

## II-057 – CARACTERIZAÇÃO BACTERIANA NITRIFICANTE E DESNITRIFICANTE EM COLUNAS DE AREIA DE FLUXO VERTICAL EMPREGADAS NO TRATAMENTO DE ESGOTO SANITÁRIO

**Catiane Pelissari<sup>(1)</sup>**

Biotecnóloga Industrial pela Universidade do Oeste de Santa Catarina (UNOESC). Mestre em Engenharia Civil e Ambiental pela Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Doutoranda em Engenharia Ambiental na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

**Mayara Oliveira dos Santos**

Engenheira Ambiental pela Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC). Mestranda em Engenharia Ambiental na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

**Luiz Sérgio Philippi**

Doutor em Hidrologia e Saúde Pública pela Université de Montpellier I. Professor Voluntário do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

**Pablo Heleno Sezerino**

Doutor em Engenharia Ambiental pela Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Professor Adjunto do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da UFSC.

**Endereço<sup>(1)</sup>:** Universidade Federal de Santa Catarina – Campus Universitário – Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental – Grupo de Estudos em Saneamento Descentralizado – Trindade – Florianópolis/SC, CEP 88040-900 – e-mail: catianebti@gmail.com

### RESUMO

O entendimento da estrutura da comunidade bacteriana nitrificante e desnitrificante é fundamental para maximizar a remoção de nitrogênio em processos biológicos de tratamentos de efluentes. Diante disso, o objetivo desse estudo foi caracterizar a comunidade bacteriana nitrificante e desnitrificante em colunas de areia de fluxo vertical, empregadas no tratamento de esgoto sanitário ao longo de 150 dias de operação, simulando as características operacionais de *wetlands* construídos verticais de fluxo descendente. O experimento foi conduzido em 10 colunas de areia, sendo que cada coluna possuía uma área superficial de 0,0176 m<sup>2</sup> e areia ( $d_{10} = 0,3$  mm e  $U = 6,2$ ) como material filtrante. As colunas de areia foram operadas com um carregamento constante de 41 g DQO m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>, sendo que a cada 15 dias uma coluna de areia foi inativada e coletado amostras do maciço filtrante em três profundidades diferentes (0 a 0,05 m; 0,05 a 0,15 m; 0,15 a 0,30 m) ao longo do perfil vertical de cada coluna. Por meio do emprego da técnica FISH, realizou-se a identificação da comunidade bacteriana nitrificante e desnitrificante nas amostras coletadas, bem como, foi realizado a caracterização físico – química do esgoto afluente e efluente das colunas de areia. Com base nos resultados obtidos, identificou-se que a taxa hidráulica operada de 113 mm d<sup>-1</sup> favoreceu a nitrificação devido a maior colonização de bactérias nitratantes, e o aumento da taxa hidráulica para 148 mm d<sup>-1</sup>, resultou na queda da nitrificação e no aumento da remoção de matéria orgânica carbonácea. A comunidade bacteriana nitrificante e desnitrificante foi identificada após 30 dias de operação das colunas de areia, sendo que a atividade desse grupo bacteriano foi sempre mais elevada na superfície das colunas. Após 45 dias de operação das colunas de areia verificou-se a estratificação desse grupo ao longo do perfil vertical das colunas, sendo que ao término dos 150 dias de operação a comunidade bacteriana nitrificante e desnitrificante colonizaram até o fundo das colunas de areia.

**PALAVRAS-CHAVE:** Esgoto Sanitário, Nitrogênio, *Wetlands* Construídos Verticais, Comunidade Bacteriana.

### INTRODUÇÃO

O excesso de nitrogênio no meio ambiente vem sendo um sério problema por muitas décadas. A remoção deste elemento em águas residuárias está associada principalmente com processos biológicos de tratamento. Dessa forma, a comunidade bacteriana desempenha um papel fundamental no ciclo biogeoquímico do nitrogênio no tratamento de efluentes.

Diferentes vias mediadas por micro-organismos, tais como a nitrificação, desnitrificação, nitrificação parcial, SHARON (*Single reactor High activity Ammonia Removal Over Nitrite*), ANAMMOX (*Anaerobic Ammonium Oxidation*), CANON (*Completely Autotrophic Nitrogen Removal over Nitrite*), OLAND (*Oxygen Limited Autotrophic Nitrification Denitrification*), nitrificação heterotrófica acoplada a desnitrificação aeróbia têm sido associadas com a remoção e transformação biológica de compostos nitrogenados no tratamento de águas residuárias.

Sendo assim, é primordial compreender as relações entre os parâmetros ambientais e operacionais das unidades de tratamento, bem como, a composição e a diversidade das comunidades bacterianas atuantes nas transformações e remoção do nitrogênio. Esse conhecimento pode melhorar a concepção e gestão das tecnologias empregadas e, assim, aumentar o desempenho desses sistemas, quanto à remoção de nitrogênio.

Dentre as tecnologias que vêm sendo amplamente empregadas em nível de tratamento primário, secundário e, também, terciário de efluentes, destacam-se os *wetlands* construídos verticais descendentes (WCVD). Essa ecotecnologia é empregada para o tratamento de diferentes tipos de poluentes, tais como matéria orgânica, sólidos, fósforo, nitrogênio, metais pesados, disruptores endócrinos e organismos patogênicos.

Os avanços reportados pela comunidade acadêmica, tanto em escala piloto quanto em escala real, demonstram que os WCVD com alimentação intermitente, e com períodos de repouso, são capazes de remover e transformar simultaneamente altas concentrações de matéria orgânica e nitrogênio amoniacal (COOPER *et al.*, 1996; PLATZER e MAUCH, 1997). Platzer *et al.* (2007) e Hoffmann e Platzer (2011), recomendam para clima quente um elevado carregamento de DQO, variando de 60 a 70 g m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>, alcançando nessas condições eficiências de 79 % de remoção de DQO afluente, 90 % de remoção de nitrogênio amoniacal afluente, com 95 % de nitrificação. Também, Sezerino (2006) recomenda sob condições climáticas subtropicais, carregamentos de 41 g DQO m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> e 10,2 g N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>, obtendo desempenho de 72 % de remoção de DQO afluente e 72 % de transformação de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, com 73 % de nitrificação.

Dado que os WCVD apresentam desempenhos satisfatórios na remoção de carbono e nitrificação, o objetivo deste trabalho foi caracterizar a comunidade bacteriana nitrificante e desnitrificante em colunas de areia de fluxo vertical, empregadas no tratamento de esgoto sanitário ao longo de 150 dias de operação, simulando as características operacionais do perfil vertical do maciço filtrante de um *wetland* construído vertical descendente.

## MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo em colunas de areia de fluxo vertical foi conduzido de forma que transcrevesse a operação e os processos de tratamento que se reproduzem nos WCVD. Dessa forma, em escala laboratorial de bancada, utilizou-se 10 colunas de PVC, área superficial de 0,0176 m<sup>2</sup> e profundidade útil de 0,3 m. Cada coluna foi preenchida com areia como material filtrante com diâmetro efetivo (d<sub>10</sub>) de 0,3 mm e coeficiente de uniformidade (U) de 6,2 (Figura 1).

As colunas de areia foram submetidas às mesmas condições de alimentação, com um carregamento constante de DQO em 41 g m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>, conforme recomendações de Sezerino (2006), e com variação na taxa hidráulica. Dessa forma, todas as colunas foram alimentadas manualmente com esgoto sanitário, três dias na semana (terças, quartas e quintas-feiras). Nestes dias as mesmas foram alimentadas em três períodos distintos (9:00, 13:00 e 17:00 horas).

A caracterização físico-química afluente e efluente das colunas foi realizada semanalmente. Os parâmetros avaliados foram Potencial Hidrogênico (pH), alcalinidade, Sólidos Suspensos (SS), Demanda Química de Oxigênio (DQO), Nitrogênio Amoniacal (N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), Nitrogênio Nitrito (N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) e Nitrogênio Nitrato (N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), seguindo recomendações de APHA (2005), com exceção do nitrogênio amoniacal que foi realizado seguindo a metodologia de Vogel (1981).



Figura 1: Colunas de areia de fluxo vertical. a) ilustração do perfil vertical das colunas; b) foto do experimento.

### IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA NITRIFICANTE E DESNITRIFICANTE NO MACIÇO FILTRANTE

A fim de avaliar o desenvolvimento da comunidade bacteriana nitrificante e desnitrificante ao longo de 150 dias de operação, as 10 colunas de areia foram submetidas às mesmas condições de alimentação e operação, entretanto, em intervalos de 15 dias uma coluna foi inativada, e posteriormente coletadas amostras do maciço filtrante, até o tempo total de 150 dias de operação. Dessa forma cada coluna foi nomeada com o tempo de operação total (15 dias, 30 dias, 45 dias, 60 dias, 75 dias, 90 dias, 105 dias, 120 dias, 135 dias e 150 dias).

A comunidade bacteriana envolvida nas transformações do nitrogênio foi, portanto, avaliada a cada 15 dias, ao longo do perfil vertical do maciço filtrante, em três profundidades diferentes, sendo: (i) de 0 a 0,05 m; (ii) de 0,05 a 0,15 m; e (iii) de 0,15 a 0,30 m. Posteriormente à coleta de 20 g do maciço filtrante correspondente às diferentes profundidades ao longo do perfil vertical, foi aplicada a técnica de Hibridização Fluorescente *in situ* – (FISH), seguindo o protocolo de Amman (1995).

As sondas oligonucleotídicas utilizadas para a caracterização da comunidade bacteriana nitrificante e desnitrificante nas colunas de areia estão descritas na Tabela 1, juntamente com os organismos alvos.

Tabela 1: Descrição das sondas oligonucleotídicas.

Sondas	Alvo	Sequência (5'-3')	Referência
<b>EUBmix (I+II+III)</b>	Domínio <i>Bactéria</i>	I- ctgcctccctagca II- cag ccaccctaggtgtctg III- ccaccctaggtgt	I -Amann <i>et al.</i> , (1999) II e III -Daims <i>et al.</i> , (1999)
<b>THIO</b>	Algumas <i>Thiobacillus</i>	gtcatgaaaccccgctggt	Figuerola e Erijman, (2007)
<b>PAE 997</b>	<i>Pseudomonas</i> spp.	tctggaaagttcgatca	Amann <i>et al.</i> , (1996)
<b>Ntspa662</b>	Maioria dos membros Nitrospirae	cgccttcgccaccggccttc	Daims <i>et al.</i> , (2001)
<b>Ntspn693</b>	<i>Nitrospina gracilis</i>	ttccaatatcaacgcattt	Juretschko (2000)
<b>NSO 190</b>	β- oxidantes de amônio Proteobacteria, incluindo <i>Nitrosomonas</i>	cgatccctgcttttctcc	Mobarry <i>et al.</i> , (1996)
<b>NEU 653</b> <b>*Competidor</b>	<i>Nitrosomonas</i> sp	cccctctgctgcactactcta *cctgtgctccatgctccg	Wagner <i>et al.</i> , (1995)
<b>NIT 3</b>	<i>Nitrobacter</i> sp	cctgtgctccatgctccg	Wagner <i>et al.</i> , (1996)
<b>AMX 820</b>	Bactérias Anamox, <i>Candidatus Brocadia</i> e <i>Candidatus Kuenenia stuttgartiensis</i>	aaaaccctctacttgccagtc	Schimid <i>et al.</i> , (2001)
<b>PDV 1031</b>	<i>Paracoccus denitrificans</i> , <i>Paracoccus versutus</i>	cctctgtccaggtcaccg	Neef <i>et al.</i> , (1996)
<b>PDV 198</b>	<i>Paracoccus denitrificans</i> , <i>Paracoccus versutus</i>	ctaactctttggcgataaatc	Neef <i>et al.</i> , (1996)
<b>TBD 1419</b>	<i>Thiobacillus denitrificans</i>	acttctgccagattccac	Fernandez <i>et al.</i> , (2008)

Aplicou-se análise de variância ANOVA entre os parâmetros que indicam qualidade do efluente tratado e a taxa hidráulica operada em cada coluna, com o nível de significância de 5% ( $\alpha = 0,05$ ), bem como, realizou-se correlações de Pearson correlacionando valores de nitrogênio nitrato formado com a taxa hidráulica.

## RESULTADOS

Na Tabela 2 apresentam-se a caracterização físico-química afluente e efluente de cada coluna de areia. É possível verificar indícios do início da nitrificação após 30 dias de operação, gerando um consumo de alcalinidade do meio.

**Tabela 2: Resultado médio físico-químico afluente (Aflu) e efluente (Eflu) de cada coluna.**

Tempo operação coluna (Dias)	pH		Alcalinidade (mg L <sup>-1</sup> )		DQO (mg L <sup>-1</sup> )		N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg L <sup>-1</sup> )		N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg L <sup>-1</sup> )		N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	
	Aflu	Eflu	Aflu	Eflu	Aflu	Eflu	Aflu	Eflu	Aflu	Eflu	Aflu	Eflu
15	6,8	6,5	457	400	560	348	68	43	*ND	ND	ND	ND
30	6,8	6,9	380	143	602	284	72	45	ND	5	ND	10
45	6,8	7,2	340	112	600	230	70	20	ND	4,3	ND	20
60	6,9	7,3	389	100	360	115	68	20	ND	3	ND	29
75	7,0	7,1	318	98	280	42	64	14	ND	8	ND	12
90	7,0	6,4	314	80	560	190	64	23	ND	2	ND	21
105	7,0	6,3	311	62	520	196	60	12	ND	2,5	ND	25
120	7,0	6,2	306	50	560	170	68	21	ND	3,5	ND	25
135	7,0	5,7	308	45	555	155	69	19	ND	2,6	ND	22
150	7,0	6,5	281	89	559	143	69	17	ND	1,3	ND	23

\*ND: Abaixo do limite de detecção

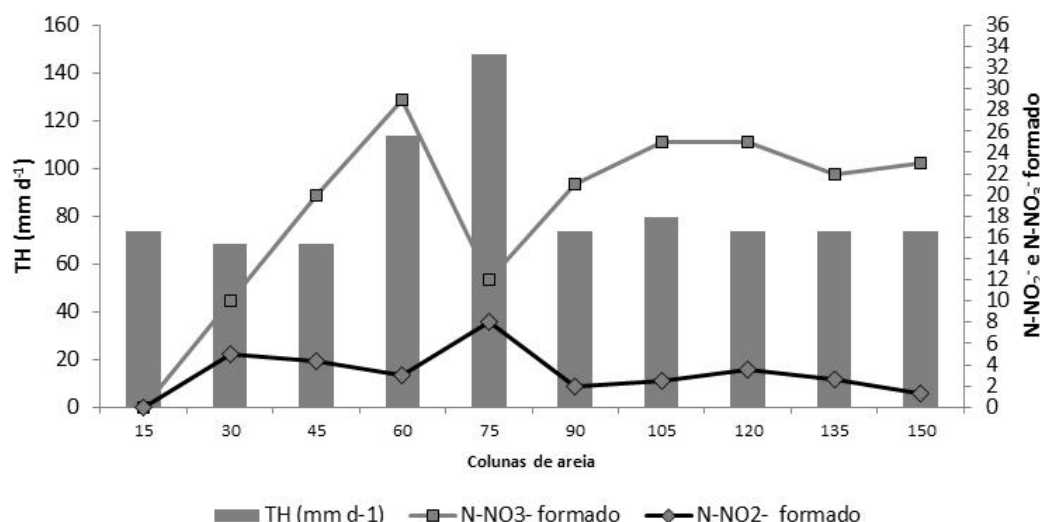
Constatou-se uma variação na remoção do nitrogênio amoniacal e a formação de nitrogênio nitrato e nitrito ao longo dos 150 dias de operação (Tabela 3). Dado que a microbiota nitrificante estabeleceu-se após 30 dias de operação, e que o fornecimento de carbono foi constante ao longo do estudo, e o carregamento de nitrogênio amoniacal variou entre 5 a 9 g m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>, a nitrificação pode ter sido influenciada diretamente pela variação da taxa hidráulica.

**Tabela 3: Desempenho das colunas de areia na remoção de DQO, N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e nitrificação.**

Tempo operação coluna (Dias)	TH (mm d <sup>-1</sup> )	Carga DQO (g m <sup>-2</sup> .d <sup>-1</sup> )	Remoção DQO %	Carga N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (g m <sup>-2</sup> .d <sup>-1</sup> )	Remoção N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> %	Remoção N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> devido à nitrificação %
15	74	41	38	5	37	0
30	68	41	53	5	38	55
45	68	41	62	5	71	49
60	113	41	68	8	71	67
75	148	41	85	9	78	40
90	74	41	66	5	64	56
105	80	41	62	5	80	57
120	74	41	70	5	69	61
135	74	41	72	5	72	49
150	74	41	74	5	75	47

A concentração do nitrogênio amoniacal, nitrato e nitrito do efluente das colunas de areia que operaram com taxa hidráulica média inferior a 80 mm d<sup>-1</sup>, não apresentaram diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ). Entretanto, as colunas que operaram com uma taxa hidráulica média de 113 mm d<sup>-1</sup> e 148 mm d<sup>-1</sup>, apresentaram diferenças significativas ( $p \geq 0,05$ ) nas concentrações de DQO, nitrogênio amoniacal, nitrato e nitrito efluente.

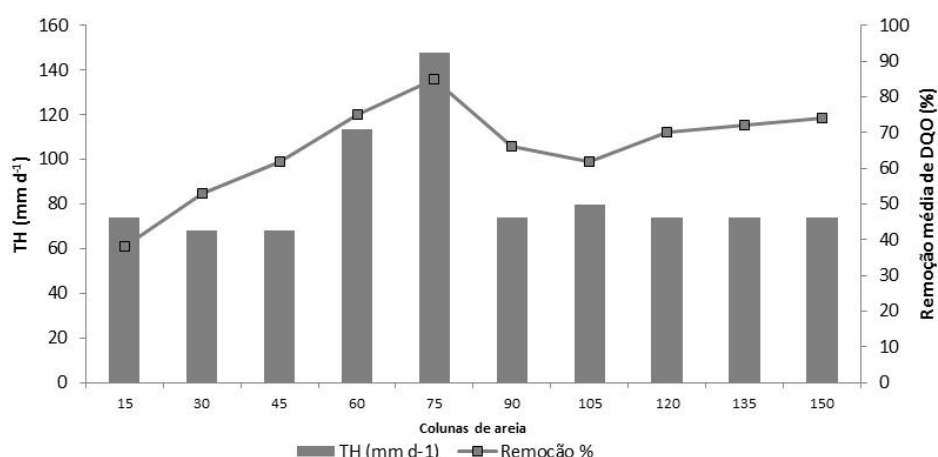
Conforme pode-se observar na Figura 2, as maiores concentrações de nitrogênio nitrato (valores médios de 29 mg L<sup>-1</sup>) ocorreram no efluente da coluna com tempo de operação de 60 dias que operou com uma taxa hidráulica média de 113 mm d<sup>-1</sup>, e as menores concentrações de nitrato (valores médios de 12 mg L<sup>-1</sup>) formaram-se na coluna com tempo de operação de 75 dias que operou com uma taxa hidráulica média de 148 mm d<sup>-1</sup>.



**Figura 2: Taxa Hidráulica aplicada e concentrações de nitrogênio nitrato e nitrito formado.**

Platzer (1999) recomenda uma taxa hidráulica máxima de 270 mm d<sup>-1</sup> para ocorrer nitrificação e remoções de 85% de DQO em WCVD. Contudo, nesse trabalho observou-se que operando com um carregamento de 41 gDQO m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>, uma carga de média de nitrogênio amoniacal de 9 g N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>, a nitrificação diminuiu com o aumento da taxa hidráulica aplicada, sendo que a máxima nitrificação ocorreu com taxa hidráulica média de 113 mm d<sup>-1</sup>.

Apesar do aumento da taxa hidráulica influenciar diretamente no acréscimo de oxigênio no maciço filtrante, é provável que a nitrificação diminuiu com taxa hidráulica média de 148 mm d<sup>-1</sup>, devido a baixa difusão do oxigênio no maciço filtrante, aumentando a competição entre bactérias heterotróficas e autotróficas. Conforme pode ser observado na Figura 3, a remoção de DQO ligeiramente aumentou quando operado com taxas hidráulicas de 148 mm d<sup>-1</sup>.



**Figura 3: Taxa Hidráulica aplicada e remoção de DQO.**

Com base nas correlações de Pearson, podemos ressaltar que nesse estudo, a taxa hidráulica e a nitrificação foi inversamente proporcional (-0,83459), ou seja, quando aplicado à máxima taxa hidráulica, observou-se as



menores concentrações de nitrato. Em contra partida, quando as maiores taxas hidráulicas foram operadas observou-se um aumento das concentrações de nitrito, indicando a nitrificação parcial.

Considerando as taxas hidráulicas operadas e ponderando o balanço de oxigênio (Tabela 4), proposto por Platzer (1999) mediante as condições de operação de cada coluna, pode-se observar que o maior consumo de oxigênio ocorreu na coluna que operou com uma taxa hidráulica m de 148 mm d<sup>-1</sup>, principalmente por a mesma ter apresentado a maior remoção de DQO.

**Tabela 4: Balanço de oxigênio em relação à taxa hidráulica aplicada.**

<b>Cálculo (g d<sup>-1</sup>)</b>	<b>148 mm d<sup>-1</sup></b>	<b>113 mm d<sup>-1</sup></b>	<b>80 mm d<sup>-1</sup></b>	<b>74 mm d<sup>-1</sup></b>	<b>68 mm d<sup>-1</sup></b>
Oferta de O <sub>2</sub> convecção	0,78	0,60	0,42	0,39	0,36
Oferta de O <sub>2</sub> difusão	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40
<b>Resultado de Oferta</b>	<b>1,18</b>	<b>1</b>	<b>0,82</b>	<b>0,79</b>	<b>0,76</b>
Necessidade de O <sub>2</sub> DQO + NH <sub>4</sub>	1,10	0,88	0,66	0,67	0,63
<b>Saldo O<sub>2</sub> (g/d)</b>	<b>0,07</b>	<b>0,11</b>	<b>0,16</b>	<b>0,12</b>	<b>0,13</b>
Remoção de DQO Considerada	85%	68%	62%	63%	57%

Conforme pode ser observado na Tabela 5, logo nos 15 primeiros dias de operação, verificou-se colonização do domínio Bactéria, resultando em uma elevada atividade metabólica na coluna, apresentando uma remoção média de DQO superior a 35%.

**Tabela 5: Porcentagem média dos indivíduos encontrados em relação às células coradas com DAPI.**

<b>Sondas*</b>	<b>Tempo de operação de cada coluna</b>									
	<b>15 dias</b>	<b>30 dias</b>	<b>45 dias</b>	<b>60 dias</b>	<b>75 dias</b>	<b>90 dias</b>	<b>105 dias</b>	<b>120 dias</b>	<b>135 dias</b>	<b>150 dias</b>
<b>EUB I,II,III</b>	30%	90%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	90%	90%
<b>NSO</b>	**nd	18%	15%	4%	28%	25%	28%	18%	20%	20%
<b>NEU</b>	nd	20%	20%	3%	30%	10%	10%	15%	18%	18%
<b>Ntspa</b>	nd	2%	17%	25%	5%	7%	8%	32%	25%	25%
<b>Ntspn</b>	nd	2%	18%	30%	2%	3%	7%	10%	8%	8%
<b>NIT</b>	nd	2%	8%	30%	2%	5%	5%	6%	10%	10%
<b>PAE</b>	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	5%	3%	3%

\* Para as sondas THIO, TBD 1419, PDV 1031, PDV 198 e AMX 820, não se observou hibridização;

\*\* nd = não detectável

Contudo, nenhuma presença de bactérias envolvidas na transformação do nitrogênio foi identificada até 15 dias de operação. Resultando em uma remoção de nitrogênio amoniacal de 37%, que pode estar associado principalmente com a adsorção deste íon no material filtrante e assimilação microbiana, visto que não obteve-se nitrificação efetiva até 15 dias de operação.

Identificou-se colonização de bactérias nitrificantes a partir de 30 dias de operação, o que reforça a formação de nitrogênio na forma de nitrato e nitrito no efluente das colunas de areia que operaram com tempo maior ou igual a 30 dias. Bahagt *et al.* (1999) estudando filtros de areia, demonstraram que bactérias oxidantes de amônia colonizam o filtro mais rapidamente em uma magnitude de 10<sup>5</sup> NMP g de areia<sup>-1</sup>, enquanto que as oxidantes de nitrito desenvolvem-se mais gradualmente e permanecem em minoria (10<sup>4</sup>-10<sup>5</sup> NMP g de areia<sup>-1</sup>).

Pode-se observar na Figura 4, um aumento considerável de bactérias envolvidas na transformação do nitrogênio amoniacal na coluna com tempo de operação de 60 dias, e uma diminuição significativa da colonização deste grupo de bactérias nas colunas com o tempo de operação 75 dias que operou com uma taxa hidráulica média de 148 mm d<sup>-1</sup>.

Sabe-se que existe uma variedade de fatores ambientais que podem influenciar a diversidade das bactérias nitrificantes, incluindo temperatura, pH, salinidade e, também, substâncias inibidoras, tais como carbono

orgânico. Contudo, nesse estudo pode-se observar a influência da taxa hidráulica aplicada na composição da comunidade bacteriana (Figura 5).

A coluna de areia que operou com taxa hidráulica média de 113 mm d<sup>-1</sup> e um carregamento médio de 8 g N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>, foi a mais colonizada por bactérias nitratantes. A coluna de areia que operou com taxa hidráulica média de 148 mm d<sup>-1</sup> e um carregamento médio de 9 g N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> favoreceu o desenvolvimento de bactérias nitrificantes (Figura 5).

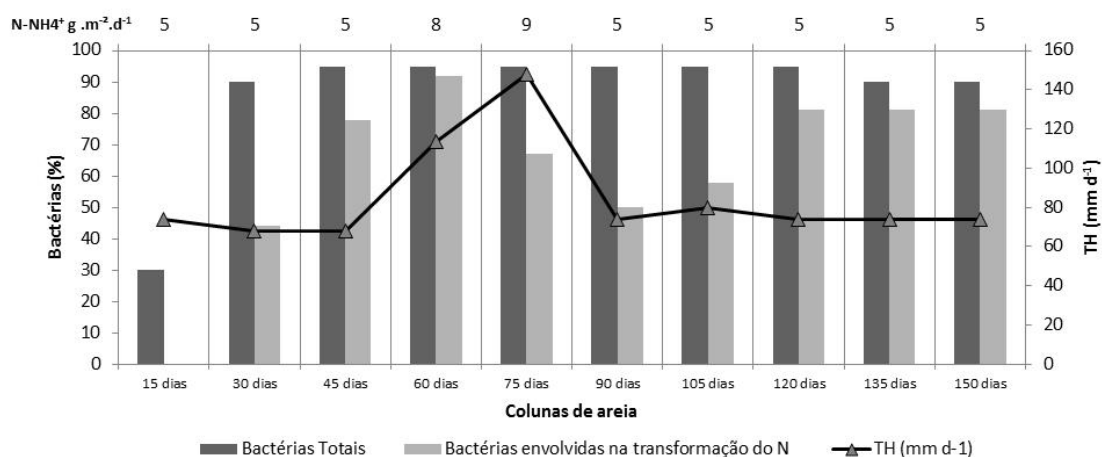


Figura 4: Bactérias totais e bactérias nitrificantes e desnitrificantes e taxa hidráulica aplicada.

As colunas que operaram com uma taxa hidráulica média menor que 80 mm d<sup>-1</sup>, e um carregamento médio de 5 N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>, foram colonizadas principalmente por bactérias nitrificantes, e apresentaram uma instabilidade na colonização de bactérias desnitrificantes, que foi possível de identificar esse grupo após 120 dias de operação. Segundo Pell & Nyberg, (1989) o estabelecimento de populações desnitrificantes em filtros de areia foram relatadas em um prazo de até 75 dias. Entretanto, a instabilidade desse grupo ao longo do estudo, pode ter sido influenciada pela disponibilidade de carbono orgânico, ou pelo aumento da taxa hidráulica aplicada que reflete diretamente na disponibilidade de oxigênio dissolvido (Figura 5).

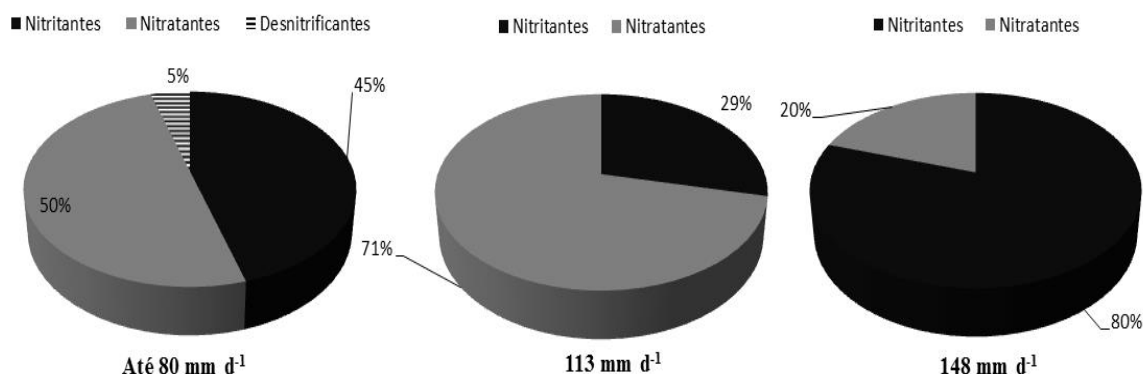


Figura 5: Comunidade bacteriana nitrificante e desnitrificantes identificadas nas colunas de areia operados sob diferentes taxas hidráulicas.

Foi evidente maior atividade bacteriana na superfície das colunas, sendo que cerca de 76% da comunidade bacteriana concentrou-se nos primeiros 0,05 m do material filtrante. Segundo estudo realizado por Tietz *et al.* (2007) em WCVD a atividade bacteriana concentrou-se cerca de 95% nos primeiros 0,10 m do material filtrante em função da maior disponibilidade de oxigênio e substrato para seu desenvolvimento. Na Figura 6 apresenta-se a porcentagem de células coradas em relação ao DAPI, referente à hibridização da sonda EUB I,II,II (domínio Bactéria).

Contudo, pode-se observar na Figura 7, que com o passar de 45 dias de operação das colunas de areia, verificou-se um aumento na variação volumétrica da comunidade bacteriana nitrificante e desnitrificante, onde as mesmas apresentaram colonização até os 0,15 m de profundidade, com um aumento significativo no fundo após 105 dias de operação. Com 150 dias de operação pode-se observar que 10 % da comunidade bacteriana nitrificante e desnitrificante, colonizaram até os 0,30 m do perfil vertical das colunas de areia.

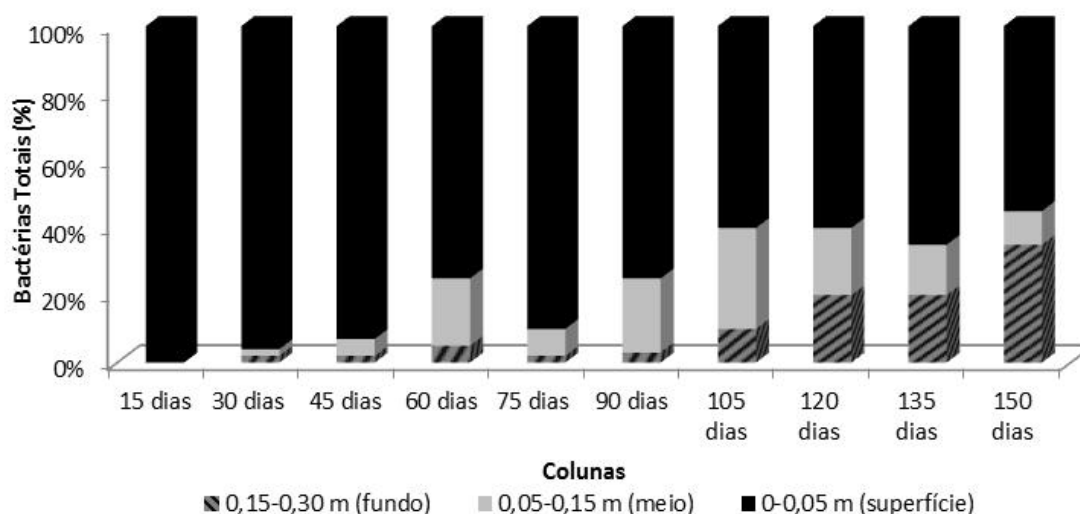


Figura 6: Variação volumétrica do domínio Bactéria identificado nas colunas de areia.

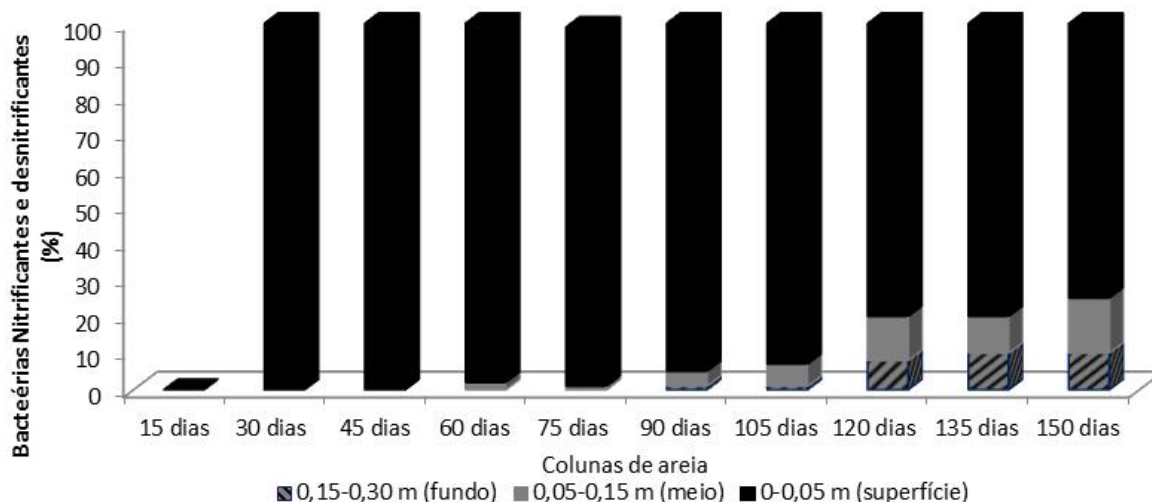


Figura 7: Variação volumétrica da comunidade nitrificante e desnitrificante nas colunas de areia.

## CONCLUSÕES

Considerando a avaliação físico-química nas frações líquida afluente e efluente, e a identificação bacteriana nitrificante e desnitrificante em colunas de areia, simulando o perfil vertical do maciço filtrante de um *wetland* construído vertical descendente, ao longo de 150 dias de operação, pode-se inferir:

- a nitrificação foi evidente após 30 dias de operação das colunas de areia, sendo que a máxima nitrificação ocorreu com a taxa hidráulica média de 113 mm d<sup>-1</sup>;
- o aumento da taxa hidráulica para 148 mm d<sup>-1</sup>, influenciou no decaimento da nitrificação;
- a coluna de areia que operou com taxa hidráulica média de 113 mm d<sup>-1</sup> e um carregamento médio de 8 g N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> e 41 g DQO m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> foi a mais colonizada por bactérias nitratantes;



- a coluna de areia que operou com taxa hidráulica média de 148 mm d<sup>-1</sup>, um carregamento médio de 9 g.N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> e 41 g DQO m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> favoreceu o desenvolvimento de bactérias nitrificantes;
- as colunas que operaram com uma taxa hidráulica média menor que 80 mm d<sup>-1</sup>, um carregamento médio de 5 g N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> e 41 g DQO m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> foram colonizadas principalmente por bactérias nitrificantes e apresentaram uma instabilidade na colonização de bactérias desnitrificantes;
- foi evidente maior atividade bacteriana na superfície das colunas, sendo que cerca de 76% da comunidade bacteriana concentrou-se nos primeiros 0,5 m do material filtrante;
- com o passar de 45 dias de operação das colunas de areia, verificou-se um aumento na variação volumétrica da comunidade bacteriana nitrificante e desnitrificante, onde as mesmas apresentaram colonização até os 0,15 m de profundidade;
- com 150 dias de operação pode-se observar que 10% da comunidade bacteriana nitrificante e desnitrificante concentram-se até nos 0,30 m do perfil vertical das colunas de areia.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. 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.
2. AMANN R. In situ identification of microorganism by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes. IN: A.D.L. Akkerman, J.D.van Elsas, F.J. de Bruijn (eds). *Molecular microbial Ecology Manual*, p.1-15, 1995.
3. AMANN, R. I.; KRUMBHOLZ, L.; STAHL, D. A. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in *Microbiology Journal Bacteriology*, v.176, p.762-770, 1999
4. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION – APHA. EATON, A. D.; CLESCERI, L. S.; GREENBERG, A. E. Standard methods for the examination of water and wastewater. 21 ed. American Water Works Association; Water Pollution Control Federation, Washington: APHA. D. C. 1368p., 2005.
5. BAHGAT M, DEWEDAR A, ZAYED A. Sand-filters used for wastewater treatment: buildup and distribution of microorganisms. *Water Research*, v.33, p.1949-1955, 1999.
6. COOPER, P.F.; JOB, G.D.; GREEN, M.B.; SHUTES, R.B.E. Reed Beds and constructed wetlands for wastewater treatment. Swindon: WRcplc. 1996. 184p.
7. DAIMS, H. NIELSEN, P. H.; SCHLEIFER, K.; WAGNER, M. In situ characterization of Nitrospira-like nitrite-oxidizing bacteria active in wastewater treatment plants. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 67, n. 11, p.5273-5284, 2001.
8. DAIMS, H.; BRUHL, A.; AMANN, R.; SCHLEIFER, K. H.; WAGNER, M. The Domain-specific Probe EUB338 is Insufficient for the Detection of all Bacteria: Development and Evaluation of a more Comprehensive Probe Set. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 22, n. 3, p.434-444, 1999.
9. FERNANDEZ, N.; SIERRA-ALVAREZ, R.; FIELD, J.A.; AMILS, R.; SANZ, J.L. Microbial community dynamics in a chemolithotrophic denitrification reactor inoculated with methanogenic granular sludge. *Chemosphere*, v.70, p. 462-474, 2008.
10. FIGUEROLA, E.L.; ERIJMAN, L. Bacterial taxa abundance pattern in an industrial wastewater treatment system determined by the full rRNA cycle approach. *Environmental Microbiology*, v. 9, n.7, p.1780-789,2007.
11. HOFFMANN, H.; PLATZER, C. Technology review of constructed wetlands subsurface flow. Constructed wetlands for greywater and domestic wastewater treatment in developing countries. Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit GmbH (GTZ). Saneamento Sustentável - Programa da Ecosan. 2011.36p.
12. JURETSCHKO, S. Mikrobielle Populationsstruktur und -dynamik in einer nitrifizierenden/denitrifizierenden Belebtschlammanlage. *Doctoral thesis* (Technische Universität München), 2000.

13. MOBARRY B.K.; WAGNER M.; URBAIN V.; RITTMANN B.E.; STAHL D.A. Phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria. *Applied Environmental Microbiology*, v. 62, p.2156-2162, 1996.
14. NEEF A.; ZAGLAUER A.; MEIER H.; AMANN R.; LEMMER H.; SCHLEIFER K.-H. Population analysis in a denitrifying sand filter: conventional and in situ identification of *Paracoccus spp.* in methanol-fed biofilms. *Applied Environmental Microbiology*, v.62, p.4329-4339, 1996.
15. PELL, M.; F. NYBERG. Infiltration of Wastewater in a Newly Started Pilot Sand-filter System: III. Transformation of Nitrogen. *Journal Environmental. Quality*, v. 18, p.463 - 467, 1989.
16. PLATZER, C. Design recommendation for subsurface flow constructed wetlands for nitrification and denitrification. *Water Science and Technology*, v.40, n.3, p. 257-263, 1999
17. PLATZER, C.; MAUCH, K. Soil Clogging in Vertical flow Reed Beds - Mechanisms, Parameters, Consequences and.... Solutions? *Water Science and Technology*, v.35, n.5, p. 175-181, 1997.
18. PLATZER, C.; SENF, C.; HOFFMANN, H.;CARDIA, W.; COSTA, R.H.R. Dimensionamento de *wetland* de fluxo vertical com nitrificação – adaptação de modelo europeu para as condições climáticas do Brasil. 24<sup>o</sup> Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, Belo Horizonte, MG, 2007.
19. SCHMID M.; SCHMITZ-ESSER S.; JETTEN M.; WAGNER M. 16S-23S rDNA intergenic spacer and 23S rDNA of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria: implications for phylogeny and in situ detection. *Applied Environmental Microbiology*, v. 3, p.450-459, 2001.
20. 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.
21. TIETZ, A.; HORNEK, R.; LANGERGRABER, G.; KREUZINGER, N.; e HABERL, R. Diversity of ammonia oxidizing bacteria in a vertical flow constructed wetland. *Water Science and Technology*, v.56, n.3, p.241-247, 2007.
22. VOGEL, A. L. *Análise Inorgânica Qualitativa*. 4ed. Editora Guanabara. Rio de Janeiro – RJ, 1981, 665p.
23. WAGNER M.; RATH G.; AMANN R.; KOOPS H.-P; SCHLEIFER K.-H. In situ identification of ammonia-oxidizing bacteria. *Systems Applied Microbiology*, v.18, p. 251-264, 1995.
24. WAGNER M.; RATH G.; KOOPS H.P.; FLOOD J.; AMANN R. In situ analysis of nitrifying bacteria in sewage treatment plants. *Water Science Technology*, v. 34, p. 237-244, 1996.