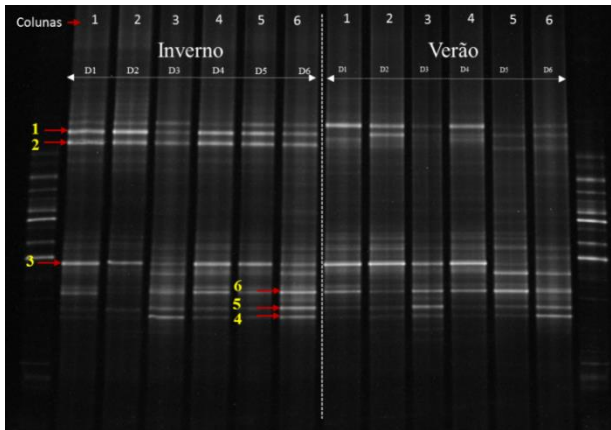
Essas possibilidades podem ser melhor visualizadas a partir da análise do gel da DGGE e do resultado do sequenciamento, que serão expostos a seguir (Figura 50).

No gel da DGGE é claramente visível a distribuição das comunidades bacterianas no inverno e no verão. Como indicado na Figura 50, as seis primeiras colunas representam os pontos de coleta realizadas no inverno, sendo que as seis subsequentes representam os pontos no período de verão. Cada banda, por sua vez, representa um grupo, gênero ou espécie bacteriana.

A partir do gel da DGGE, foi possível selecionar algumas bandas para o sequenciamento e assim possibilitar a identificação do gênero ou espécie presente na amostra. As bandas sequenciadas são marcadas pelos números de 1 a 6. Cabe ressaltar que as outras bandas alinhadas a estas também foram coletadas em outras colunas para verificação mais exata do micro-organismo.

Figura 50 – Gel da DGGE dos filtros FPM/P1 e FPM/P2.

Gel representando a comunidade bacteriana nas duas estações do ano – inverno e verão. n° 1 a 7 indicam as amostras sequenciadas.



As amostras sequenciadas tiveram como resultado bactérias dos gêneros *Nitrosomonas*, *Nitrospira* e *Nitrospira*. As duas primeiras correspondem ao grupo das bactérias oxidantes de amônia (AOB), e o terceiro gênero, das bactérias oxidantes de nitrito (NOB), indicadas pelos seguintes números:

- 1) *Nitrosomonas* sp.
- 2; 6) *Nitrospira* sp.
- 3) AOB – (não foi possível identificação a nível de gênero ou espécie).
- 4; 5) *Nitrospira* sp.

É possível observar que as bactérias AOB estão em maior presença, tanto no período de inverno, como de verão, comparado com às NOB.

Em relação à AOB do gênero *Nitrosomonas* (1), uma maior presença foi detectada no período de inverno, embora também sejam encontradas no verão. Este fato pode ser justificável pelo baixo teor de O_2 no período da coleta. As bactérias deste gênero possuem vantagens de adaptação em ambientes com menor teor de O_2 (CERVANTES, 2009), sendo que a temperatura mínima para o crescimento de *Nitrosomonas* é de $5^\circ C$, segundo Cooper *et al.* (1996). O gênero *Nitrospira* (4; 5) foi encontrado em duas bandas com peso molecular distinto, indicando a presença de duas espécies deste gênero. Sua

presença manteve-se praticamente igual nas duas estações do ano. Segundo IWA (2009) esse gênero de AOB é bastante comum em sistema para tratamento de efluentes como os filtros plantados com macrófitas.

O gênero *Nitrospira* (2; 6) do grupo das NOB também foi encontrado em duas bandas de peso molecular distinto, indicando a presença de duas espécies deste gênero. Em relação à sua abundância, é perceptível que uma das espécies (2) mostrou-se mais adaptada às condições do inverno, apresentando-se em maior quantidade, muito embora também esteja presente no verão. Já a espécie (6) apresentou presença semelhante em ambas as estações.

A menor presença da espécie (2) no verão confirma a sensibilidade dessas bactérias às variações ambientais. Além disso, esse gênero possui um crescimento mais lento se comparado às bactérias do gênero AOB e possuem desvantagem em baixo teor de O_2 , o que dificulta o estabelecimento da comunidade bacteriana (SCHMIDELL *et al.*, 2007; CERVANTES, 2009).

❖ FPM/P3

No que se refere ao filtro FPM/P3, este foi submetido a duas variáveis:

- i) Estação do ano e saturação:
- ii) inverno sob condição anaeróbia e verão sob condição aeróbia.

Da mesma forma que para os filtros FPM/P1 e P2, os resultados da qPCR estão representados nos gráficos na Figura 51.

Observou-se que a quantidade de bactérias nitrificantes (AOB) foi mais representativa no inverno e sob condição de anaerobiose. Este resultado foi o mesmo para as bactérias totais. Todavia, na relação de porcentagem, as bactérias nitrificantes são mais expressivas na condição aeróbia durante o verão.

Esse filtro também teve o início de operação em julho, juntamente com os filtros piloto FPM/P1 e P2. A primeira coleta foi realizada no inverno, quando o filtro estava sob condição de anaerobiose. Portanto, este resultado pode ser explicado sob as mesmas hipóteses levantadas para os filtros FPM/P1 e FPM/P2. A diversidade microbiana pode ser melhor visualizada na Figura 52.

Figura 51 – Quantificação das bactérias nitrificantes e totais para o filtro piloto FPM/P3

a) bactérias nitrificantes; b) bactérias totais; c) % bactérias nitrificantes/bactérias totais. Ae: condição aeróbia; An: condição anaeróbia.

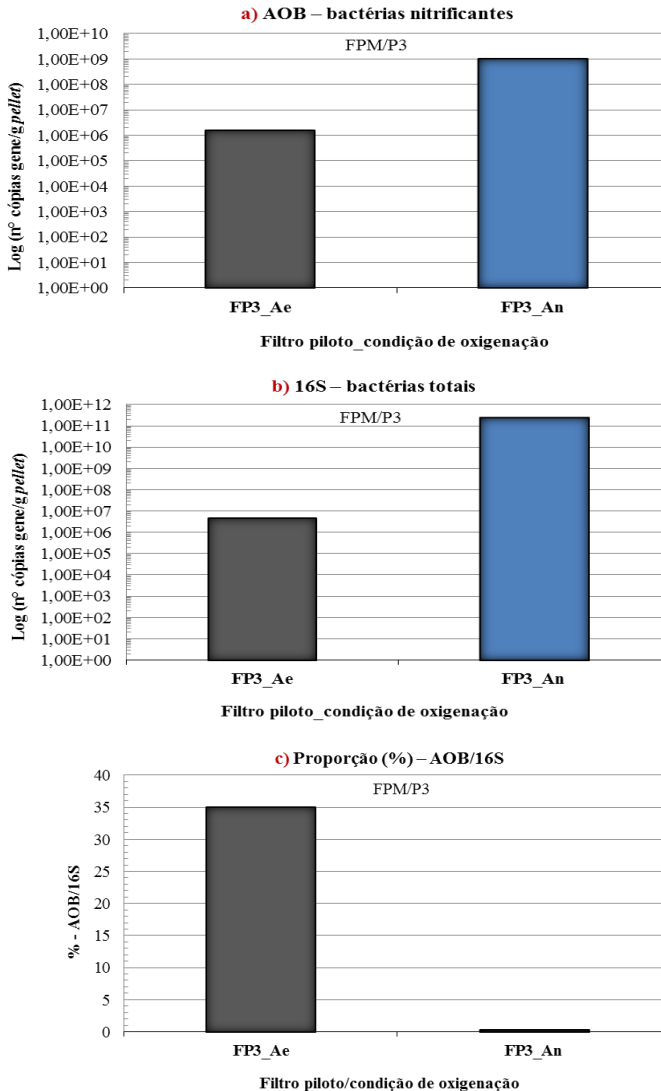
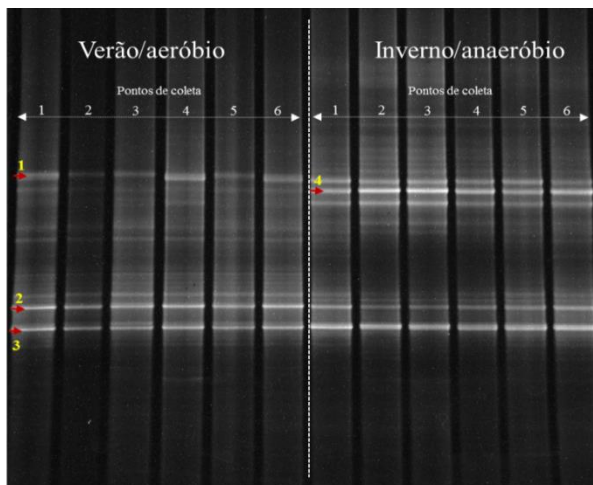


Figura 52 – Gel da DGGE do filtro piloto FPM/P3
Comunidade bacteriana nas condições inverno/anaeróbio e verão/aeróbio
nº de 1 a 4 correspondem as amostras selecionadas para o sequenciamento.



Observa-se que a maior parte da comunidade bacteriana encontram-se em ambas as condições analisadas. Porém, como é possível visualizar no gel (Figura 52), houve uma maior quantidade de bactérias nitrificantes no inverno, assim como visto nos resultados da qPCR.

As bandas mais representativas foram selecionadas e submetidas ao sequenciamento. Como resultado obteve-se bactérias oxidantes de amônia (AOB) e de nitrito (NOB) da mesma forma que para os outros filtros estudados.

Os números de 1 a 4 representam as bandas selecionadas para o sequenciamento. Cabe lembrar que as outras bandas alinhadas a estas também foram sequenciadas para confirmação do organismo. Cada número representou os seguintes gêneros:

- 1) *Nitrospira sp*
- 2) *Nitrospira sp*;
- 3; 4) *Nitrosomonas sp*

A partir desse resultado, nota-se que as bactérias do gênero AOB (3, 4) foram encontradas em duas bandas de diferente peso molecular, indicando a presença de duas espécies deste gênero. A

espécie (3) foi encontrada em ambas as estações e condições de saturação. No entanto, é possível observar que ela foi mais representativa (intensidade de banda) no período do inverno/anaeróbio. Já para a espécie (4), nota-se que sua presença deu-se quase exclusivamente no período de inverno/anaeróbio, sendo muito pouco representativa no período verão/aeróbio.

Em relação ao gênero NOB (1, 2) também é possível observar a presença de duas espécies, nas quais ambas mantêm-se estáveis nas duas condições analisadas.

Portanto, presume-se que a condição de inverno e a ausência de oxigênio foi favorável para as bactérias oxidantes de amônia diante das oxidantes de nitrito, seguindo as mesmas hipóteses anteriormente citadas para os outros filtros.

A maioria das bactérias AOB obtém energia para seu crescimento a partir da oxidação aeróbia. No entanto, algumas espécies são capazes de crescer sob condições aeróbias e anaeróbias (SCHMIDT *et al.*, 2003).

Assim como observado no estudo realizado por Kornaros *et al.*, (2010), ao que tudo indica as NOB tiveram taxas de crescimento mais baixas, enquanto que as AOB se mantiveram mais estáveis às perturbações ao longo das estações e sob condições de baixo teor de O₂.

Outros estudos (Grunditz e Dalhammar, 2001; Paredes *et al.*, 2007) também apontam a sensibilidade das bactérias AOB e NOB em relação à temperatura. Temperaturas próximas a 15°C são mais favoráveis para o desenvolvimento das bactérias AOB. Relatos apontam que temperaturas superiores a 35°C propiciam um bom estabelecimento e atividade das bactérias NOB. Lembrando que a temperatura média do inverno na estufa onde os filtros se localizavam foi de 10°C, este resultado se torna condizente com o que foi encontrado por outros autores.

Em estudo realizado por Ansola *et al.* (2014), foi observado a não existência de diferença em termos de quantidade da comunidade bacteriana em relação ao inverno e ao verão. Outro estudo feito por Tietz *et al.* (2008) apresenta resultados em que a comunidade nitrificante AOB não foi interferida pela estação do inverno, mesmo com a diminuição da eficiência da nitrificação. As espécies AOB dominantes encontradas no estudo foram *Nitrosomonas europaea*, *Nitrosococcus mobilis* e *Nitrospira* – espécies do mesmo gênero encontrado nesta tese.

Uma variedade de fatores ambientais, incluindo a temperatura, pH, alcalinidade, potencial redox, concentração de OD, bem como a

amônia e o carbono orgânico, podem influenciar na diversidade e quantidade de nitrificantes (FAULWETTER *et al.*, 2009). Portanto, estudos complementares devem ser realizados a fim de melhor esclarecer o comportamento dessas bactérias em ambientes complexos como os filtros plantados com macrófitas.

4.2.2.2 qPCR – Filtros em escala real

Neste item serão descritos os resultados da qPCR encontrados para os filtros em escala real. Cabe ressaltar que esse tópico da pesquisa se refere somente às análises de biologia molecular, isto é, não foram avaliados os parâmetros físico-químicos destes filtros nesta tese.

A realização de análises de biologia molecular em filtros de escala real foi necessária devido à escassez de pesquisas sobre a comunidade microbiana em filtros plantados com macrófitas - Sistema Francês. O conhecimento mais aprofundado sobre os micro-organismos mostra-se bem importante, pois são eles os principais responsáveis pela remoção do nitrogênio.

Além disso, estudos da comunidade microbiana com técnicas moleculares na equipe de estudos em FPM – Sistema Francês do IRSTEA, ainda não haviam sido realizados. Em outras palavras, as análises feitas nesta tese são o ponto de partida, cabendo aqui, portanto, enfatizar que os resultados obtidos são considerados preliminares e hipóteses foram levantadas. Estudos mais aprofundados serão realizados na continuidade do projeto, com o objetivo de melhor compreender as variações espaciais (horizontal e vertical) bem como as variações temporais (estação do ano, alimentação/repouso, idade) na comunidade bacteriana presente nos filtros.

❖ Estações E1 e E2

Para as estações E1 e E2, os resultados compreendem as amostras coletas no período de inverno.

Ambas as estações foram comparadas em termos de quantidade de nº de cópias do gene/g *pellet* em relação a duas variáveis:

i) Estação com pouco tempo de operação (“jovem”) e estação com longo período de operação (“velha”);

ii) Profundidade, sendo: 15 cm e 30 cm para a E1 e; 0 cm, 15 cm e 30 cm para a E2. Lembrando que o 0 cm corresponde a camada orgânica de depósito – lodo.

Os resultados para ambas as estações estão expostos em gráficos na Figura 53.

Em relação à estação E1, observando a Figura 53a, nota-se que a maior quantidade de bactérias nitrificantes AOB foi encontrada na profundidade de 15 cm. Apesar desse resultado, ambas as profundidades permaneceram no mesmo log — médias de $8,84E+08$ e $6,72E+08$ n° cópias do gene/g *pellet* para profundidade de 15 cm e 30 cm, respectivamente, o que indica nenhuma diferença quantitativa nas profundidades testadas.

No que diz respeito às bactérias totais, o resultado foi oposto ao das bactérias nitrificantes, indicando maior quantidade na profundidade de 30 cm, como é possível visualizar na Figura 53b.

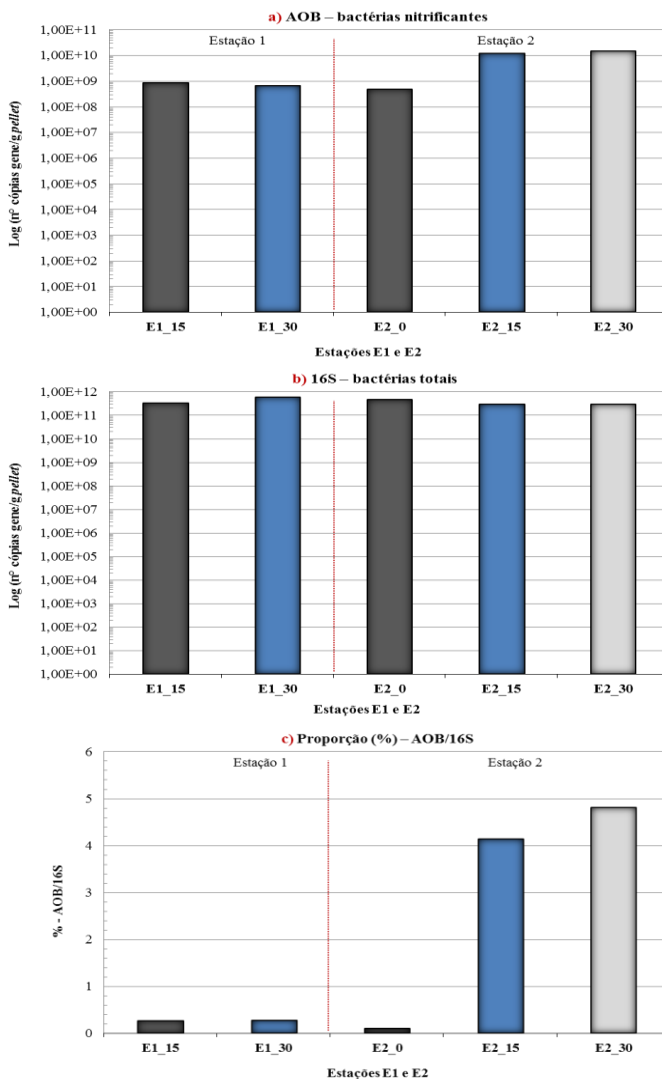
Na Figura 53c, a quantidade de bactérias nitrificantes em relação às bactérias totais é praticamente a mesma em ambas as profundidades. Contudo, ainda foram obtidos valores maiores em 30 cm.

No que se refere a estação E2, a maior quantidade de n° cópias do gene/g *pellet* para as bactérias nitrificantes foi encontrada na profundidade de 30 cm, como é possível observar na Figura 53a. Esse resultado talvez esteja relacionado com o fato desta ser uma estação de longo período de operação (“velha”) — onde existe uma camada de lodo bem estabelecida na sua superfície (> 10 cm) —, além de, no momento da amostragem, estar coberta de neve. Ambos os fatores podem ter influenciado no teor de oxigênio do local, o que, por sua vez, pode ter interferido na população microbiana a 0 cm e 15 cm. Além disso, a existência dos drenos de aeração pode ter contribuído para uma melhor oxigenação a 30 cm de profundidade, propiciando ou favorecendo um melhor desenvolvimento das bactérias nitrificantes.

Em relação às bactérias totais, a maior quantidade foi registrada na superfície (0 cm), seguida de 15 cm e 30 cm, respectivamente (Figura 53b). Quanto à avaliação dos resultados obtidos para a porcentagem de AOB/bactérias totais (Figura 53c), percebe-se uma ordem crescente de 0 cm para 30 cm, sendo coerente com os resultados encontrados para as AOB.

Figura 53 – Médias do n^o de cópias do gene/g de pellet de bactérias AOB e bactérias totais nas estações E1 e E2.

Diferentes profundidades de amostragem. Onde, a) gráfico das AOB (nitrificantes); b) gráfico das bactérias totais (16S); c) gráfico da porcentagem (%) das AOB em relação às bactérias totais.



No âmbito de comparação entre as duas estações – E1 e E2 –, é possível observar que, para a estação E1 — que não possui lodo —, a maior quantidade de AOB encontra-se em 15 cm de profundidade. Entretanto, na estação E2 — que possui o lodo —, a maior quantidade encontrada foi em 30 cm. Tendo isso em vista, as camadas de lodo e de neve parecem ter influenciado na estrutura espacial da comunidade bacteriana, induzindo um maior crescimento de bactérias nitrificantes nas camadas situadas mais abaixo da superfície.

❖ Estações E3 e E4

No que diz respeito às estações E3 e E4, os resultados compreendem as amostras coletadas no período de verão em relação a quatro variáveis:

- i) Estação com pouco tempo de operação (“jovem”) e estação com longo período de operação (“velha”);
 - ii) Profundidade, sendo: 0 cm, 15 cm e 30 cm para a E3 e, 15 cm e 30 cm para a E4;
 - iii) Amostragens em dias de repouso e de alimentação, como explicado em Materiais e Métodos. Esse tipo de amostragem foi realizado com o intuito de verificar a distribuição espacial e temporal da comunidade microbiana ao longo de um ciclo de operação.
- i) Distância do ponto de alimentação: D1 e D2, respectivamente.

- Estação E3

Primeiramente será abordada a estação E3, sendo que seus resultados estão expostos em gráficos na Figura 54.

Em relação às AOB os resultados da qPCR indicam que, em termos de profundidade 0 cm, 15 cm e 30 cm, a quantidade seguiu ordem crescente, com maior nº de cópias do gene/g *pellet* nos 30 cm. Esse resultado vem de encontro com o que foi observado para a estação E2, a qual possui as mesmas características da estação E3. Assim, reforça-se a influência do lodo na distribuição espacial da comunidade bacteriana.

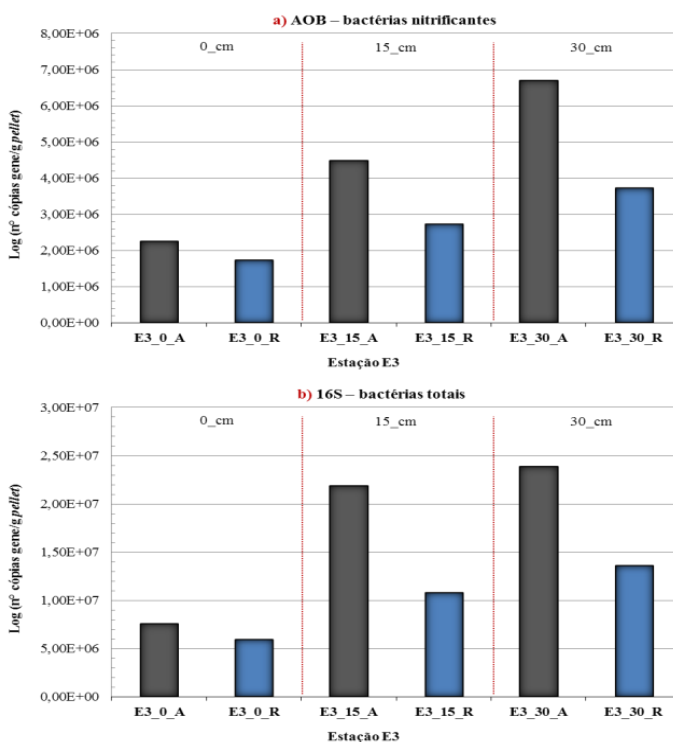
No que se refere ao ciclo operacional – dias de alimentação e dias de repouso –, os resultados mostram uma tendência de haver maiores nº cópias do gene/g *pellet* nas profundidades de 15 cm e 30 cm no período de alimentação, enquanto que na superfície (0 cm) apresentou-se o mesmo log.

Esse resultado pode ser explicado devido ao fato de que, no período de repouso, o lodo depositado na superfície recebe uma maior oxigenação, induzindo o crescimento e atividade das AOB. No entanto,

durante o período de alimentação, as bactérias estabelecidas nas profundidades subsequentes recebem não só oxigênio, como também alimento (afluente), além do fato, de o filtro receber bactérias provenientes do afluente, o que pode explicar a existência de um número maior de bactérias no período de alimentação em 15 cm e 30 cm.

Figura 54 – Médias do nº de cópias do gene/g de *pellet* de bactérias AOB e Totais na estação E3.

Diferentes profundidades de amostragem e no período de alimentação e repouso. Onde, a) gráficos das AOB; b) gráfico das bactérias totais; c) gráficos da porcentagem (%) das AOB em relação às bactérias totais.



Continuação da Figura 54 - Médias do nº de cópias do gene/g de *pellet* de bactérias AOB e Totais na estação E3.

Diferentes profundidades de amostragem e no período de alimentação e repouso. Onde, a) gráficos das AOB; b) gráfico das bactérias totais; c) gráficos da porcentagem (%) das AOB em relação às bactérias totais.

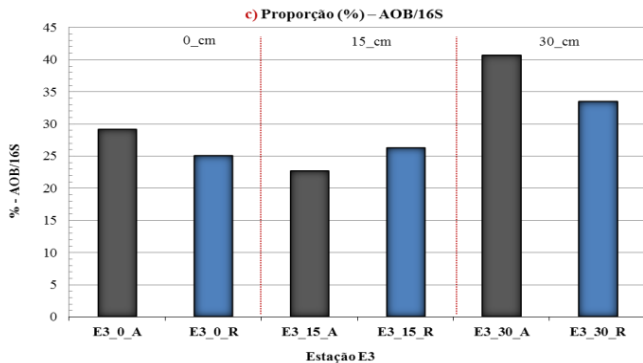
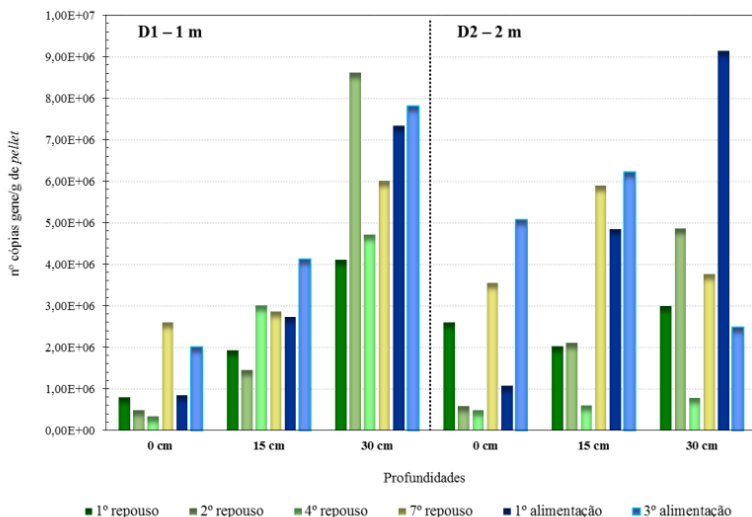


Figura 55 – Distribuição temporal e espacial do nº de cópias do gene/g de *pellet* de bactérias AOB.

Ciclo de operação – dias de repouso e dias de alimentação. Profundidades: 0 cm, 15 cm e 30 cm. Distância em m do ponto de alimentação: D1 = 1 m; D2 = 2 m



Em relação à profundidade, assim como já mencionado em parágrafos anteriores, é possível verificar que a maior quantidade de bactérias nitrificantes por g de material orgânico (*pellet*) foi encontrada na profundidade de 30 cm.

Já no que se refere à distância do ponto de alimentação, observou-se que valores maiores foram encontrados na distância 1 m do ponto de alimentação nos primeiros dias de repouso. Foram encontrados valores bastante similares no último dia de repouso (7º dia) para ambas as distâncias e valores maiores na distância D2 nos dias de alimentação. Porém, cabe ressaltar que os valores observados não obtiveram diferenças significativas ($p > 0,05$) entre as distâncias analisadas.

Sabe-se por meio de estudos realizados e de modelagens que o crescimento das bactérias tende a ser no período de alimentação, o que parece lógico, visto que neste período elas recebem oxigênio e alimento. No entanto, no resultado da qPCR parece que uma quantidade maior de bactérias estava presente no 7º dia de repouso. Este resultado é de certa forma incoerente com o que se sabe sobre crescimento bacteriano ao longo do tempo e durante o ciclo de operação. Nota-se também que apesar dessa diferença, as amostras permaneceram no mesmo log. Além disso, nos resultados da DGGE, o qual será exposto no próximo item, esse aumento no sétimo dia não é perceptível, e o resultado estatístico não demonstrou diferença significativa em relação ao quarto dia de repouso.

No geral, observa-se um aumento de nº de bactérias nos dias de alimentação, e decaimento a partir do terceiro dia de repouso.

- Estação E4

Com relação à estação E4, os resultados estão expostos em gráficos na Figura 56.

Observando a Figura 56a nota-se que em relação às bactérias nitrificantes a profundidade de 30 cm foi mais representativa.

No que se refere ao ciclo operacional, durante o período de repouso foram obtidos valores maiores em 15 cm. Já no período de alimentação, o maior nº de cópias do gene/g pellet foi obtido na profundidade de 30 cm. Assim como para a estação E3, estes resultados podem estar atrelados ao teor de oxigênio na superfície durante o período de repouso e um arraste deste elemento para as camadas mais profundas no período de alimentação, bem como o contato das bactérias com os nutrientes utilizados para o seu metabolismo.

Para as bactérias totais, maiores quantidades foram encontradas no período de repouso e em profundidade de 30 cm. No que se refere à porcentagem assim como para a estação E1 foram encontradas maiores quantidades de bactérias nitrificantes em relação as bactérias totais no período de alimentação e em 30 cm de profundidade.

A Figura 57 representa separadamente a quantidade de bactérias AOB ao longo dos dias de alimentação e repouso, nas duas distâncias de coleta e em suas respectivas profundidades.

Em relação à profundidade, é visível que maiores quantidades, foram obtidas em 30 cm. Por ser uma estação jovem, próximo aos pontos de alimentação forma-se uma camada de depósito da matéria orgânica – formação do lodo –, o que não existe no restante do filtro, justamente pelo fato de ser uma estação com pouco tempo de operação. Devido a isto, água tende a se infiltrar em lugares mais afastados dos pontos de alimentação. Essa hipótese vem de encontro com os resultados obtidos na distância D2, onde observou-se maiores quantidade de bactérias. Da mesma forma, haverá, portanto, maior quantidade de bactérias em profundidade.

Em relação ao período de repouso e alimentação, uma hipótese de reequilíbrio pode ser levantada, onde próximo aos pontos de alimentação e durante o período de repouso a biomassa se fragiliza, tendo seu reequilíbrio no momento da alimentação.

Figura 56 – Médias do nº de cópias do gene/g de *pellet* de bactérias AOB e bactérias totais na estação E4
 Diferentes profundidades de amostragem e no período de alimentação e repouso. Onde, a) gráficos das AOB; b) gráfico das bactérias totais; c) gráficos da porcentagem (%) das AOB em relação às bactérias totais.

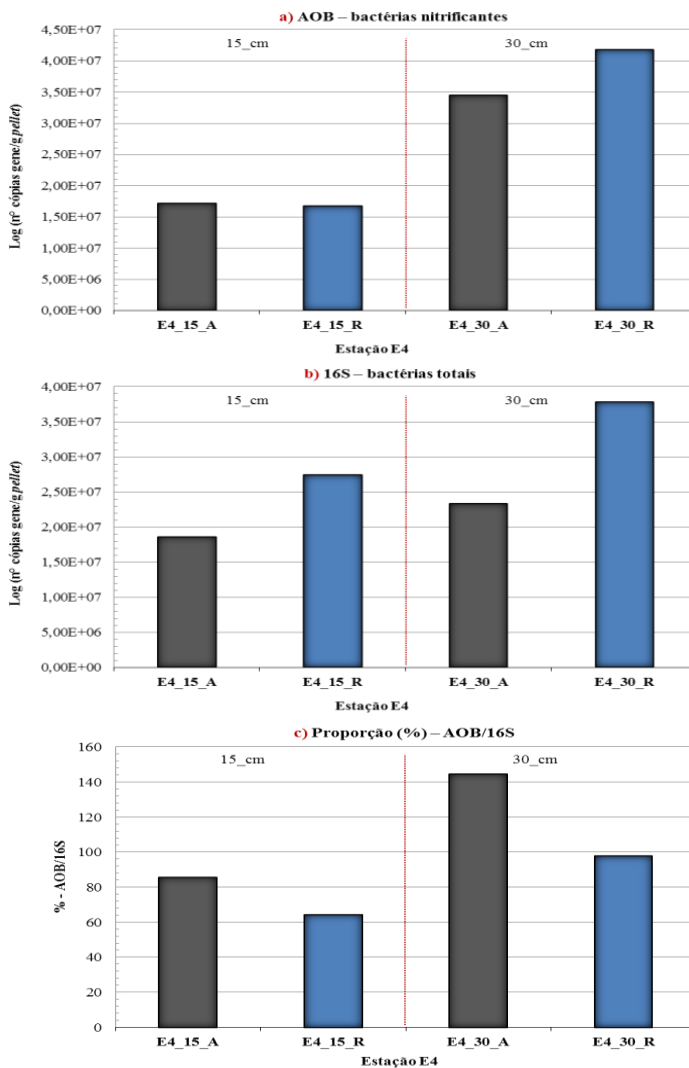
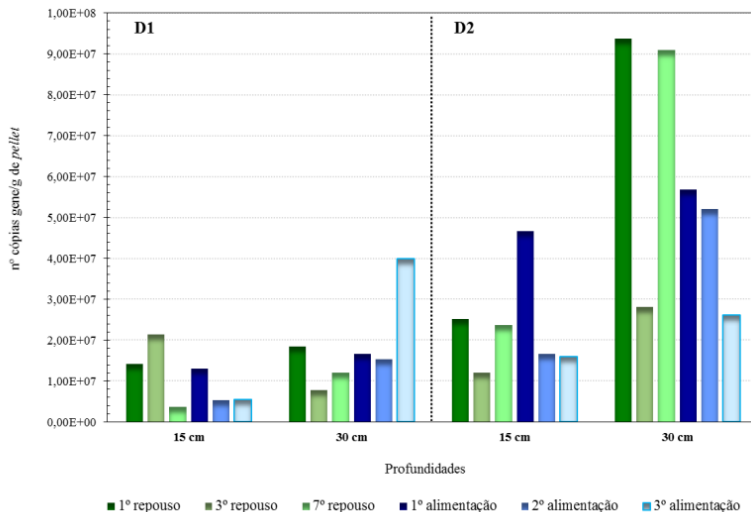


Figura 57– Distribuição temporal e espacial do nº de cópias do gene/g de pellet de bactérias AOB.

Ciclo de operação – dias de repouso e dias de alimentação. Profundidades: 15 cm e 30 cm. Distância em m do ponto de alimentação: D1 = 1 m; D2 = 2 m



4.2.3 Diversidade da comunidade bacteriana - AOB - baseada na PCR – DGGE – sequenciamento

A análise do perfil da estrutura da comunidade bacteriana e das espécies presentes nas amostras coletadas nos FPM (tanto em escala piloto como em escala real) foi realizada através do procedimento PCR – DGGE – sequenciamento.

As amostras foram coletadas seguindo as mesmas variáveis investigadas na qPCR: estação do ano; profundidade; distância do ponto de alimentação e; ciclo operacional – alimentação e repouso.

A região V3 do gene 16S das bactérias nitrificantes foi amplificada pela PCR, posteriormente o produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE).

Para facilitar a compreensão, os resultados foram separados em dois tópicos:

i) resultados das análises de DGGE – sequenciamento das amostras provenientes dos filtros em escala piloto;

ii) resultados das análises DGGE – sequenciamento das amostras provenientes dos filtros em escala real.

4.2.3.1 Diversidade da comunidade bacteriana dos filtros em escala piloto

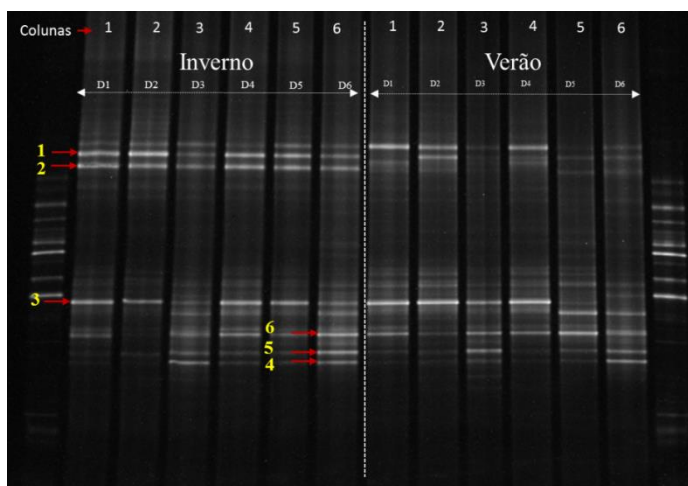
Os padrões de bandas do gel de DGGE referentes aos filtros pilotos (FPM/P1, FPM/P2 e FPM/P3) nas variáveis analisadas estão expostos a seguir. Cabe ressaltar que cada banda corresponde a um gênero ou a uma espécie bacteriana dominante na amostra, sendo que, quanto mais bandas houver, maior será a diversidade, assim como quanto mais intensa for a banda, maior será a abundância do grupo na amostra.

Em relação aos filtros FPM/P1 e FPM/P2, a Figura 58 mostra o padrão de bandas das comunidades de acordo com as variáveis testadas:

- i) Estação do ano: inverno e verão;
- ii) Pontos de coleta: distância do ponto de alimentação - D1, D2, D3, D4, D5, D6.

Figura 58 – Perfil de bandas dos fragmentos amplificados pela técnica de DGGE – FPM/P1 e FPM/P2.

Nas variáveis: profundidade – 20 cm, diferentes distâncias do ponto de alimentação (D1 a D6) e, nos períodos de inverno verão.



Em relação à diversidade espacial, temporal e quantitativa das bactérias presentes no gel da DGGE é possível confirmar os resultados obtidos pela qPCR, sendo claramente visível a distribuição das comunidades bacterianas. Nota-se assim, que no inverno encontra-se maior diversidade de bactérias e bandas mais intensas.

Em relação aos pontos de coleta (D1, D2, D3, D4, D5, D6), não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$). No entanto, é possível verificar que nas distâncias D3 e D6, uma maior quantidade de bandas foram identificadas e ambas se apresentaram de forma diferente em relação aos outros pontos e semelhantes entre si. Isso pode estar atrelado ao fato destes pontos serem os mais distantes do ponto de alimentação. Em outras palavras, a carga aplicada é mais forte quando próxima aos pontos de alimentação, o que ocasiona, também, uma diminuição do teor de oxigênio, podendo ser responsável por uma seleção bacteriana.

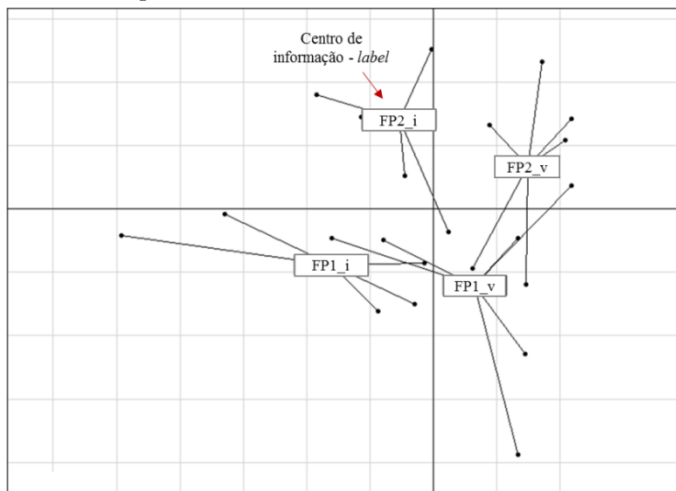
Para um melhor entendimento da distribuição bacteriana dos filtros em relação às variáveis selecionadas, foi realizada a análise estatística de Escalonamento multidimensional não-métrico (NMDS). Esta análise é multivariada de ordenação e tem por objetivo avaliar a dissimilaridade da composição de espécies com base na distância entre matrizes. Em outras palavras, possibilita verificar se existe distinção ou não entre comunidades analisadas.

A distância entre as amostras foi calculada pelo índice de *Jaccard*, sendo que a análise NMDS permitiu visualizar as distâncias entre as amostras. Cada amostra foi representada por um ponto. Quanto maior é a diferença entre as amostras, mais alongados são os pontos do centro de informação (*labels*) e, assim, maior é a diferença entre a comunidade bacteriana. Essas informações são expostas na Figura 59.

A partir do resultado da análise NMDS constatou-se que para o mesmo filtro houve diferença significativa entre as estações do ano, mostrando assim a influência da temperatura e demais fatores no perfil da comunidade bacteriana. Ademais, é possível perceber uma diferença do perfil entre os filtros (FPM/P1 e FPM/P2) em qualquer época do ano ($p: 0,001$).

Figura 59 – Análise estatística NMDS do gel da DGGE dos filtros pilotos FPM/P1 e FPM/P2.

Representação das estações do ano e distâncias do ponto de alimentação. Onde: FP1_i; FP1_v; FP2_i; FP2_v; correspondem aos filtros FPM/P1 e FPM/P2 no inverno e verão, respectivamente.



Em relação à variável – distâncias do ponto de alimentação – percebe-se que os pontos encontram-se dispersos aos *labels*. No entanto, a análise estatística não revelou diferença significativa entre eles (p : 0,068).

Posteriormente, as bandas foram submetidas a uma reamplificação com iniciadores 16S. Em seguida, o produto da PCR (DNA reamplificado) foi purificado para, finalmente, ser sequenciado. Os resultados estão expostos na Tabela 26.

Os organismos encontrados pelo sequenciamento foram taxonomicamente classificados no Domínio Bactéria e foram identificados a nível de gênero.

As bactérias do gênero *Nitrospira* são bactérias oxidantes de nitrito (NOB) quimioautotróficas, presentes tanto em ecossistemas aquáticos como terrestres. Além da sua ampla distribuição em habitats naturais, as espécies do gênero *Nitrospira* são as NOB predominantes em estações de tratamento de águas residuárias (LÜCKER *et al.*, 2010).

Tabela 26 – Resultados NCBI-BLAST para as sequências retiradas das bandas do gel de DGGE dos filtros FPM/P1 e FPM/P2.

Bandas	Grupos	% *	Fonte	n° de acesso <i>GenBank</i>
1	Bactéria <i>Nitrosomonas sp.</i> não cultivada. DSL_Nmon14 clone gene 16S RNA ribossomal, sequência parcial	95	Distribuição espacial e coagregação de bactérias nitrificantes em biofilmes de diferentes sistemas de águas residuais	JQ93653 4.1
2	Bactéria <i>Nitrospira sp.</i> não cultivada. clone gene 16S RNA ribossomal, sequência parcial	96	Diversidade e abundância de bactérias oxidantes amônia e archaea em <i>wetlands</i>	JQ94171 9.1
3	Bactéria <i>AOB: ammonia-oxidizing bacterium</i> não cultivada - L2_1 clone gene 16S RNA ribossomal, sequência parcial	94	Impactos das águas residuais pelos procariontes-oxidantes de amônia	JX02542 4.1
4	Bactéria <i>Nitrospira sp.</i> não cultivada. Isolada banda gel DGGE. gene 16S RNA ribossomal, sequência parcial	98	Bactérias oxidantes de amônia e estrutura da comunidade de archaea em solos de <i>wetlands</i> naturais	JX86255 0.1
5	Bactéria <i>Nitrospira sp.</i> não cultivada. Isolada banda gel DGGE S9. 16S gene 16S RNA ribossomal, sequência parcial	97	Grupo das <i>Nitrosomonas europaea</i> em camadas superficiais do solo em aterros com resíduos sólidos urbanos	EU16904 4.1
6	Bactéria <i>Nitrospira sp.</i> não cultivada. CA7 clone gene 16S RNA ribossomal, sequência parcial	97	Bactérias oxidantes de amônia e estrutura da comunidade de archaea em solos de <i>wetlands</i> naturais	JQ94171 8.1

* (%) – porcentagem de similaridade

Lücker *et al.*, (2010) afirmam que apesar da sua ampla distribuição e importância ecológica, poucos são os estudos referentes a

essas bactérias. A maioria dos registros da *Nitrospira sp* são de espécies não cultivadas. Além disso, ainda não foram obtidas sequências genômicas completas para as espécies *Nitrospira*. Os mesmos autores citam estudos recentes onde novas espécies foram descobertas – como a *Candidatus Nitrospira defluvii*, sendo encontradas em lodos ativados. Essas novas descobertas trazem como resultado o conhecimento de diferentes vias metabólicas e condições de crescimento dessas bactérias, podendo mudar a percepção atual da oxidação do nitrito.

Diante disso, fica evidente a necessidade de maiores estudos sobre a biologia das NOB, tendo em vista sua importância na ciclagem do nitrogênio em sistemas naturais e artificiais.

No que diz respeito à *Nitrosospira sp*, são bactérias aeróbias obrigatórias quimiolitotróficas oxidantes de amônia (AOB), portanto promovem a nitrificação, ou seja, são encarregadas do primeiro passo do processo da nitrificação.

Conforme determinado pelo estudo do gene 16S rRNA, o gênero *Nitrosospira* é dividido em cinco linhagens/grupos (PURKHOLD *et al.*, 2000), sendo atualmente representados por três espécies: *Nitrosospira briensis*, *Nitrosospira tenuis* e *Nitrosospira multiformis*, que são bastantes similares entre si e pertencentes a um mesmo clado.

No entanto, novas espécies estão sendo descobertas, conforme é possível ver no estudo realizado por Garcia *et al.* (2013), onde foi descrito uma nova espécie denominada *Nitrosospira lacus sp. nov.* Segundo os autores, essa espécie apresenta-se como bactéria extremofílica, ou seja, são organismos que possuem um melhor metabolismo e crescimento em temperaturas frias, com variação de -20 °C a 10 °C. Neste mesmo estudo a *Nitrosospira lacus sp* apresentou melhor crescimento em temperaturas de 4°C a 35°C, tendo seu crescimento inibido em temperaturas maiores a 35°C. Também foi constatado seu crescimento em pH 5, o menor pH registrado para culturas de AOB. No entanto, o pH ideal ficou entre 7 e 8.

Assim como para o gênero *Nitrosospira*, o gênero *Nitrosomonas* é constituído de bactérias AOB responsáveis pela primeira etapa da nitrificação. Estudo realizado por Urakawa *et al.*, (2015) demonstrou que as *Nitrosomonas* apresentaram uma taxa de crescimento superior em temperaturas de 10 °C, sendo que temperaturas maiores que à 35 °C tiveram efeito inibidor no crescimento das mesmas. Resultado semelhante foi visualizado para a bactéria *Nitrosomonas*

(anteriormente *Nitrosococcus*) *mobilis* no estudo feito por Koops *et al.* (1990).

Como é possível verificar na Figura 58, os gêneros *Nitrosospira* e *Nitrosomonas* apresentaram abundâncias nas amostras testadas para os filtros FPM/P1 e FPM/P2, havendo maior representatividade da *Nitrosomonas sp* no inverno, enquanto que a *Nitrosospira sp* parece ser apresentar comportamento homogêneo em ambas as estações.

Os três gêneros encontrados no sequenciamento para os filtros pilotos são comumente encontrados em sistemas para tratamento de águas residuárias, bem como para o sistema de filtros plantados com macrófitas. Vários estudos relatam a existência dessas bactérias (KREUZINGER *et al.*, 2003; TIETZ *et al.*, 2007; GORRA *et al.*, 2007; ZHOU *et al.*, 2009; RUIZ-RUEDA *et al.*, 2009; IASUR-KRUH *et al.*, 2010; MUSTAFA e SCHOLZ, 2010; SAEED e SUN, 2012; ARROYO *et al.*, 2015).

Finalmente, a análise de agrupamento foi realizada gerando um dendograma, apresentado na Figura 60. A partir do dendograma, é possível visualizar as semelhanças entre os diferentes perfis de DGGE (porcentagem) para os filtros FPM/P1 e FPM/P2 em ambas as estações do ano e pontos de coleta.

Em relação ao dendograma para o FPM/P1 (Figura 60a) é possível observar tanto as mudanças no perfil das bandas quanto as variações na sua intensidade de acordo com a estação do ano – inverno e verão

Quanto aos pontos de coleta (distâncias), observou-se que no período de inverno as distâncias apresentam elevado grau de similaridade (acima de 80%) — exceto para a D1 e D2, que se encontraram deslocadas com baixa similaridade em comparação com as demais. No que se refere ao período de verão, a similaridade dos pontos de coleta foi em torno de 70%, exceto para a D1, que apresentou maior similaridade com a D4 coletada no inverno.

Em termos gerais, o dendograma mostra claramente a diferença das comunidades bacterianas, embora a similaridade tenha ficado acima de 70%.

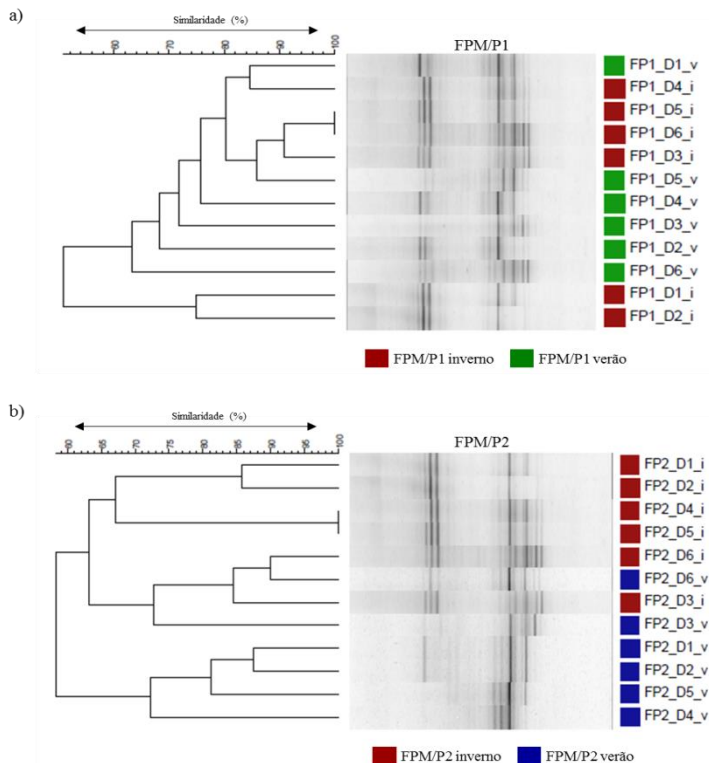
No que se refere ao dendograma para o FPM/P2 (Figura 60b) observou-se por este método de comparação que na variável estação do ano, o consórcio microbiano exibiu baixa similaridade (em torno de 60%), o que indica que as bactérias se comportaram de forma diferente no verão e no inverno. Já para os pontos de coleta, o dendograma indica similaridade acima de 70% para ambas as estações do ano (grupos separados por estação do ano).

Figura 60 – Dendograma de similaridade para os filtros pilotos – FPM/P1 e FPM/P2.

Onde: a) FP1 = FPM/P1 b) FP2 = FPM/P2.

D1, D2, D3, D4, D5, D6 = distâncias do ponto de alimentação;

v = verão e i = inverno.



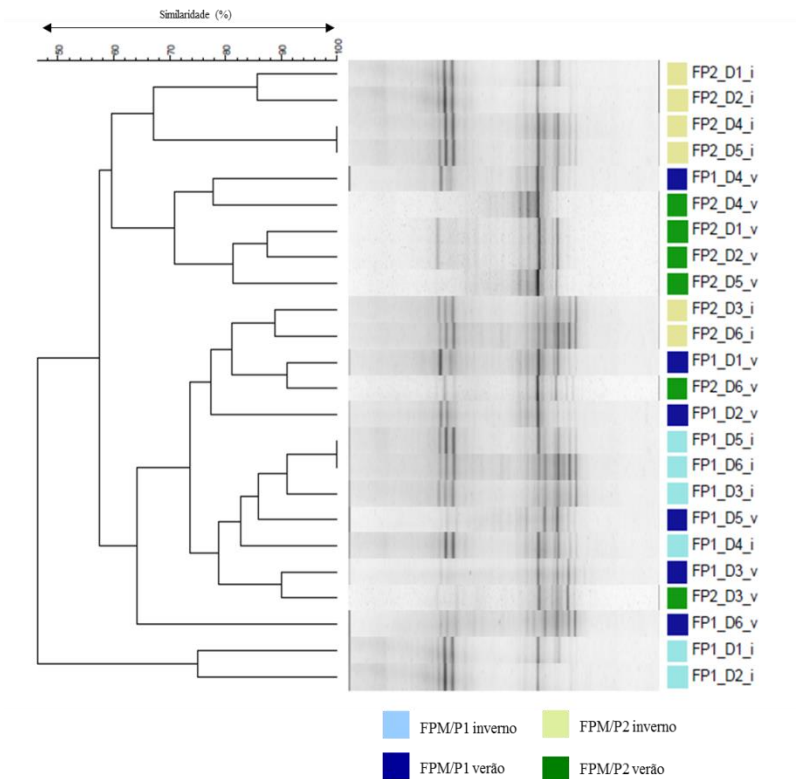
A nível de comparação entre os filtros – FPM/P1 e FPM/P2 – um dendograma único foi gerado (Figura 61). A partir deste dendograma, é possível perceber que os filtros se agruparam isoladamente, embora alguns pontos tenham se misturado, afirmando o resultado obtido pela análise estatística NMDS, a qual apresenta diferença significativa entres os filtros (p : 0,001).

Figura 61 – Dendograma de similaridade para ambos os filtros pilotos – FPM/P1 e FPM/P2.

Onde: a) FP1 = FPM/P1 b) FP2 = FPM/P2.

D1, D2, D3, D4, D5, D6 = distâncias do ponto de alimentação;

v = verão e i = inverno

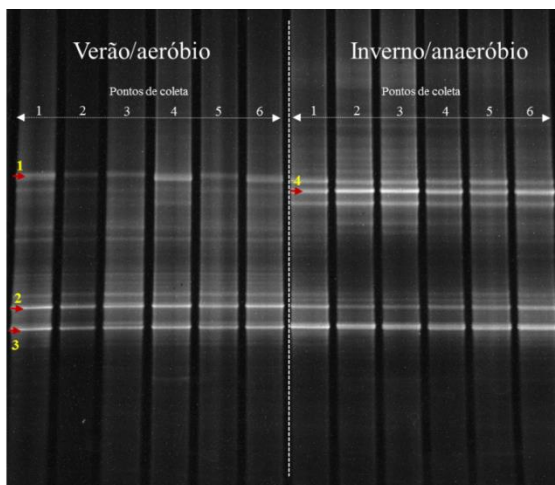


Assim como para os filtros discutidos nos parágrafos anteriores, o FPM/P3 também foi avaliado de acordo com as variáveis previamente estabelecidas, além da variável – condição de oxigenação: a) completamente saturado, ou seja, sob condição anaeróbia (coleta realizada no período de inverno); b) completamente aeróbio, ou seja, sob condição aeróbia (coleta realizada no período de verão).

O perfil microbiológico das amostras do FPM/P3 pode ser visualizado na Figura 62.

Figura 62– Perfil de bandas dos fragmentos amplificados pela técnica de DGGE – FPM/P3

Nas variáveis: profundidades, diferentes distâncias do ponto de alimentação e, nos períodos de inverno/anaeróbio e verão/aeróbio.



As bandas mais representativas foram selecionadas, excisadas do gel e reamplificadas. O produto da amplificação foi purificado e enviado para o sequenciamento.

Cada sequência obtida pelo procedimento supracitado foi submetida a uma análise de picos de bases no programa *Sequence Scanner Software 2®* e, posteriormente, foi realizada uma pesquisa BLAST. Como resultado foram encontradas bactérias oxidantes de amônia e de nitrito, assim como para os outros filtros estudados.

Os números de 1 a 4 representam as bandas selecionadas para o sequenciamento. Cabe ressaltar que as outras bandas alinhadas a estas também foram sequenciadas para confirmação do organismo. As bactérias encontradas pelo sequenciamento estão expostas Tabela 27.

Tabela 27– Resultados da pesquisa NCBI-BLAST para as sequências retiradas das bandas do gel de DGGE do filtro FPM/P3.

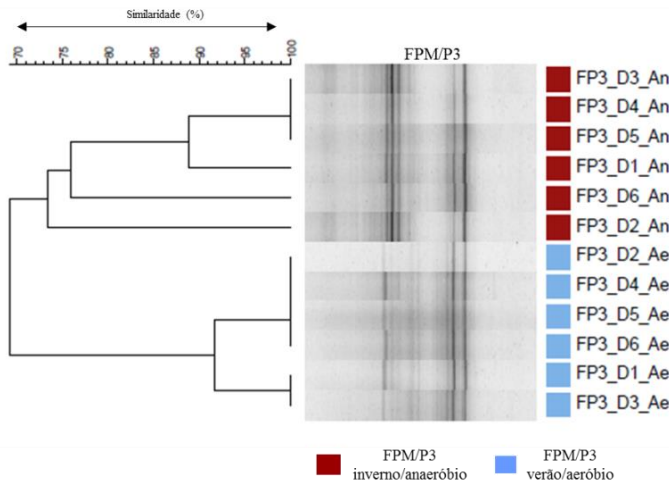
Bandas	Grupos	% *	Fonte	nº de acesso <i>GenBank</i>
1	Bactéria <i>Nitrospira</i> não cultivada. RM2-18 gene 16S RNA	99	A análise filogenética das AOB em águas residuais municipais de uma estação de tratamento baseado na tecnologia de Rizoremediação	AJ275885.1
2	Bactéria <i>Nitrospira sp.</i> não cultivada. Isolada gel DGGE C2-1. gene 16S RNA ribossomal, sequência parcial	96	Efeito de diferentes combinações de adubação sobre as características microbianas do solo inundado para plantação de arroz	KF016957.1
3	Bactéria <i>Nitrosomonas sp.</i> não cultivada. gene 16S RNA ribossomal, sequência parcial	99	A identificação e quantificação de AOB e NOB ligadas a nitrificação parcial e ANMMOX em biorreator	FN429864.1
4	Bactéria <i>Nitrosomonas sp.</i> Is79A3, Genoma completo	94	Sequência completa da <i>Nitrosomonas sp.</i> Is79A3	CP002876.1

* (%) – porcentagem de similaridade

Os resultados do perfil das impressões moleculares geradas pelo gel da DGGE para o FPM/P3 já foram expostos e discutidos no item da qPCR, não havendo necessidade de serem retomados aqui. O mesmo acontece para as bactérias encontradas tanto nos filtros FPM/P1 quanto nos FPM/P2. No entanto, para uma exploração maior dos dados, foi gerado um dendograma (Figura 63).

Figura 63– Dendrograma de similaridade do filtro piloto FPM/P3.

Onde: FP3 = FPM/P3; D1, D2, D3, D4, D5, D6 = distâncias do ponto de alimentação; Ae = condição aeróbia, período de verão; An = condição anaeróbia, período de inverno.

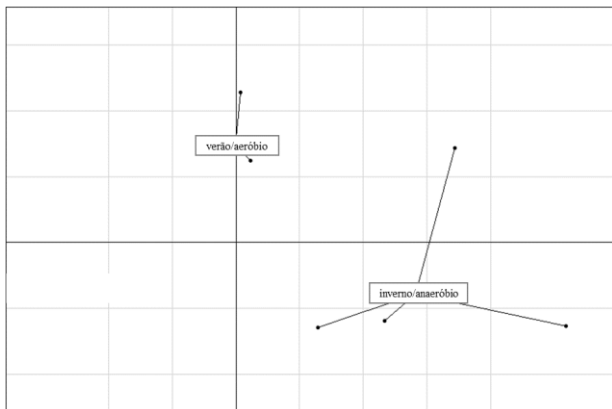


Constata-se que a condição de oxigenação influenciou a comunidade bacteriana, formando dois grupos – verão/aeróbio e inverno/anaeróbio — bem separados, ainda que a similaridade tenha sido de 70%.

Para as amostras coletadas no verão sob condição aeróbia, nota-se que estas tiveram alta similaridade (acima de 90%), indicando pouca variabilidade do perfil bacteriano nos diferentes pontos de coleta. Este resultado também foi encontrado pela análise estatística, que não apresentou diferença significativa entre os pontos ($p > 0,05$). Sob condição anaeróbia observa-se uma maior variabilidade no perfil das bandas, porém ainda com alta similaridade — acima de 70%.

A análise NMDS (Figura 64) permitiu visualizar as distâncias entre as amostras e a similaridade entre as condições de tratamento. Cada amostra foi representada por um ponto. Quanto maior for a diferença entre as amostras, mais alongados são os pontos do centro de informação (*labels*) e, assim, maior é a diferença entre a comunidade bacteriana.

Figura 64 – Análise estatística NMDS do gel da DGGE para o FPM/P3.



Nota-se que as condições de tratamento se encontram em diferentes quadrantes, indicando a diferença significativa entre os tratamentos (p : 0,001). Em relação às distâncias, notou-se o mesmo descrito anteriormente: para a condição de verão/aeróbica, as distâncias apresentaram maior similaridade. Cabe lembrar que quanto mais próximos do centro de informação, ou seja, quanto menos alongado o ponto, maior a similaridade.

De maneira geral, notou-se um impacto na comunidade bacteriana para os três filtros pilotos analisados em relação a variável estação do ano e condição de saturação para o FPM/P3.

Embora o maior nº de cópias do gene/g *pellet* das bactérias AOB e bactérias totais tenham sido documentadas no período de inverno, foi observado que a melhor eficiência dos filtros em relação a remoção dos parâmetros, principalmente o nitrogênio, ocorreu durante o período de verão, ou seja, mesmo que no verão tenha uma menor quantidade de bactérias AOB presentes nos sistemas, elas estavam ativas e realizando sua função no tratamento.

A maior quantidade de bactérias AOB quantificadas no inverno, pode estar atrelada ao fato dessas, segundo a literatura serem mais adaptadas para temperaturas mais baixas e menor teor de oxigênio. Ademais, o resultado da qPCR indica somente a quantidade e não a atividade, ou seja, embora possa ter havido maior quantidade de nº de cópias do gene/g *pellet* na amostra isso não indica atividade bacteriana. O que vem de encontro com os resultados físico-químicos, onde no

inverno foi verificado menor eficiência na remoção do nitrogênio, mesmo com maior quantidade de AOB quantificada.

Os resultados também demonstram o lento crescimento das NOB – mesmo sob condições ideais de potencial redox, oxigênio e temperatura –, enquanto que as AOB se mantiveram mais estáveis às perturbações ao longo das estações.

Também foi observado que não houve diferença entre os pontos de alimentação demonstrando a boa repartição do efluente no sistema piloto.

A diferença estatística em relação à comunidade bacteriana entre os filtros (FPM/P1 e FPM/P2) nas duas estações analisadas, bem como, para o mesmo filtro em qualquer época do ano, pode estar atrelada ao fator da temperatura, do teor de oxigênio, do desenvolvimento das plantas – o que interfere na microbiota – e, também pela mudança do nível de saturação do FPM/P2. Na segunda coleta este operava com 15 cm de saturação, o que pode ter contribuído para uma mudança no perfil bacteriano no filtro, uma vez que a camada aeróbia passou a ter uma maior área. Ou seja, mesmo que a coleta tenha sido realizada a 20 cm da superfície, a troca no nível de saturação com aumento da camada aeróbia pode ter afetado o perfil bacteriano do filtro com um todo.

Para o filtro FPM/P3 foi claramente visualizado a diferença do perfil de acordo com as duas variáveis analisadas – temperatura e condição de saturação. Em relação às espécies, também foi observado uma maior quantidade de AOB no inverno/anaeróbio. Mais uma vez reportando-se a melhor adaptação das bactérias AOB em baixas temperaturas e baixo teor de O_2 .

4.2.3.2 Diversidade da comunidade bacteriana dos filtros em escala real

As variáveis analisadas para a verificação dos perfis da comunidade bacteriana das estações de tratamento em escala real (E1, E2, E3, E4) foram as seguintes:

- Estação do ano: inverno e verão;
- Distância do ponto de alimentação;
- Profundidade;
- Ciclo operacional: dias de repouso e alimentação.

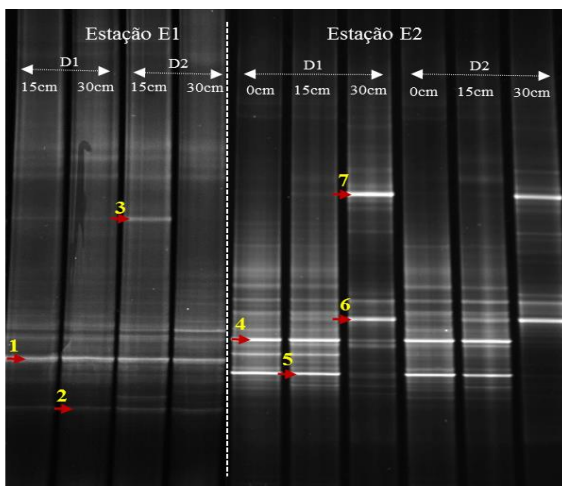
❖ Estações E1 e E2

As estações E1 e E2 foram analisadas no período de inverno.

A estação E1 é caracterizada como “jovem” – curto tempo de operação, sem depósito lodo na superfície. A estação E2 é caracterizada como “velha” – longo tempo de operação, com lodo depositado e neve no momento da amostragem. O perfil da comunidade bacteriana está exposto na Figura 65.

Figura 65 – Perfil de bandas dos fragmentos amplificados pela técnica de DGGE para as estações E1 e E2.

Onde: D1 = 1 m do ponto de alimentação; D2 = 2 m do ponto de alimentação; 0 cm, 15 cm e 30 cm de profundidade. Números indicam as amostras enviadas para o sequenciamento.



Em uma análise visual do gel da DGGE é possível observar que para a estação E1 o perfil microbiano foi bastante semelhante tanto em relação às distâncias do ponto de alimentação como em relação à profundidade. Já para a estação E2, é claramente visível a diferença do perfil da comunidade de bactérias nitrificantes em relação à variável profundidade, onde nota-se diferença de perfil de 0 e 15 cm para 30 cm.

Nota-se também que para ambas as estações a abundância de espécies foi bastante semelhante. Mesmo que a E1 seja uma estação “jovem” ela possuía no momento da análise dois anos de funcionamento, ou seja, um tempo bastante adequado para o desenvolvimento das bactérias.

A partir do resultado da DGGE, algumas bandas foram selecionadas e enviadas para o sequenciamento (tais bandas estão

indicadas pelos números de 1 a 7). As bactérias encontradas pelo sequenciamento estão expostas na Tabela 28.

Tabela 28– Resultados da pesquisa NCBI-BLAST para as seqüências retiradas das bandas do gel de DGGE dos filtros em escala real das estações E1 e E2.

Bandas	Grupos	% *	Fonte	nº de acesso <i>GenBank</i>
1; 3; 4	Bactéria <i>Nitrospira sp.</i> não cultivada. Isolada gel DGGE gene 16S RNA ribossomal, seqüência parcial	95	Efeito de diferentes combinações de adubação sobre as características microbianas do solo inundado para plantação de arroz	KF016957 .1
2	Bactéria <i>Nitrosospira sp.</i> não cultivada. Isolada gel DGGE gene 16S RNA ribossomal, seqüência parcial	94	Atividade, diversidade e tamanho populacional de bactérias oxidantes de amônia em <i>wetland</i> natural contaminado com óleo	DQ07619 1.1
5	<i>Bacterium</i> não cultivada. clone 20AOB-R379 gene 16S RNA ribossomal, seqüência parcial	95	Estudo preliminar e qualitativo da teoria da relação de recurso para nitrificantes em biorreatores de escala laboratorial	KC34699 5.1
6	Bactéria <i>Nitrospira sp.</i> não cultivada. Isolada gel DGGE C2-1 gene 16S RNA ribossomal, seqüência parcial	96	Efeito de diferentes combinações de adubação sobre as características microbianas do solo inundado para plantação de arroz	KF016957 .1
7	Bactéria <i>Nitrosomonas sp.</i> não cultivada. Isolada gel DGGE A6. gene 16S RNA ribossomal, seqüência parcial	88	Desempenho e dinâmica da população microbiana em biofilme de reator	JF506028. 1

* (%) – porcentagem de similaridade

Em relação às bactérias sequenciadas para a estação E1, como resultado obteve-se bactérias do gênero *Nitrospira*, pertencente ao grupo das bactérias oxidantes de nitrito (NOB), e *Nitrosospira sp.*, bactéria oxidante de amônia (AOB), como indicado na Tabela 28.

De acordo com o sequenciamento, percebe-se a existência de duas espécies de *Nitrospira* (1; 3), sendo a espécie (1) encontrada em todos os pontos de coletas e profundidades, mostrando-se bastante estável.

No que se refere à *Nitrosospira sp.*, o gênero também foi encontrado em todas as amostras, porém em menor intensidade, o que, por sua vez, é um indicador de menor quantidade de bactérias presentes, evidenciando a predominância das bactérias oxidantes de nitrito. Segundo alguns autores, em temperaturas baixas não ocorre a acumulação de nitrito (SCHMIDELL *et al.*, 2007), o que pode estar de acordo com o resultado encontrado para essa estação, onde houve prevalência das NOB.

Também é possível observar, ainda para E1, que na profundidade de 15 cm encontra-se uma maior quantidade de bandas, indicando maior presença de espécies. Esse resultado vem de encontro com o que foi observado na análise de qPCR.

Para a estação E2, é notável que a comunidade bacteriana é bastante semelhante para as profundidades de 0 cm e 15 cm, as quais diferenciam-se da profundidade de 30cm. A partir desse resultado pode-se observar o efeito da taxa da matéria orgânica – a qual é consideravelmente depositada nos primeiros centímetros do material filtrante em estações “velhas” – sobre a diversidade bacteriana. O que de certa forma é compreensível, visto que, a taxa de M.O. promove uma condição para o desenvolvimento das bactérias devido ao fornecimento de alimento, além disso, presença de umidade. Isto pode ser considerado consistente com o fato de – desde que haja concentrações suficientes de oxigênio – o envelhecimento do sistema pode ser positivo para o desempenho do tratamento.

Em relação às distâncias do ponto de alimentação (D1; D2) não foi observado diferença entre os perfis, mantendo uma similaridade para as profundidades de 0 cm e 15 cm nas duas distâncias, assim como para a profundidade de 30 cm.

As bandas selecionadas para o sequenciamento indicaram a presença dos gêneros *Nitrospira* e *Nitrosomonas*.

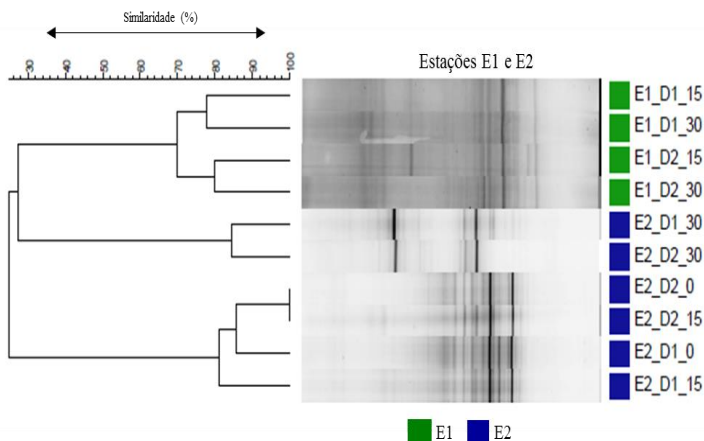
O gênero das AOB foi encontrado apenas na profundidade de 30 cm, enquanto que as bactérias NOB foram observadas em ambas as profundidades. Assim como citado nos resultados da qPCR, as bactérias

AOB são mais resistentes em ambientes com pouca concentração de oxigênio, o que pode explicar o fato destas bactérias serem mais abundantes na profundidade de 30 cm. Cabe lembrar que essa estação possuía uma camada de lodo depositado e devido ao período de inverno houve acúmulo de neve, ou seja, o desenvolvimento das AOB ocorreu em maior profundidade provavelmente devido às características supracitadas, bem como pela influência do dreno de aeração, que promove a introdução do O_2 nas camadas mais profundas do interior dos filtros.

Em estudo realizado por Tietz *et al.* (2007) foi encontrado a presença de bactérias AOB dominantes independente da profundidade do filtro vertical avaliado. Os autores indicam como resultado que as AOB estão presentes em diferentes condições ambientais, incluindo temperaturas mais frias. Além disso, a presença de bactérias oxidantes de amônia (AOB) em camadas mais profundas pode indicar que as condições aeróbias são prevalentes em todo o filtro. Nesse estudo foi observado que a comunidade bacteriana nitrificante estava bem estabelecida até uma profundidade de 50 cm.

Para representar os resultados visualizados no gel da DGGE, foi gerado um dendograma de similaridade para as duas estações Figura 66.

Figura 66– Dendograma de similaridade dos filtros em escala real – E1 e E2. Onde: D1 e D2 = distâncias do ponto de alimentação- 1m e 2m respectivamente; 0 cm, 15 cm e 30 cm = profundidades da amostragem



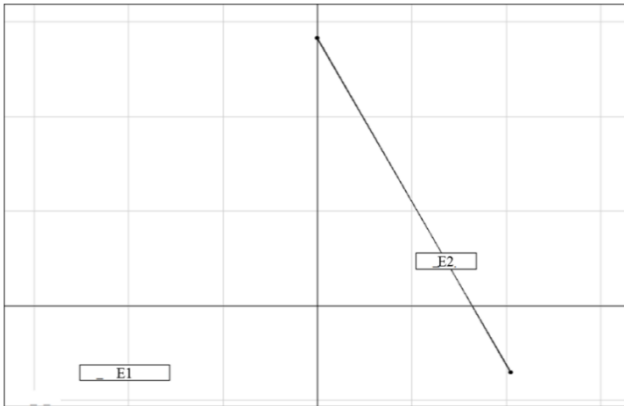
Observando o dendograma, é possível visualizar a baixa similaridade entre as duas estações (28%), indicando que existe uma grande diferença dos perfis da comunidade bacteriana encontrada em ambos os filtros. Essa diferença pode estar atrelada à variável – tempo de operação, em que a E1 é considerada uma estação “jovem” e a estação E2 é considerada “velha”.

Analisando somente a E1, nota-se alta similaridade entre as profundidades 15 cm e 30 cm: 80 % e 81% para as distâncias D1 e D2, respectivamente. Enquanto que entre as distâncias a similaridade foi de 70%. Essa alta similaridade indica a semelhança das comunidades nos diferentes pontos de coleta.

Para a estação E2, a similaridade na profundidade de 30 cm em ambas as distâncias foi de 85%, tendo baixa similaridade com as outras profundidades avaliadas.

A análise NMDS (Figura 67) representa estatisticamente a comunidade bacteriana encontrada para essas estações.

Figura 67 – Análise estatística NMDS do gel da DGGE para as estações E1 e E2.



A partir da análise NMDS é possível observar diferenças significativas entre as duas estações, pois cada uma encontra-se num quadrante oposto (p : 0,008). Além disso, a NMDS apresenta o que foi anteriormente descrito: para a E1, os pontos estão todos agrupados ao centro (atrás) do *label* de informação, indicando alta similaridade entre as distâncias analisadas; para a E2, o mesmo foi observado, com

exceção de dois pontos que se apresentam de forma alongada (esses pontos correspondem à profundidade de 30 cm).

No que se refere às estações de tratamento em escala real E3 e E4, um estudo mais aprofundado foi realizado em relação ao ciclo de operação – dias de repouso e alimentação, além das outras variáveis em comum testadas para todos os filtros.

❖ Estação E3

O gel da DGGE foi gerado fazendo uso de amostras obtidas em diferentes momentos do ciclo de operação, conforme explicado em Materiais e Métodos, onde alguns dias do ciclo operacional foram selecionados para as análises. Essa amostragem teve como objetivo verificar a distribuição espacial ao longo do ciclo operacional, isto é, verificar a influência dos dias de repouso e alimentação no perfil da comunidade bacteriana. As impressões moleculares para a E3 podem ser visualizadas na Figura 68.

As bactérias encontradas pelo sequenciamento estão expostas a seguir na Tabela 29.

Analisando o gel da DGGE juntamente com os resultados do sequenciamento é possível observar que as bactérias AOB (2, 3, 4, 5 e 8) estão em maior presença nos dias de repouso, principalmente no primeiro dia, diminuindo sua intensidade, embora ainda presentes, nos dias de alimentação e voltando a aumentar no primeiro dia de repouso subsequente.

As bactérias NOB (1, 6, 7 e 9), apresentaram-se em maior abundância e intensidade nos dias de alimentação.

Em relação ao período de repouso, no dendograma (Figura 69) exposto a seguir é possível observar que entre os dias 1R e 2R – correspondentes ao primeiro e segundo dia de repouso – o perfil microbiano possui acima de 80 % de similaridade. Apresentando maior similaridade entre as profundidades 15 cm e 30 cm e menor em relação a 0 cm. Em relação à distância, a similaridade dos filtros foi de 83%, indicando não haver diferença significativa, embora elas tenham sido agrupadas separadamente.

Para o quarto dia de repouso (4R) visualmente parece ter havido uma menor intensidade da comunidade bacteriana em relação aos primeiros dias de repouso. A similaridade do 4R com os dias 1R e 2R foi de 59%, indicando uma mudança no perfil microbiano. No sétimo dia de repouso (7R), o perfil aparece com predominância da bactéria AOB (4) e com elevada similaridade entre as variáveis – 88% e 100%

nas profundidades 15 cm e 30 cm na D1 e D2, respectivamente. O 7R foi mais similar com a 4R (67%) do que com os dias 1R e 2R (64%).

Em outras palavras, os primeiros dias de repouso (1R, 2R) apresentaram certa variabilidade da comunidade microbiana em relação aos últimos dias (4R, 7R). Algumas espécies de bactérias oxidantes de nitrito (NOB) do gênero *Nitrospira* não foram visíveis no gel da DGGE nem encontradas pelo sequenciamento a partir do 4R, voltando a aparecer no primeiro dia de alimentação (1A), sendo bastante abundantes no terceiro dia (3A), o que demonstra a preferência dessa bactéria pelo período em que o filtro está recebendo efluente.

Os dias 1A e 3A correspondem ao primeiro e terceiro dia de alimentação. No que diz respeito a este período, nota-se que as bactérias oxidantes de nitrito (NOB) o gênero *Nitrospira* é mais abundante do que as AOB. Como mencionado no parágrafo anterior, algumas espécies deste gênero voltaram a aparecer no período da alimentação. A espécie (7) aparece no primeiro dia de alimentação (1A) e no terceiro dia (3A) é visível o aumento da intensidade das bandas, indicando um aumento desta espécie. A espécie (9) também só é visível nos dias de alimentação.

Figura 68 – Perfil de bandas dos fragmentos amplificados pela técnica de DGGE para a estação E3.

Onde: D1 = 1 m do ponto de alimentação; D2 = 2 m do ponto de alimentação; 0 cm, 15 cm e 30 cm de profundidade. Números indicam as amostras enviadas para o sequenciamento.

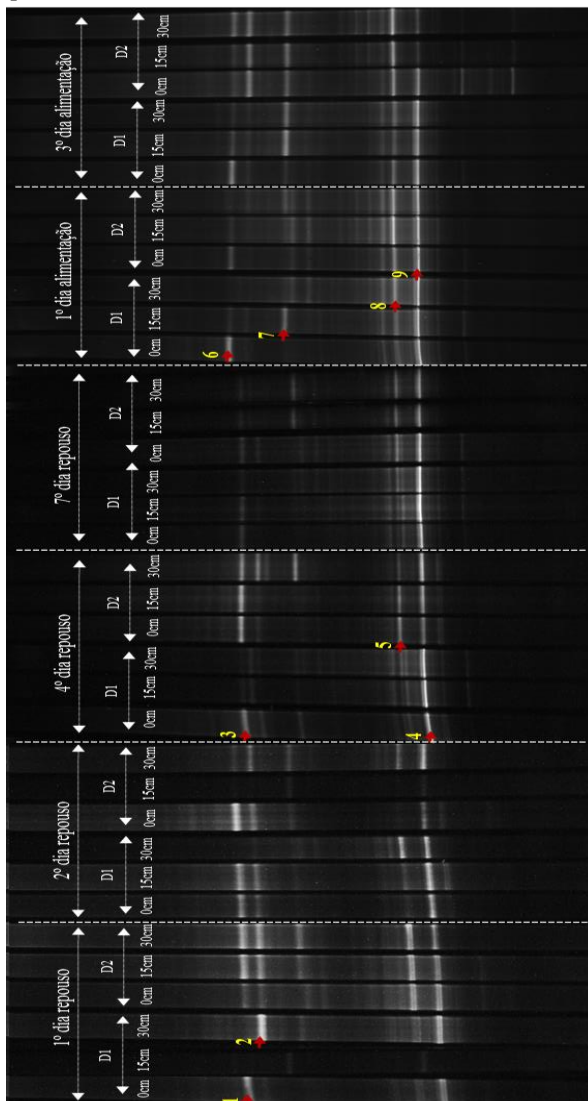


Tabela 29 – Resultados da pesquisa NCBI-BLAST para as sequências retiradas das bandas do gel de DGGE dos três filtros do primeiro estágio em escala real da estação E3.

Bandas	Grupos	% *	Fonte	nº de acesso <i>GenBank</i>
1	Bactéria <i>Nitrospira sp.</i> não cultivada. Isolada gel DGGE gene 16S RNA ribossomal, sequência parcial	93	Efeito de diferentes combinações de adubação sobre as características microbianas do solo inundado para plantação de arroz	KF016957.1
2	Bactéria <i>Nitrosospira sp.</i> não cultivada clone SBMSP4 gene 16S RNA ribossomal, sequência parcial	99	Bactérias oxidantes de amônia contribuem minimamente para nitrificação num ecossistema florestal impactado	AY293114.1
3	Bactéria <i>Nitrosospira sp.</i> não cultivada clone SBMDWa1 gene 16S RNA ribossomal, sequência parcial	97	Bactérias oxidantes de amônia contribuem minimamente para nitrificação num ecossistema florestal impactado	AY293097.1
4	<i>Nitrosospira.</i> não cultivada. RM2-18 gene 16S rRNA	95	A análise filogenética das AOB em águas residuais municipais de uma estação de tratamento baseada na tecnologia de Rizoremediação	AJ275885.1
5	Bactéria oxidante de amônia (AOB) não cultivada. clone L2_1 gene 16S RNA ribossomal, sequência parcial	94	Impactos do efluente de águas residuárias em bactérias oxidantes de amônia	JX025424.1
6	Bactéria <i>Nitrospira sp.</i> não cultivada. clone CA9 gene 16S RNA ribossomal, sequência parcial	98	Bactérias oxidantes de amônia e estrutura da comunidade de archaea em solos de <i>wetlands</i> naturais	JQ941719.1

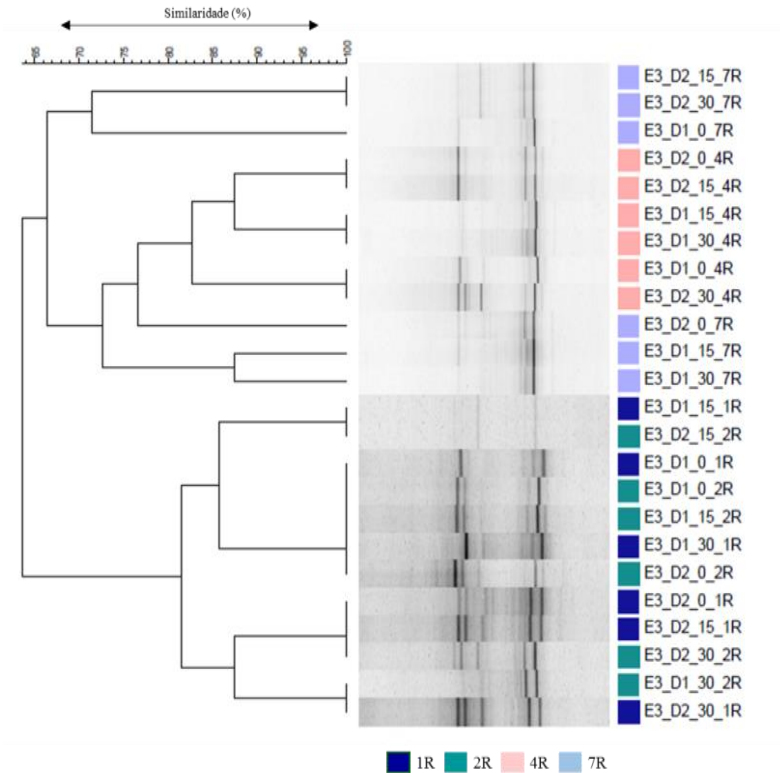
Continuação da Tabela 29 - Resultados da pesquisa NCBI-BLAST para as sequências retiradas das bandas do gel de DGGE dos três filtros do primeiro estágio em escala real da estação E3.

Bandas	Grupos	% *	Fonte	n° de acesso <i>GenBank</i>
7	Bactéria <i>Nitrospira sp.</i> não cultivada. Isolada gel DGGE gel. C2-1 gene 16S RNA ribossomal, sequência parcial	99	Efeito de diferentes combinações de adubação sobre as características microbianas do solo inundado para plantação de arroz	KF016957.1
8	Bactéria <i>ammonia-oxidizing beta proteobacterium.</i> não cultivada. clone 2409ST0505 gene 16S RNA ribossomal, sequência parcial	91	Distribuição das Betaproteobacteria oxidantes de amônia em manguezais (<i>Avicennia germinans</i>)	JQ725898.1
9	Bactéria <i>Nitrospira sp.</i> não cultivada. clone CA9 gene 16S RNA ribossomal, sequência parcial	97	Bactérias oxidantes de amônia e estrutura da comunidade de archaea em solos de <i>wetlands</i> naturais	JQ941719.1

* (%) – porcentagem de similaridade

Figura 69 – Dendograma de similaridade entre diferentes impressões moleculares para a estação E3.

Onde: D1 e D2 = distâncias do ponto de alimentação; 0 cm, 15 cm e 30 cm = profundidades da amostragem; 1A, 3A = primeiro e terceiro dia de alimentação; 1R, 2R, 4R e 7R = primeiro, segundo, quarto e sétimo dia de repouso.



Em termos gerais, de acordo com a análise dos perfis da comunidade bacteriana para a estação E3, nota-se um decaimento da diversidade durante o período de repouso e um aumento durante o período de alimentação. Nota-se também que nos primeiros dias de repouso ainda encontra-se uma certa abundância, isto pode estar relacionado com a dinâmica de crescimento das bactérias, além do fato de haver grande quantidade de nutrientes disponíveis (nitrogênio adsorvido no período da alimentação e nitrogênio particulado acumulado), presença de humidade e o oxigênio que adentra novamente no sistema, bem como, a DQO que foi em grande parte consumida

promovendo a disponibilização do oxigênio para as bactérias nitrificantes.

Os resultados da DGGE e do sequenciamento demonstram que a comunidade bacteriana da estação E3, composta por diferentes espécies, em relação ao ciclo operacional não se desenvolveu da mesma maneira, nem no mesmo período, nem na mesma velocidade, em relação as condições estudadas. Foi observada uma diminuição progressiva nos dias de repouso, demonstrando que o sétimo dia obteve uma quantidade bem inferior em comparação com os primeiros. Sendo assim, pode se concluir que esse tempo de repouso (sete dias) seriam suficientes – ou até menos que isso – para impedir um decaimento excessivo da comunidade bacteriana, otimizando assim a eficiência do tratamento. Logo, estudos mais aprofundados são necessários, visto que, esse resultado é de suma importância, uma vez que conhecendo a dinâmica das populações pode se aperfeiçoar, por exemplo, os modelos matemáticos aplicados para o estudo do crescimento bacteriano que não levam em consideração as diferenças comportamentais de cada espécie.

Todas essas informações podem ser visualizadas no dendograma exposto na Figura 70.

O dendograma apresenta para os dias 1A e 3A uma similaridade acima de 75%. Em relação às distâncias (D1 e D2), estas foram agrupadas separadamente. No entanto, apresentaram alta similaridade (80%). Quanto às profundidades analisadas, nota-se que em 15 cm e 30 cm a comunidade bacteriana é mais similar (praticamente 100% para todos os pontos).

Cabe ressaltar que esse filtro possuía no momento da coleta uma grande quantidade de M.O. até os 30 cm de profundidade, ou seja, demonstrando o impacto da camada de depósito sobre a comunidade bacteriana em estações com longo tempo de operação.

A análise estatística para a estação E3 em relação às variáveis estudadas está representada na (Figura 71). Através desta análise é possível observar o que foi descrito anteriormente. Assim, nota-se que houve diferença significativa entre os dias de alimentação e repouso (p : 0,001), demonstrando que dias de repouso e dias de alimentação modificam a estrutura da comunidade bacteriana.

A partir do gráfico da análise estatística NMDS é possível observar a proximidade entre os dias 1A e 3A, indicando maior similaridade entre eles, como citado anteriormente. Também é possível verificar que os pontos estão próximos ao centro de informação, reforçando o resultado da DGGE em relação à similaridade sobre as

distâncias (D1 e D2), demonstrando a boa repartição/homogeneização da distribuição do efluente no sistema (dois pontos de alimentação para 35 m² com 1m³/h/m²).

Figura 70– Dendograma de similaridade entre diferentes impressões moleculares para a estação E3.

Onde: D1 e D2 = distâncias do ponto de alimentação; 0 cm, 15 cm e 30 cm = profundidades da amostragem; 1A, 3A = primeiro e terceiro dia de alimentação; 1R, 2R, 4R e 7R = primeiro, segundo, quarto e sétimo dia de repouso.

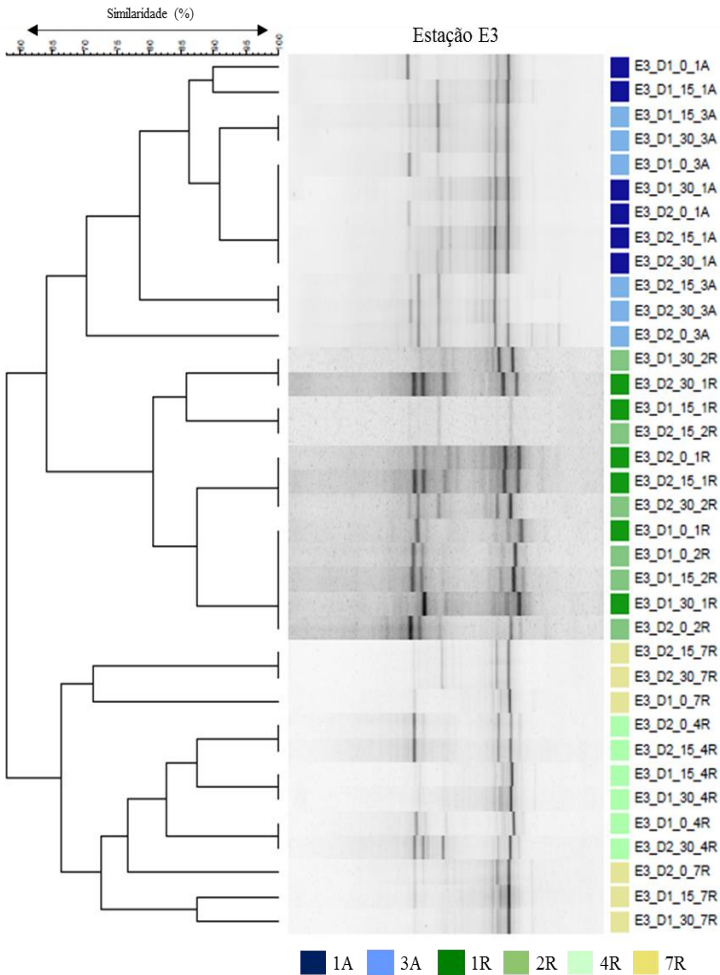
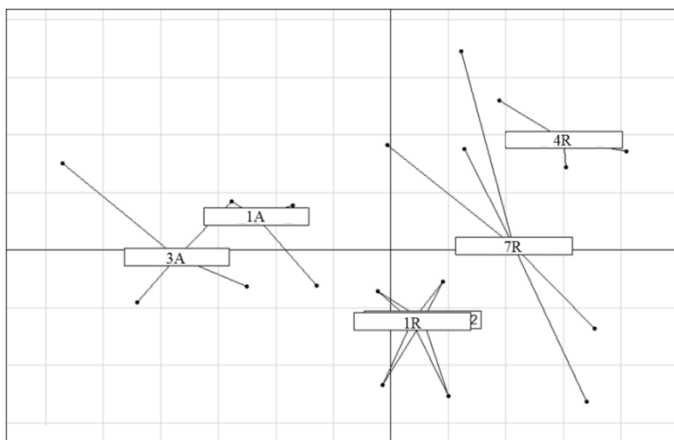


Figura 71 – Análise estatística NMDS do gel da DGGE para a estação E3.
 Nota: os dias 1R e 2R ficaram sobrepostos.



Para os dias de repouso nota-se que os dados foram agrupados em quadrantes opostos, afirmando a diferença em relação aos dias de alimentação. Os dias de repouso 1R e 2R apresentaram-se mais próximos, reafirmando a alta similaridade. O 7R mostrou-se próximo tanto em relação aos dias 1R, 2R como ao 4R. Já o 4R teve menor similaridade com os outros dias analisados. Esse fato pode indicar que esse período –quarto dia – corresponde a um momento de mudança do perfil bacteriano, uma vez que nesse dia houve uma maior abundância das bactérias AOB e a diminuição ou ausência das bactérias NOB.

A partir desse resultado pode observar uma evolução temporal através do período de alimentação e repouso, onde existe um ciclo de crescimento e diminuição de certas bactérias, decorrente das variações provenientes de suas peculiaridades e das condições ambientais do filtro.

❖ Estação E4

Assim como para a estação descrita anteriormente, o gel da DGGE para a E4 foi gerado fazendo uso de amostra obtidas em diferentes momentos do ciclo de operação – dias de alimentação e repouso. No entanto, para esta estação as profundidades analisadas foram 15 cm e 30 cm, uma vez que se tratava de uma estação “jovem” – sem depósito de

lodo na sua superfície. As impressões moleculares para a E4 podem ser visualizadas na Figura 72.

Após os resultados da DGGE, algumas bandas foram selecionadas e enviadas para o sequenciamento. Cabe lembrar que as bandas indicadas pela numeração correspondem às sequências que obtiveram resultado positivo no sequenciamento. Além disso, as bandas alinhadas a estas também foram excisadas do gel em todos os dias do ciclo de operação e enviadas para o sequenciamento a fim de confirmação do organismo. A partir dos resultados as bandas foram identificadas pelos números de 1 a 9 e suas descrições se encontram na Tabela 30.

Em termos gerais, analisando os resultados do sequenciamento e do gel DGGE, nota-se que no início do período de repouso houve uma maior abundância para as bactérias oxidantes de amônia (AOB), sendo que no período de alimentação a maior abundância foi das bactérias oxidantes de nitrito (NOB), assim como encontrado também para a estação E3. Os resultados do sequenciamento apontam dois gêneros predominantes: *Nitrosospira* e *Nitrospira*.

Também é possível observar que não houve grandes variações ao longo dos dias do ciclo operacional nem em termos de pontos de coleta (distâncias D1 e D2), tampouco em relação à profundidade, demonstrando que a comunidade bacteriana a 15 cm e 30 cm possui elevada similaridade.

Em relação às espécies nomeadas 1, 4 e 9, o resultado do sequenciamento aponta todas pertencentes ao mesmo gênero – *Nitrosospira*. Essas AOB foram detectadas em todos os dias do ciclo operacional, mesmo que em baixa intensidade.

No que diz respeito às espécies – 1 e 4 –, o sequenciamento indica que correspondem todas à espécie, chamada de *Nitrosospira lacus sp. nov.*. Esta espécie foi descoberta no trabalho realizado por Garcia *et al.* (2013), sendo apontada como uma bactéria extremofílica, ou seja, organismos que possuem um melhor metabolismo e crescimento em temperaturas frias, com variação de -20 °C a 10 °C. Já espécie – 9 – foi identificada somente a nível de gênero, encontrando-se apenas no segundo e terceiro dia de alimentação. Em contrapartida, as espécies – 1 e 4 – não estão presentes no segundo e terceiro dia de alimentação. A presença dessa bactéria também pode explicar a maior quantidade de bactérias AOB encontradas no período de inverno.

Figura 72– Perfil bandas dos fragmentos amplificados pela técnica de DGGE utilizando DNA genômico para a estação E4. Onde: D1 = 1 m do ponto de alimentação; D2 = 2 m do ponto de alimentação; 15 cm e 30 cm de profundidade. Números indicam as amostras enviadas para o sequenciamento.

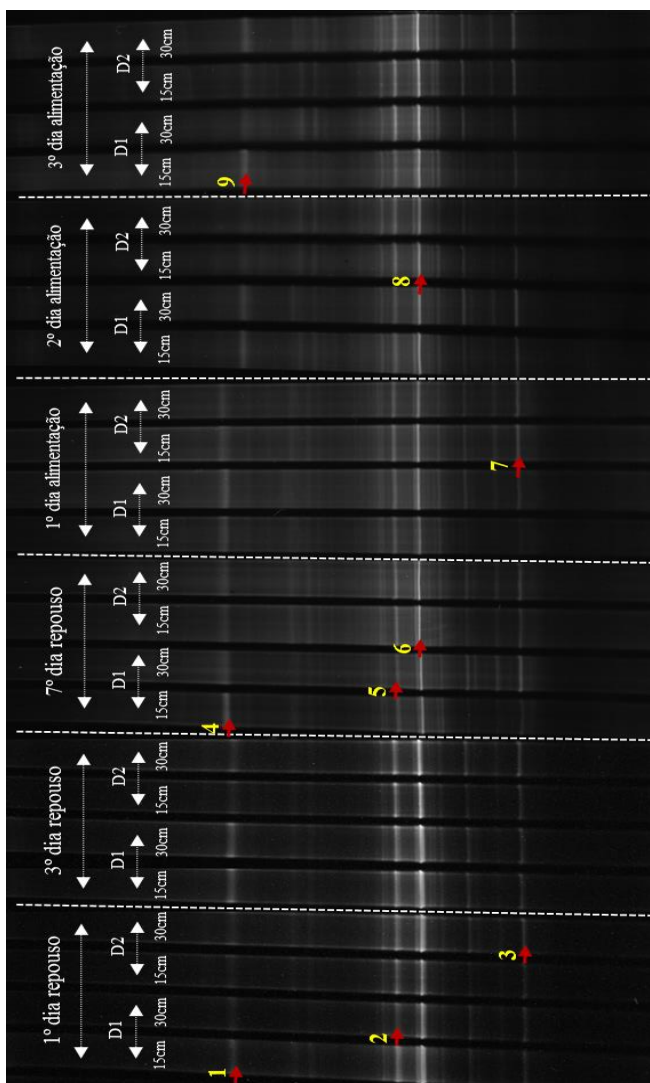


Tabela 30 – Resultados da pesquisa NCBI-BLAST para as sequências retiradas das bandas do gel de DGGE dos três filtros do primeiro estágio em escala real da estação E4.

Bandas	Grupos	% *	Fonte	nº de acesso <i>GenBank</i>
1	Bactéria <i>Nitrosospira</i> . não cultivada. APG3 gene 16S RNA ribossomal, sequência parcial	100	<i>Nitrosospira lacus sp. nov.</i> bactéria oxidante amônia extremofílica	KC477402.1
2	Bactéria <i>Nitrosospira sp.</i> YKU28 gene 16S RNA ribossomal, sequência parcial	93	Remoção de nitrogênio via nitrificação parcial e Anammox em biorreator	KP074947.1
3	Bactéria <i>Nitrosospira sp.</i> não cultivada. Isolada gel DGGE C2-1 gene 16S RNA ribossomal, sequência parcial	96	Efeito de diferentes combinações de adubação sobre as características microbianas do solo inundado para plantação de arroz	KF016957.1
4	Bactéria <i>Nitrosospira</i> . APG3 16S RNA ribossomal, sequência parcial	98	<i>Nitrosospira lacus sp. nov.</i> bactéria oxidante amônia extremofílica	KC477402.1
5	Bactéria <i>Nitrosospira sp.</i> YKU29 16S RNA ribossomal, sequência parcial	95	Remoção de nitrogênio via nitrificação parcial e Anammox em biorreator	KP074948.1
6	Bactéria <i>Nitrosospira sp.</i> não cultivada. Isolada gel DGGE C2-1 16S RNA ribossomal, sequência parcial	99	Efeito de diferentes combinações de adubação sobre as características microbianas do solo inundado para plantação de arroz	KF016957.1

Continuação da Tabela 30 - – Resultados da pesquisa NCBI-BLAST para as seqüências retiradas das bandas do gel de DGGE dos três filtros do primeiro estágio em escala real da estação E4.

Bandas	Grupos	% *	Fonte	nº de acesso <i>GenBank</i>
7	Bactéria <i>Nitrospira sp.</i> não cultivada. clone CA9 16S RNA ribossomal, seqüência parcial	98	Bactérias oxidantes de amônia e estrutura da comunidade de archaea em solos de <i>wetlands</i> naturais	JQ941719.1
8	Bactéria <i>Nitrospira sp.</i> não cultivada. Isolada gel DGGE C2-1 16S RNA ribossomal, seqüência parcial	99	Efeito de diferentes combinações de adubação sobre as características microbianas do solo inundado para plantação de arroz	KF016957.1
9	Bactéria <i>Nitrosospira sp.</i> YKU28 16S RNA ribossomal, seqüência parcial	93	Remoção de nitrogênio via nitrificação parcial e Anammox em biorreator	KP074947.1

* (%) – porcentagem de similaridade

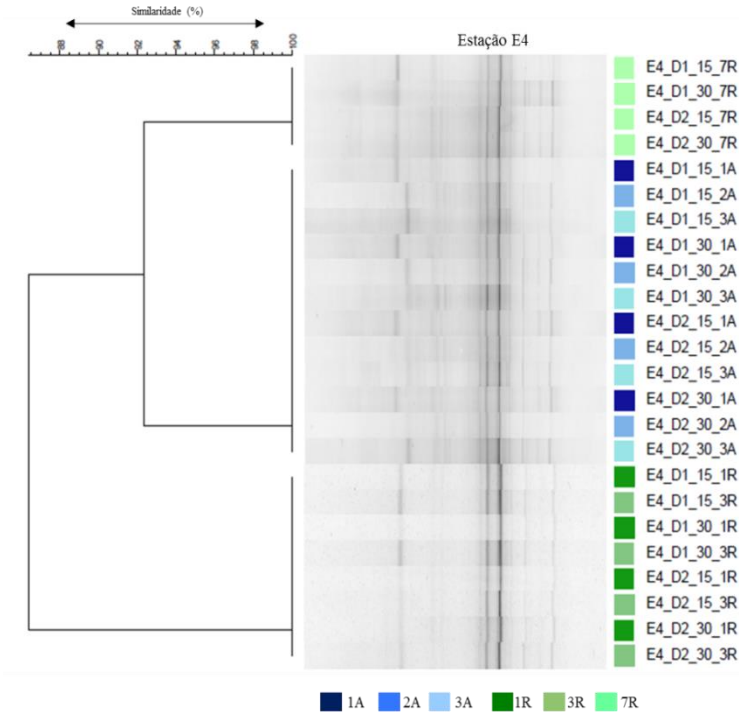
As espécies – 2 e 5 – também do grupo das AOB e mesmo gênero foram encontraram em todas as condições ao longo do tempo. Porém, é possível observar que houve uma maior intensidade das bandas nos primeiros dias de repouso.

Quanto as espécies 3, 6, 7 e 8, todas correspondem às bactérias NOB do gênero *Nitrospira*. Nota-se que a – 3 e 7 – correspondem provavelmente à mesma espécie devido ao número de pares de bases, sendo separadas pelo mesmo peso molecular. O mesmo ocorre para as espécies indicadas pelos números – 6 a 8. Essas bactérias foram encontradas em todos os dias ao longo do ciclo operacional, com bastante similaridade.

A porcentagem de similaridade é observável a partir do dendograma representado pela Figura 73.

Figura 73– Dendograma de similaridade entre diferentes impressões moleculares para a estação E4.

Onde: D1 e D2 = distâncias do ponto de alimentação; 15 cm e 30 cm = profundidades da amostragem; 1A, 2A e 3A = primeiro, segundo e terceiro dia de alimentação; 1R, 3R e 7R = primeiro, terceiro e sétimo dia de repouso.



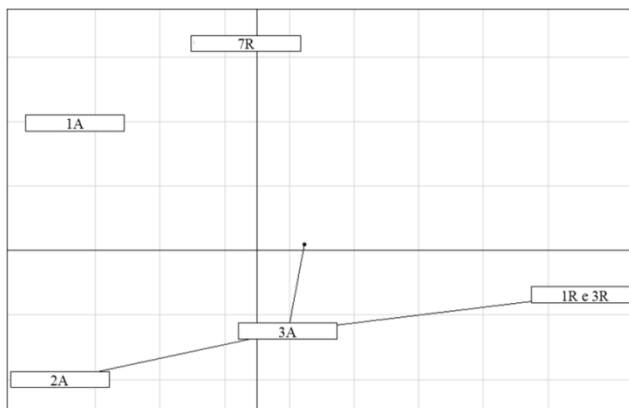
Analisando o agrupamento gerado pelo dendrograma, percebe-se a separação dos dias de repouso e alimentação, demonstrando diferença entre os perfis microbianos, mesmo que haja alta similaridade (85%).

Em relação aos dias de alimentação, todos apresentaram elevada porcentagem de similaridade (próximo de 100%) conforme o dendrograma. O mesmo foi observado para os dias de repouso, exceto para o 7R, que apresentou similaridade de 85% com os outros dias de repouso e 92% em relação aos dias de alimentação. Essa maior similaridade do 7R com os dias de alimentação pode ser explicado (como já mencionado nos resultados da qPCR) devido o aparente

crescimento bacteriano no período de repouso com diminuição na alimentação, conforme encontrado também para a estação E3.

O resultado da multivariada NMDS (Figura 74) demonstra estatisticamente o que foi mencionado anteriormente entre os períodos – repouso e alimentação – e em relação às variáveis analisadas.

Figura 74 – Análise estatística NMDS do gel da DGGE para a estação E4 ($p = 0,001$)



Por fim, quando ambas as estações – E3 e E4 – foram comparadas, estatisticamente e pela análise de agrupamento por similaridade foi observado diferença estatísticas entre elas: $p = 0,001$ e similaridade de 54%.

De acordo com os resultados obtidos para a estação E4, parece que – ao menos visualmente – em uma estação “jovem”, encontra-se uma menor diversidade de bactérias. Além disso, que uma maior abundância é encontrada no início do período de repouso assim como para os primeiros dias de alimentação. Esses resultados vêm de encontro com os obtidos para a estação E3, portanto, a estação E4 possui algumas similaridades com a estação E3, todavia em menor amplitude devido ser uma estação jovem.

Em relação aos gêneros encontrados para todos os filtros – pilotos e escala real – foi observado que estes foram os mesmos. Porém as espécies que compõe esses gêneros apresentaram-se de forma diferentes com variações de comportamento (abundância, presença e

ausência) em relação às variáveis testadas – profundidade, distância do ponto de alimentação, estação do ano e ciclo operacional. Resultados semelhantes ao encontrado neste estudo foram observados por Tietz *et al.* (2007).

Trurakama *et al.* (2015) cita que as bactérias do gênero *Nitrospira* e *Nitrosomona* diferem entre si em relação a tolerância da amônia. Sendo as *Nitrospira sp* geralmente mais susceptíveis a concentrações elevadas de amônia, do que as espécies do gênero *Nitrosomonas*. Damis *et al.* (2001) e Rowan *et al.* (2003) também afirmam que a diversidade bacteriana de um sistema de tratamento de águas residuárias tem um grande impacto na estabilidade dos processos que ali ocorrem.

5. CONCLUSÕES

A partir da pesquisa foram obtidas as seguintes conclusões:

- Hidraulicamente, o fluxo através dos filtros pilotos mudou significativamente ao longo das estações do ano, melhorando, em termos de batelada, sua condição de funcionamento do inverno para o verão. O que por sua vez influenciou na condição de oxigenação e do potencial redox. A análise hidráulica retratou o comportamento dos filtros, o que foi de grande importância para compreender quais fatores afetou a eficiência na remoção das formas nitrogenadas.

- Os filtros operaram de forma intermitente com uma carga hidráulica de 0,23 m/d durante o período de alimentação, período este correspondente a 2,5 dias.

- O potencial redox e o oxigênio medidos em três diferentes profundidades no interior dos filtros mostraram claramente as mudanças de valores dessas medidas de acordo com o nível de saturação, com o ciclo de repouso e alimentação e, no período em que os filtros estiveram colmatados. Os valores de Eh e O₂ durante o período de colmatação apresentaram condições oxidantes contínuas e baixas, o que afetou a eficiência do tratamento (Sonda Eh localizada a 38 cm: valores entre 300 a - 200 mV e, com valores para O₂ entre 2 a 6%; Sonda Eh_49 cm 100 a 500 mV e O₂: 12 a 21%; Sonda Eh_62,5 cm - 300 mV e O₂ de 2 a 4%). No período de operação hidráulica normal, estes valores indicaram a existência de condições redox ideais para o tratamento do efluente nas diferentes situações de saturação avaliadas para ambos os filtros (valores médios: Sonda Eh_38 cm entre - 100 a 450 mV e O₂ de 8 a 20%; Sonda Eh_49 cm entre 30 e 400 mV e O₂ de 10 a 18%; Sonda Eh_68 cm entre -200 e - 300 mV e O₂ entre 2 a 3%).

- Na Fase 1, os pilotos (ambos com 25 cm de saturação) apresentaram comportamento estatístico similar. Em termos de eficiência durante o tratamento para ambos os filtros obtiveram-se boas eficiências de remoção: média de 86% para os sólidos; 47% para DQO dissolvida; 56% para a nitrificação e 85% para a desnitrificação. Considerando que estes resultados correspondem ao tratamento de um único filtro do primeiro estágio do Sistema Francês, pode-se afirmar que as eficiências de remoção são satisfatórias.

- Na Fase 2 – camada de saturação de 25 cm para o FPM/P1 e de 15 cm para o FPM/P2 –, com exceção do amônio, os filtros

apresentaram diferentes taxas de desempenho em relação aos parâmetros avaliados. A redução da camada saturada influenciou de forma negativa a remoção dos sólidos e da DQO, bem como a eficiência da desnitrificação, embora com uma taxa de remoção satisfatória (média de 75% para os sólidos; 36% para DQO dissolvida; 45% para a nitrificação e 65% para a desnitrificação).

- Portando, o nível de saturação de 25 cm (Fase 1), com TDH teórico de 6,66 h, apresentou o melhor desempenho de remoção de poluentes entre as saturações avaliadas neste estudo, com base na avaliação dos parâmetros físico-químicos, potencial redox e oxigênio.

- Deve-se notar que para a nitrificação, o menor tempo de detenção hidráulica, a oxigenação, o fluxo e a velocidade de drenagem são fatores importantes para a eficiência do tratamento, para além dos fatores físicos e biológicos.

Em relação às análises da diversidade microbiana foram obtidas as seguintes conclusões:

- Para todos os filtros analisados não houve diferença estatística em relação aos diferentes pontos de coletas (distâncias do ponto de alimentação), demonstrando uma boa e homogênea repartição do afluente na superfície dos filtros.

- Para os filtros pilotos a maior quantidade de bactérias foi detectada no período de inverno. Isso indica que as bactérias tardam a se estabelecer, demonstrando o impacto do inverno na estrutura bacteriana.

- Para as estações em escala real, a maior quantidade (n° cópias gene/g *pellet*) de bactérias foi detectada na profundidade de 30 cm, demonstrando que a camada de M.O. depositada tem um papel importante na estrutura do perfil microbiano.

- A dinâmica de crescimento das bactérias observada nos dias de alimentação e repouso indica que um período de repouso de sete dias utilizado no Sistema Francês seria suficiente para impedir um decaimento excessivo da comunidade bacteriana, otimizando assim a eficiência do tratamento.

Filtros plantados com macrófitas são extremamente dinâmicos e possuem um ambiente heterogêneo, em que a variação dos parâmetros físico-químicos e ambientais interfere fortemente na eficiência do tratamento, bem como nos organismos envolvidos nos processos de transformação do nitrogênio.

Além disso, a diversidade de micro-organismos envolvidos no ciclo do nitrogênio em filtros plantados com macrófitas é extremamente mais ampla do que se imaginava ou, do que se tem descoberto até o

momento. Ademais, estudos sobre a diversidade da comunidade bacteriana em sistemas de FPM não são raros, porém, ainda bastante incompletos em relação à complexidade existente nesses sistemas. Sendo assim, é de certo modo difícil obter-se conclusões exatas sobre a dinâmica da estrutura da comunidade microbiana em filtros plantados com macrófitas, ou a sua relação com os processos de remoção e parâmetros operacionais. Portanto, mais estudos devem ser realizados para que isso se torne possível.

6. RECOMENDAÇÕES

- Testar diferentes alturas (maiores e menores) da camada saturada, além das utilizadas nesta tese;
- Realizar análises da microbiota ao longo de toda a profundidade do filtro, além de diferentes variáveis como: temperatura, efeito de carga orgânica e hidráulica;
- Aprofundar o conhecimento e investigação sobre a comunidade bacteriana através do sequenciamento completo do 16S;
- Utilizar modelos matemáticos existentes, a fim de relacionar com os resultados obtidos pelas técnicas da biologia molecular.

REFERÊNCIAS

ADRADOS, B. et al. Microbial communities from different types of natural wastewater treatment systems: vertical and horizontal flow constructed wetlands and biofilters. **Water Research**, v. 55, p. 304-312, 2014.

AFNOR, 2005. Recueil Normes et Réglementation Environnement. **Qualité de l'eau**, Vol 1 (p552), Vol 2 (p 502).

AMANN R. I.; LUDWIG, W.; SCHULZE, R.; SPRING, S.; MOORE, E.; SCHLEIFER, K. rRNA-targeted oligonucleotide probes for the identification of genuine and former pseudomonads. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 19, n. 4, p.501-509, 1996.

ANSOLA, Gemma; ARROYO, Paula; DE MIERA, Luis E. Sáenz. Characterisation of the soil bacterial community structure and composition of natural and constructed wetlands. **Science of the Total Environment**, v. 473, p. 63-71, 2014.

ARIAS, Luis; BERTRAND-KRAJEWSKI, Jean-Luc; MOLLE, Pascal. Simplified hydraulic model of French vertical-flow constructed wetlands. **Water Science & Technology**, v. 70, n. 5, p. 909-916, 2014.

ARROYO, Paula; DE MIERA, Luis E. Sáenz; ANSOLA, Gemma. Influence of environmental variables on the structure and composition of soil bacterial communities in natural and constructed wetlands. **Science of The Total Environment**, v. 506, p. 380-390, 2015.

BAPTISTA, J. D. C. et al. Microbial mechanisms of carbon removal in subsurface flow wetlands. **Wetland Systems for Water Pollution Control VIII**, v. 48, n. 5, p. 127-134, 2003.

BAPTISTA, Joana de C. et al. The microbial diversity of laboratory-scale wetlands appears to be randomly assembled. **Water research**, v. 42, n. 12, p. 3182-3190, 2008.

BIAŁOWIEC, Andrzej et al. Nitrogen removal from landfill leachate in constructed wetlands with reed and willow: Redox potential in the root zone. **Journal of environmental management**, v. 97, p. 22-27, 2012.

BÖCKELMANN, Uta; SZEWCZYK, Ulrich; GROHMANN, Elisabeth. A new enzymatic method for the detachment of particle associated soil bacteria. **Journal of microbiological Methods**, v. 55, n. 1, p. 201-211, 2003.

BÖCKELMANN, Uta; SZEWCZYK, Ulrich; GROHMANN, Elisabeth. A new enzymatic method for the detachment of particle associated soil bacteria. **Journal of microbiological Methods**, v. 55, n. 1, p. 201-211, 2003.

BOOG, Johannes et al. Hydraulic characterization and optimization of total nitrogen removal in an aerated vertical subsurface flow treatment wetland. **Bioresource technology**, v. 162, p. 166-174, 2014.

BORCH, Thomas et al. Biogeochemical redox processes and their impact on contaminant dynamics. **Environmental science & technology**, v. 44, n. 1, p. 15-23, 2009.

BOUTIN, Catherine; LIÉNARD, Alain; ESSER, Dirk. Development of a new generation of reed-bed filters in France: first results. **Water Science and Technology**, v. 35, n. 5, p. 315-322, 1997.

BRIX, H. Wastewater treatment in constructed wetlands: system design, removal processes, and treatment performance. **Constructed wetlands for water quality improvement**, p. 9-22, 1993.

BRIX, Hans. Do macrophytes play a role in constructed treatment wetlands?. **Water Science and Technology**, v. 35, n. 5, p. 11-17, 1997.

BRIX, Hans. Functions of macrophytes in constructed wetlands. **Water Science and Technology**, v. 29, n. 4, p. 71-78, 1994.

BURVINGT e HEDUIT. Cinétique de dénitrification. **Cemagref**. 1987.

CALHEIROS, C. S. C. et al. Bacterial community dynamics in horizontal flow constructed wetlands with different plants for high

salinity industrial wastewater polishing. **Water research**, v. 44, n. 17, p. 5032-5038, 2010.

CALJURI, Maria Lúcia et al. Tratamento de esgotos sanitários em sistemas reatores UASB/wetlands construídas de fluxo horizontal: eficiência e estabilidade de remoção de matéria orgânica, sólidos, nutrientes e coliformes. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 14, n. 3, 2009.

CAMPER, Anne K. et al. Evaluation of procedures to desorb bacteria from granular activated carbon. **Journal of Microbiological Methods**, v. 3, n. 3, p. 187-198, 1985.

CAPUTO, Homero Pinto. **Mecânica dos Solos e suas Aplicações: Fundamentos**. 6a ed., v. 1. Rio de Janeiro: LTC Editora. 233 p. 1993.

CERVANTES, Francisco J. (Ed.). **Environmental technologies to treat nitrogen pollution**. IWA Publishing, 2009.

CHANG, Jun-jun et al. Treatment performance of integrated vertical-flow constructed wetland plots for domestic wastewater. **Ecological Engineering**, v. 44, p. 152-159, 2012.

CHAZARENC, F.; MERLIN, G. Influence of surface layer on hydrology and biology of gravel bed vertical flow constructed wetlands. **Water Science & Technology**, v. 51, n. 9, p. 91-97, 2005.

CHEN, T. Y. et al. Application of a constructed wetland for industrial wastewater treatment: a pilot-scale study. **Chemosphere**, v. 64, n. 3, p. 497-502, 2006.

COOPER, P. F. et al. Reed beds and constructed wetlands for wastewater treatment. **European water pollution control**, v. 6, n. 7, p. 49, 1996.

CORBELLA, Clara; GARFÍ, Marianna; PUIGAGUT, Jaume. Vertical redox profiles in treatment wetlands as function of hydraulic regime and macrophytes presence: Surveying the optimal scenario for microbial fuel cell implementation. **Science of The Total Environment**, v. 470, p. 754-758, 2014.

COTA, R. S. **Hidrodinâmica e desempenho de filtros verticais com alimentação em pulso, plantados e não plantados, empregados no tratamento de esgoto sanitário bruto.** 2011. 215F. Tese (Doutorado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos). Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte. MG. 2011.

CUI, Lihua et al. Removal of nutrients from wastewater with *Canna indica* L. under different vertical-flow constructed wetland conditions. **Ecological engineering**, v. 36, n. 8, p. 1083-1088, 2010.

DAIMS, H. et al. Nitrification in sequencing biofilm batch reactors: lessons from molecular approaches. **Water Science & Technology**, v. 43, n. 3, p. 9-18, 2001.

DAN, Truong Hoang et al. Treatment of high-strength wastewater in tropical constructed wetlands planted with *Sesbania sesban*: horizontal subsurface flow versus vertical downflow. **Ecological Engineering**, v. 37, n. 5, p. 711-720, 2011.

DEZOTTI, M; Sant'Anna Jr; Bassin, J.P. Processos biológicos avançados para tratamento de efluentes e técnicas de biologia molecular para o estudo da diversidade microbiana. **Editores Interciência**. Rio de Janeiro. 2011.

DIÁKOVÁ, Kateřina et al. The distribution of iron oxidation states in a constructed wetland as an indicator of its redox properties. **Chemistry & biodiversity**, v. 3, n. 12, p. 1288-1300, 2006.

DONG, Xiuli; REDDY, Gudigopuram B. Soil bacterial communities in constructed wetlands treated with swine wastewater using PCR-DGGE technique. **Bioresource technology**, v. 101, n. 4, p. 1175-1182, 2010.

DONG, Zeqin; SUN, Tieheng. A potential new process for improving nitrogen removal in constructed wetlands—promoting coexistence of partial-nitrification and ANAMMOX. **Ecological Engineering**, v. 31, n. 2, p. 69-78, 2007.

DUŠEK, Jiří; PICEK, Tomáš; ČÍŽKOVÁ, Hana. Redox potential dynamics in a horizontal subsurface flow constructed wetland for

wastewater treatment: Diel, seasonal and spatial fluctuations. **Ecological Engineering**, v. 34, n. 3, p. 223-232, 2008.

EME, Claire. Traitement des eaux usées domestiques par filtres plantés de macrophytes. 2012.

EPA. U.S. Environmental Protection Agency. **Nitrogen control manual**. EPA 625/R-93/010. 1993.

FAULWETTER, Jennifer L. et al. Microbial processes influencing performance of treatment wetlands: a review. **Ecological engineering**, v. 35, n. 6, p. 987-1004, 2009.

FERNANDES, Heloísa et al. Full-scale sequencing batch reactor (SBR) for domestic wastewater: performance and diversity of microbial communities. **Bioresource technology**, v. 132, p. 262-268, 2013a.

FERNANDES, Heloísa et al. Microbial and chemical profile of a ponds system for the treatment of landfill leachate. **Waste management**, v. 33, n. 10, p. 2123-2128, 2013b.

FONDER, N.; HEADLEY, T. The taxonomy of treatment wetlands: A proposed classification and nomenclature system. **Ecological Engineering**, v.51, p. 203-211, 2013.

GAGNON, Graham A.; SLAWSON, Robin M. An efficient biofilm removal method for bacterial cells exposed to drinking water. **Journal of Microbiological Methods**, v. 34, n. 3, p. 203-214, 1999.

GARCÍA, Joan et al. Spatial variations of temperature, redox potential, and contaminants in horizontal flow reed beds. **Ecological Engineering**, v. 21, n. 2, p. 129-142, 2003.

GARCIA, Juan C. et al. Draft genome sequence of *Nitrosospira* sp. strain APG3, a psychrotolerant ammonia-oxidizing bacterium isolated from sandy lake sediment. **Genome announcements**, v. 1, n. 6, p. e00930-13, 2013.

GE, Shijian et al. Detection of nitrifiers and evaluation of partial nitrification for wastewater treatment: A review. **Chemosphere**, 2015.

GOLLA, G., PETIT, K. ET HOCQUET, C. Bilan 2008 de l'assainissement en France. p. 27, **Office International de l'Eau / Ministre de l'Ecologie, de l'Energie, du développement Durable et de la Mer.** 2010.

GORRA, R. et al. Effects of substratum on the diversity and stability of ammonia-oxidizing communities in a constructed wetland used for wastewater treatment. **Journal of applied microbiology**, v. 103, n. 5, p. 1442-1452, 2007.

GROVE, J. A. et al. Assessment of changes in the microorganism community in a biofilter. **Biochemical Engineering Journal**, v. 18, n. 2, p. 111-114, 2004.

GUTKNECHT, Jessica LM; GOODMAN, Robert M.; BALSER, Teri C. Linking soil process and microbial ecology in freshwater wetland ecosystems. **Plant and Soil**, v. 289, n. 1-2, p. 17-34, 2006.

HEERS, Dipl-Ing FH Martin. **Constructed wetlands under different geographic conditions: Evaluation of the suitability and criteria for the choice of plants including productive species.** 2006. Tese de Doutorado. Hamburg University of Technology. 2006.

HOFFMANN, H. et al. Technology review of constructed wetlands Subsurface flow constructed wetlands for greywater and domestic wastewater treatment. **Deutsche Gesellschaft für, Internationale Zusammenarbeit (GIZ) GmbH, Sustainable sanitation-ecosan program, Postfach**, v. 5180, p. 65726, 2011.

HU, Y.; ZHAO, X.; ZHAO, Y. Achieving high-rate autotrophic nitrogen removal via Canon process in a modified single bed tidal flow constructed wetland. **Chemical Engineering Journal**, v.237, p.329-335, 2014.

HUNTER-CEVERA, Jennie C. The value of microbial diversity. **Current opinion in microbiology**, v. 1, n. 3, p. 278-285, 1998.

HUNTING, E. R.; VAN DER GEEST, H. G. Predictability of bacterial activity and denitrification in aquatic sediments with continuous

measurements of redox potential. **International Journal of Environmental Science & Technology**, v. 8, n. 3, p. 553-560, 2011.

HUYBENS, Nathalie; MAINIL, Jacques; MARLIER, Didier. Les techniques de biologie moléculaire d'analyse des populations bactériennes complexes. In: **Annales de Médecine Vétérinaire**. Université de Liège, 2009.

IASUR-KRUH, Lilach et al. Microbial population and activity in wetland microcosms constructed for improving treated municipal wastewater. **Microbial ecology**, v. 59, n. 4, p. 700-709, 2010.

IBEKWE, A. Mark et al. Impact of plant density and microbial composition on water quality from a free water surface constructed wetland. **Journal of applied microbiology**, v. 102, n. 4, p. 921-936, 2007.

IBEKWE, A. Mark; GRIEVE, Catherine M.; LYON, Stephen R. Characterization of microbial communities and composition in constructed dairy wetland wastewater effluent. **Applied and environmental microbiology**, v. 69, n. 9, p. 5060-5069, 2003.

IWA SPECIALIST GROUP ON USE OF MACROPHYTES IN WATER POLLUTION CONTROL. **Constructed wetlands for pollution control: processes, performance, design and operation**. Iwa Publishing, 2000.

JAMPEETONG, Arunothai; BRIX, Hans; KANTAWANICHKUL, Suwasa. Effects of inorganic nitrogen forms on growth, morphology, nitrogen uptake capacity and nutrient allocation of four tropical aquatic macrophytes (*Salvinia cucullata*, *Ipomoea aquatica*, *Cyperus involucratus* and *Vetiveria zizanioides*). **Aquatic botany**, v. 97, n. 1, p. 10-16, 2012.

JAMPEETONG, Arunothai; BRIX, Hans; KANTAWANICHKUL, Suwasa. Effects of inorganic nitrogen forms on growth, morphology, nitrogen uptake capacity and nutrient allocation of four tropical aquatic macrophytes (*Salvinia cucullata*, *Ipomoea aquatica*, *Cyperus involucratus* and *Vetiveria zizanioides*). **Aquatic botany**, v. 97, n. 1, p. 10-16, 2012.

JETTEN, Mike SM et al. Improved nitrogen removal by application of new nitrogen-cycle bacteria. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 1, n. 1, p. 51-63, 2002.

JUNIER, Pilar et al. Phylogenetic and functional marker genes to study ammonia-oxidizing microorganisms (AOM) in the environment. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 85, n. 3, p. 425-440, 2010.

JUZAN, Lauriane; PERNELLE, Jean-Jacques; DABERT, Patrick. Les outils de la biologie moléculaire pour l'analyse microbiologique des boues activées. **Sciences Eaux et Territoires**, n. 9, p. p. 76-p. 81, 2012.

KADLEC, R. H., KNIGHT, R.L. Treatment Wetlands. **Boca Raton, Florida: Lewis Publishers**. 893p. 1996.

KADLEC, R.H.; WALLACE, S.D. Treatment Wetlands, **2nd ed. CRC Press, Boca Raton, FL**. 1016p. 2009.

KANTAWANICHKUL, Suwasa; KLADPRASERT, Supreeya; BRIX, Hans. Treatment of high-strength wastewater in tropical vertical flow constructed wetlands planted with *Typha angustifolia* and *Cyperus involucratus*. **Ecological engineering**, v. 35, n. 2, p. 238-247, 2009.

KIM, B.; GAUTIER, M.; PROST-BOUCLE, S.; MOLLE, P.; MICHEL, P.; GOURDON, R. Performance evaluation of partially saturated vertical flow constructed wetland with trickling filter and chemical precipitation for domestic and winery wastewaters treatment. **Ecological Engineering**, v. 71, p. 41-47, 2014.

KIM, Boram. **Devenir du phosphore dans les filtres plantés de roseaux: Etude de sa rétention/libération et des facteurs d'influence**. 2014. Tese de Doutorado. 190f. INSA. Lyon. 2014.

KNOWLES, Paul et al. Clogging in subsurface-flow treatment wetlands: occurrence and contributing factors. **Ecological Engineering**, v. 37, n. 2, p. 99-112, 2011.

KOOPS, Hans-Peter; POMMERENING-RÖSER, Andreas. Distribution and ecophysiology of the nitrifying bacteria emphasizing cultured species. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 37, n. 1, p. 1-9, 2001.

KOWALCHUK, George A. et al. Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the beta subdivision of the class Proteobacteria in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 4, p. 1489-1497, 1997.

KREUZINGER, Norbert et al. Molecular biological methods (DGGE) as a tool to investigate nitrification inhibition in wastewater treatment. **Water Science & Technology**, v. 47, n. 11, p. 165-172, 2003.

LAANBROEK, H. J. Bacterial cycling of minerals that affect plant growth in waterlogged soils: a review. **Aquatic Botany**, v. 38, n. 1, p. 109-125. 1990.

LANA, L. C. O. et al. Performance of a single stage vertical flow constructed wetland system treating raw domestic sewage in Brazil. **Water Science & Technology**, v. 68, n. 7, p. 1599-1606, 2013.

LANGERGRABER, G.; ŠIMŮNEK, J. The multi-component reactive transport module CW2D for constructed wetlands for the HYDRUS software package. **Hydrus Software Ser**, v. 2, 2006.

LIÉNARD, A. Domestic wastewater treatment in tanks with emergent hydrophytes: latest results of a recent plant in France. **Water science and technology**, v. 19, n. 12, p. 373-375, 1987.

LIÉNARD, Alain; BOUTIN, Catherine; DUCHÈNE, P. H. **Filières d'épuration adaptées aux petites collectivités**. Cemagref, 1998.

LU, Huijie; CHANDRAN, Kartik; STENSEL, David. Microbial ecology of denitrification in biological wastewater treatment. **Water research**, v. 64, p. 237-254, 2014.

LÜCKER, Sebastian et al. A Nitrospira metagenome illuminates the physiology and evolution of globally important nitrite-oxidizing

bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 30, p. 13479-13484, 2010.

MALTAIS-LANDRY, Gabriel et al. Nitrogen transformations and retention in planted and artificially aerated constructed wetlands. **Water Research**, v. 43, n. 2, p. 535-545, 2009.

MANJATE, E. S. et al. First stage of the French vertical flow constructed wetland system: experiments with the reduction of surface area and number of units. **Journal of Water, Sanitation and Hygiene for Development**, v. 5, n. 1, p. 50-55, 2015.

MELO, Adriano Sanches; HEPP, Luiz Ubiratan. Ferramentas estatísticas para análises de dados provenientes de biomonitoramento. **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, n. 3, p. 8, 2008.

MELO, Adriano Sanches; HEPP, Luiz Ubiratan. Ferramentas estatísticas para análises de dados provenientes de biomonitoramento. **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, n. 3, p. 8, 2008.

METCALF, Eddy; EDDY, H. P.; TCHOBANOGLIOUS, Georg. Wastewater engineering: treatment, disposal, and reuse. **Water Resources and Environmental Engineering**, 1991.

METCALF, Eddy; EDDY, H. P. Wastewater engineering: treatment, and reuse. **4.ed. New York: McGraw-Hill**, 1819p. 2003.

MILLER, D. N. et al. Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. **Applied and environmental microbiology**, v. 65, n. 11, p. 4715-4724, 1999.

MOLLE, P. et al. Effect of reeds and feeding operations on hydraulic behaviour of vertical flow constructed wetlands under hydraulic overloads. **Water Research**, v. 40, n. 3, p. 606-612, 2006.

MOLLE, P. et al. French vertical-flow constructed wetland design: adaptations for tropical climates. 2015.

MOLLE, P. et al. How to treat raw sewage with constructed wetlands: an overview of the French systems. **Water Science & Technology**, v. 51, n. 9, p. 11-21, 2005.

MOLLE, P. et al. Phosphorus removal by the use of apatite in constructed wetlands: Design recommendations. **Water Practice & Technology**, v. 6, n. 3, 2011.

MOLLE, Pascal. French vertical flow constructed wetlands: a need of a better understanding of the role of the deposit layer. 2014.

MOLLE, Pascal. **Filtres plantés de roseaux: limites hydrauliques et rétention du phosphore**. 2003. Tese de Doutorado. Montpellier 2, Université des Sciences et Techniques du Languedoc. 2003.

MOLLE, Pascal; PROST-BOUCLE, Stéphanie; LIENARD, Alain. Potential for total nitrogen removal by combining vertical flow and horizontal flow constructed wetlands: a full-scale experiment study. **Ecological Engineering**, v. 34, n. 1, p. 23-29, 2008.

MORVANNOU, A. et al. Treatment performances of French constructed wetlands: results from a database collected over the last 30 years. **Water Science & Technology**, v. 71, n. 9, p. 1333-1339, 2015.

MORVANNOU, Ania et al. Characterizing hydraulic properties of filter material of a vertical flow constructed wetland. **Ecological Engineering**, v. 60, p. 325-335, 2013.

MORVANNOU, Ania et al. Modeling nitrogen removal in a vertical flow constructed wetland treating directly domestic wastewater. **Ecological Engineering**, v. 70, p. 379-386, 2014.

MUSTAFA, Atif; SCHOLZ, Miklas. Characterization of microbial communities transforming and removing nitrogen in wetlands. **Wetlands**, v. 31, n. 3, p. 583-592, 2011.

MUYZER, Gerard; DE WAAL, Ellen C.; UITTERLINDEN, Andre G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and environmental microbiology**, v. 59, n. 3, p. 695-700, 1993.

NIELSEN, S. Sludge drying reed beds. **Water Science & Technology**, v. 48, n. 5, p. 101-109, 2003.

OLIJNYK, Débora Parcias et al. Avaliação da nitrificação e desnitrificação de esgoto doméstico empregando filtros plantados com macrófitas (wetlands) de fluxos vertical e horizontal: sistemas híbridos. 2008.

OLIVEIRA, Silvia C.; VON SPERLING, Marcos. Performance evaluation of different wastewater treatment technologies operating in a developing country. **Journal of Water, Sanitation and Hygiene for Development**, v. 1, n. 1, p. 37-56, 2011.

OMS – Organização Mundial da Saúde. 2012, Progress in drinking water and sanitation, Update, p. 66. 2012

PEDESCOLL, Anna et al. Contaminant removal efficiency depending on primary treatment and operational strategy in horizontal subsurface flow treatment wetlands. **Ecological Engineering**, v. 37, n. 2, p. 372-380, 2011.

PELISSARI, Catiane et al. Nitrogen transformation in horizontal and vertical flow constructed wetlands applied for dairy cattle wastewater treatment in southern Brazil. **Ecological Engineering**, v. 73, p. 307-310, 2014.

PELISSARI, Catiane et al. Wetlands construídos de fluxo vertical empregado no tratamento de efluente de bovinocultura leiteira. **Revista Eletrônica de Gestão e Tecnologias Ambientais**, v. 1, n. 2, p. 223-233, 2013.

PENG, Jianfeng et al. Performance of a novel Circular-Flow Corridor wetland toward the treatment of simulated high-strength swine wastewater. **Ecological Engineering**, v. 49, p. 1-9, 2012.

PHILIPPI, L. S. Sistemas descentralizados de tratamento de esgotos. **Florianópolis: Pandion**, 2007.

PHILIPPI, Luiz S.; DA COSTA, Rejane HR; SEZERINO, Pablo H. Domestic effluent treatment through integrated system of septic tank

and root zone. **Water science and technology**, v. 40, n. 3, p. 125-131, 1999.

PHILIPPI, Luiz Sergio; SEZERINO, Pablo Heleno. **Aplicação de sistemas tipo wetlands no tratamento de águas residuárias: utilização de filtros plantados com macrófitas**. 2004.

PHOLCHAN, Mujalin K. et al. Systematic study of the effect of operating variables on reactor performance and microbial diversity in laboratory-scale activated sludge reactors. **Water research**, v. 44, n. 5, p. 1341-1352, 2010.

PLATZER, C. Design recommendation for subsurface flow constructed wetlands for nitrification and denitrification. **Wat. Sci. Tech.** v. 40, n. 3, pp. 257-263. 1999.

PROST-BOUCLE, S.; MOLLE, P. Recirculation on a single stage of vertical flow constructed wetland: Treatment limits and operation modes. **Ecological Engineering**, v. 43, p. 81-84, 2012.

PURKHOLD, Ulrike et al. Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and amoA sequence analysis: implications for molecular diversity surveys. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 12, p. 5368-5382, 2000.

ROUSSO, B. Z; PELISSARI, C; SEZERINO, P. H. desempenho de um wetland construído horizontal empregado no tratamento de esgoto doméstico ao longo de 20 anos de operação. **2º Simpósio Brasileiro sobre Wetlands construídos**. Curitiba/PR. 2015.

ROWAN, Arlene K. et al. Composition and diversity of ammonia-oxidising bacterial communities in wastewater treatment reactors of different design treating identical wastewater. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 43, n. 2, p. 195-206, 2003.

RUIZ-RUEDA, Olaya; HALLIN, Sara; BAÑERAS, Lluís. Structure and function of denitrifying and nitrifying bacterial communities in relation to the plant species in a constructed wetland. **FEMS microbiology ecology**, v. 67, n. 2, p. 308-319, 2009.

SAEED, Tanveer; SUN, Guangzhi. A review on nitrogen and organics removal mechanisms in subsurface flow constructed wetlands: Dependency on environmental parameters, operating conditions and supporting media. **Journal of environmental management**, v. 112, p. 429-448, 2012

SAHRAWAT, K. L. Terminal electron acceptors for controlling methane emissions from submerged rice soils. **Communications in soil science and plant analysis**, v. 35, n. 9-10, p. 1401-1413, 2004.

SAMSÓ, Roger; GARCÍA, Joan. Bacteria distribution and dynamics in constructed wetlands based on modelling results. **Science of the Total Environment**, v. 461, p. 430-440, 2013.

SCHMIDELL et al. Tratamento Biológico de águas residuárias. Comissão editorial Willibaldo Schimidell et al., Florianópolis. **Gráfica PaperPrint**. 702p. 2007.

SCHMIDT, Ingo et al. New concepts of microbial treatment processes for the nitrogen removal in wastewater. **FEMS microbiology reviews**, v. 27, n. 4, p. 481-492, 2003.

SCHOLZ, Miklas. **Wetland systems: storm water management control**. Springer Science & Business Media, 2010.

SEZERINO, P. H. et al. Constructed wetlands and sand filter applied as onsite post-treatment of anaerobic effluent. **Water Practice & Technology**, v. 7, n. 3, 2012a.

SEZERINO, P. H.; TREIN, C. M.; PELISSARI, C.; BENTO, A. P.; PHILIPPI, L. S. Wetlands construídos empregados no tratamento descentralizado de esgotos. **In: XVIII Exposição de Experiências Municipais em Saneamento**. Uberlândia/MG. 2014.

SEZERINO, P.H. **Potencialidade dos filtros plantados com macrófitas (constructed wetlands) no pós- tratamento de lagoas de estabilização sob condições de clima subtropical**. 2006. 171f .Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental) - Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. 2006.

SEZERINO, Pablo Heleno et al. Two different layouts of constructed wetlands applied as decentralized wastewater treatment in southern Brazil. In: **13th International Conference Wetlands Systems for Water Pollution Control**. Perth. Austrália. IWA, 2012b.

SILVEIRA, D. D. et al. Influence of partial saturation on total nitrogen removal in a single-stage French constructed wetland treating raw domestic wastewater. **Ecological Engineering**, v. 77, p. 257-264, 2015.

SORIANO, G. Aguilera; RAVENEAU-CHAMPION, B.; DAUTHUILLE, P. The RhizopurR process ten years on: a green solution for sewage treatment in small communities. **Water Science & Technology**, v. 63, n. 8, p. 1614-1620, 2011.

STEFANAKIS, Alexandros I.; TSIHRINTZIS, Vassilios A. Effects of loading, resting period, temperature, porous media, vegetation and aeration on performance of pilot-scale vertical flow constructed wetlands. **Chemical engineering journal**, v. 181, p. 416-430, 2012.

SUNDBERG, Carina et al. Overland flow systems for treatment of landfill leachates—potential nitrification and structure of the ammonia-oxidising bacterial community during a growing season. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 39, n. 1, p. 127-138, 2007.

TANNER, Chris C. et al. Nitrogen processing gradients in subsurface-flow treatment wetlands—influence of wastewater characteristics. **Ecological Engineering**, v. 18, n. 4, p. 499-520, 2002.

TIETZ, Alexandra et al. Bacterial carbon utilization in vertical subsurface flow constructed wetlands. **Water research**, v. 42, n. 6, p. 1622-1634, 2008.

TIETZ, Alexandra et al. Characterisation of microbial biocoenosis in vertical subsurface flow constructed wetlands. **Science of the Total Environment**, v. 380, n. 1, p. 163-172, 2007.

TIETZ, Alexandra et al. Diversity of ammonia oxidising bacteria in a vertical flow constructed wetland. **Water Science & Technology**, v. 56, n. 3, p. 241-247, 2007.

TROESCH, S. et al. Reducing the footprint of vertical flow constructed wetlands for raw sewage treatment: the Bi-filtre® solution. In: **Proceedings of the 12th International IWA Conference on Wetland Systems for Water Pollution Control**. 2010. p. 1004-1010.

TROESCH, Stephane et al. Treatment of septage in sludge drying reed beds: a case study on pilot-scale beds. **Water Science and Technology**, v. 60, n. 3, p. 643-653, 2009.

TRUU, Jaak et al. Variation of microbiological parameters within planted soil filter for domestic wastewater treatment. **Journal of Environmental Science and Health**, v. 40, n. 6-7, p. 1191-1200, 2005.

TRUU, Marika; JUHANSON, Jaanis; TRUU, Jaak. Microbial biomass, activity and community composition in constructed wetlands. **Science of the total Environment**, v. 407, n. 13, p. 3958-3971, 2009.

UN-HABITAT. **Constructed Wetlands Manual**. UN-HABITAT Water for Asian Cities Programme Nepal, Kathmandu. 2008.

URAKAWA, Hidetoshi et al. *Nitrosospira lacus* sp. nov., a psychrotolerant, ammonia-oxidizing bacterium from sandy lake sediment. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 65, n. Pt 1, p. 242-250, 2015.

VENEMAN, P. L. M.; PICKERING, E. W. Salt bridge for field redox potential measurements. **Communications in Soil Science & Plant Analysis**, v. 14, n. 8, p. 669-677, 1983.

VINCENT, J. et al. Sludge drying reed beds for septage treatment: Towards design and operation recommendations. **Bioresource technology**, v. 102, n. 17, p. 8327-8330, 2011.

VON SPERLING, Marcos. Comparison of simple, small, full-scale sewage treatment systems in Brazil: UASB–maturation ponds–coarse filter; UASB–horizontal subsurface-flow wetland; vertical-flow wetland (first stage of French system). **Water Science & Technology**, v. 71, n. 3, p. 329-337, 2015.

VON SPERLING, Marcos. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**. Editora UFMG, 1996.

VYMAZAL, J. KRÖPFELOVÁ, L. **Wastewater treatment in constructed wetlands with horizontal sub-surface flow**. Springer Science & Business Media, 2008.

VYMAZAL, J. Removal of nitrogen via harvesting of emergent vegetation in constructed wetlands for wastewater treatment. **Natural and constructed wetlands: nutrients, metals and management**. Backhuys, Leiden, p. 209-221, 2005.

VYMAZAL, Jan. Constructed wetlands for wastewater treatment: five decades of experience†. **Environmental science & technology**, v. 45, n. 1, p. 61-69, 2010.

VYMAZAL, Jan. Plants used in constructed wetlands with horizontal subsurface flow: a review. **Hydrobiologia**, v. 674, n. 1, p. 133-156, 2011.

VYMAZAL, Jan. Removal of nutrients in various types of constructed wetlands. **Science of the total environment**, v. 380, n. 1, p. 48-65, 2007.

VYMAZAL, Jan. The use of hybrid constructed wetlands for wastewater treatment with special attention to nitrogen removal: a review of a recent development. **Water research**, v. 47, n. 14, p. 4795-4811, 2013.

VYMAZAL, Jan; KRÖPFELOVÁ, Lenka. A three-stage experimental constructed wetland for treatment of domestic sewage: first 2 years of operation. **Ecological Engineering**, v. 37, n. 1, p. 90-98, 2011.

WANG, Qian et al. Microbial abundance and community in subsurface flow constructed wetland microcosms: role of plant presence. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1-10, 2015.

WEBER e GAGNON (2013). **UFZ Wetland Workshop Microbiology Session June 12-14, 2013**. Simpósio da UFZ - Alemanha 2013.

WEBER, Kela P. et al. Effect of ciprofloxacin on microbiological development in wetland mesocosms. **Water research**, v. 45, n. 10, p. 3185-3196, 2011.

WEBER, Kela P.; LEGGE, Raymond L. Method for the detachment of culturable bacteria from wetland gravel. **Journal of microbiological methods**, v. 80, n. 3, p. 242-250, 2010.

WEERAKOON, G. M. P. R. et al. Impact of the hydraulic loading rate on pollutants removal in tropical horizontal subsurface flow constructed wetlands. **Ecological Engineering**, v. 61, p. 154-160, 2013.

WIESSNER, A. et al. Sulphate reduction and the removal of carbon and ammonia in a laboratory-scale constructed wetland. **Water Research**, v. 39, n. 19, p. 4643-4650, 2005.

WILLIAMS, Louis G. RELATIVE STRONTIUM AND CALCIUM UPTAKE BY GREEN ALGAE. **Science (New York, NY)**, v. 146, n. 3650, p. 1488, 1964.

WOESE, Carl R.; KANDLER, Otto; WHEELIS, Mark L. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 87, n. 12, p. 4576-4579, 1990.

WU, Shubiao et al. Development of constructed wetlands in performance intensifications for wastewater treatment: a nitrogen and organic matter targeted review. **Water research**, v. 57, p. 40-55, 2014.

ZHANG, D. et al. Application of constructed wetlands for wastewater treatment in developing countries e A review of recent developments (2000 - 2013): Review. **Journal of Environmental Management**. 141. 116 - 131(2014)

ZHAO, Yong Jun et al. Performance of pilot-scale vertical-flow constructed wetlands in responding to variation in influent C/N ratios of simulated urban sewage. **Bioresource technology**, v. 101, n. 6, p. 1693-1700, 2010.

ZHI, Wei; JI, Guodong. Constructed wetlands, 1991–2011: A review of research development, current trends, and future directions. **Science of the Total Environment**, v. 441, p. 19-27, 2012.

APÊNDICES

APÊNDICE A

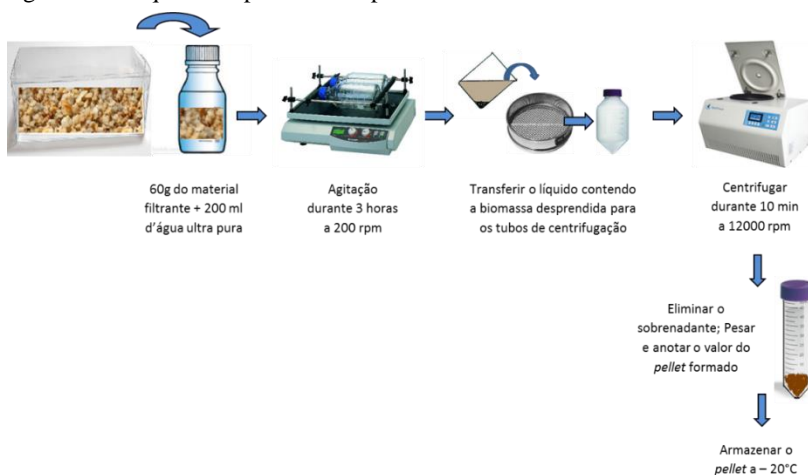
❖ Métodos de preparação para as amostras: obtenção do biofilme para análise

Para a realização do protocolo, seguiram-se os seguintes passos:

- Selecionar uma quantidade de material filtrante suficiente para formar um *pellet* de aproximadamente 1 g no final da etapa de retirada da biomassa. Para a extração do DNA de uma amostra, são necessários o mínimo de 0,25 g de *pellet* conforme protocolo de extração do DNA;
- Colocar o material filtrante em frascos específicos (preferencialmente de forma circular) para a agitação.;
- Adicionar água ultrapura auto clavada. e.x.: para 60 g de material adicionar 200 ml de água;
- Colocar os frascos sob agitação numa plataforma de agitação durante 3 horas, a 200 rpm;
- Em seguida, transferir o líquido para tubos específicos de centrifugação. Note: a transferência se dá pela filtração do líquido com o auxílio de uma peneira de 2 mm, a fim de eliminar as partículas maiores;
- Centrifugar durante 10 minutos a 12000 rpm;
- Eliminar o sobrenadante;
- Pesas e anotar o valor do *pellet* formado;
- Conservar o *pellet* entre uma temperatura de -80 a -20°C até o momento de sua utilização.

Tal protocolo está representado na Figura 75.

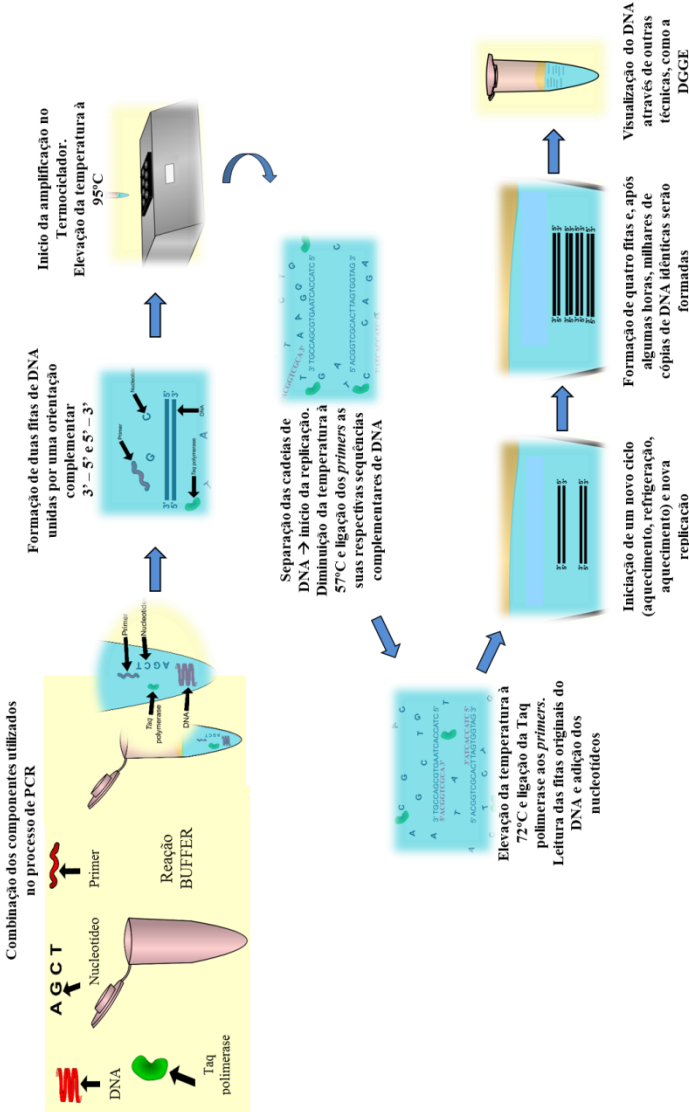
Figura 75 - Esquema explicativo do protocolo de retirada do biofilme



APÊNDICE B

A Figura 76 representa um esquema que resume os passos da reação ocorrida pela técnica da PCR.

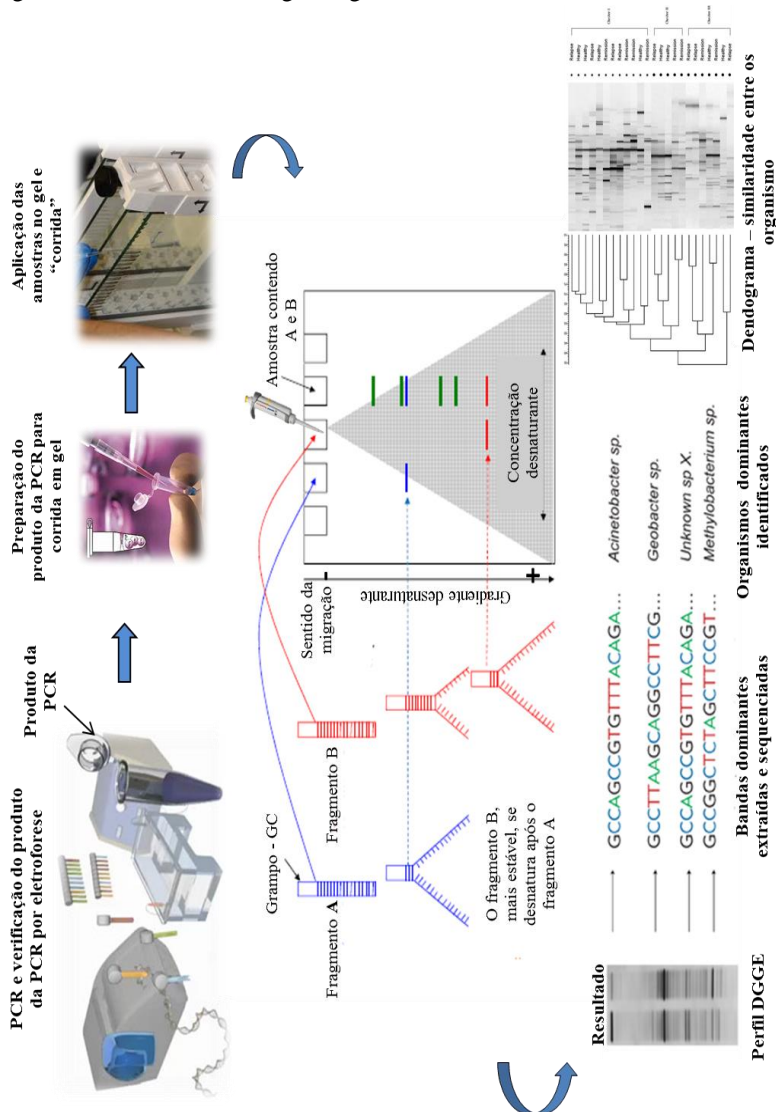
Figura 76 – Reação em cadeia de polimerase - PCR



APÊNDICE C

A Figura 77 representa as etapas do procedimento da Eletroforese em gel de gradiente desnaturante – DGGE.

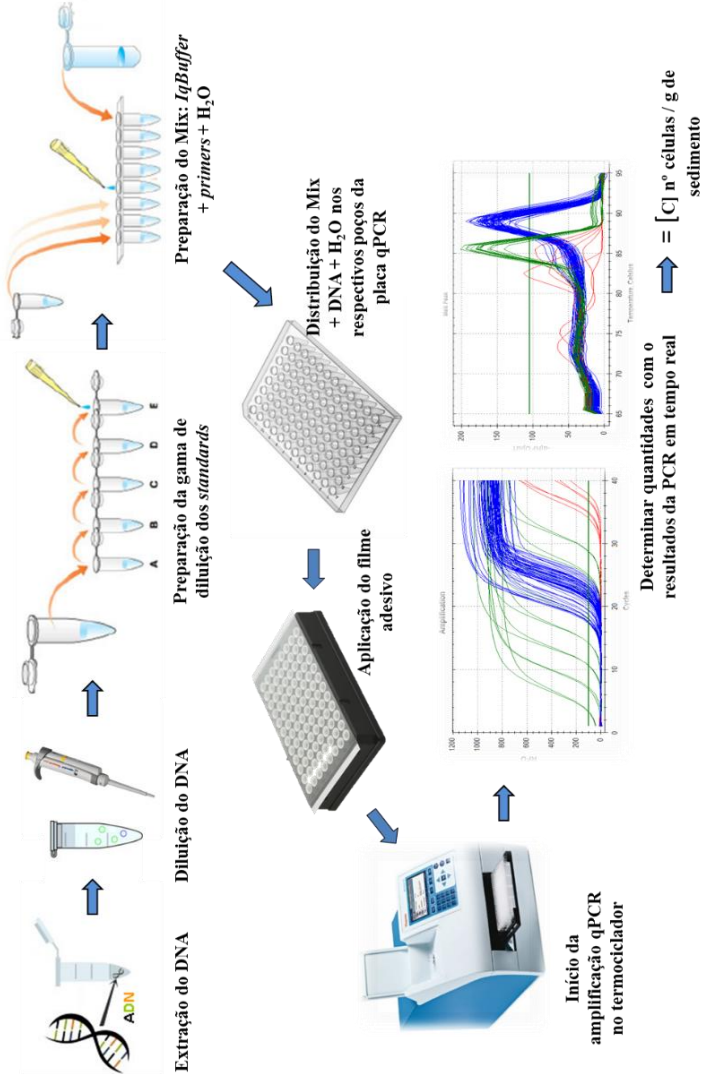
Figura 77 – Eletroforese em gel de gradiente desnaturante - DGGE



APÊNDICE D

A Figura 78 representa as etapas do procedimento da PCR em tempo real.

Figura 78 – PCR em tempo real - qPCR



APÊNDICE E

A Figura 79 representa o fluxograma das técnicas e etapas realizadas nas análises de biologia molecular desta tese.

Figura 79 – Fluxograma das análises moleculares

