

## II-216 - FILTROS DE PEDRA COMO PÓS-TRATAMENTO DE LAGOA DE POLIMENTO: COMPORTAMENTO DA COMUNIDADE FITOPLANCTÔNICA

**Marcus Vinicius A. Santos**

Bacharel em Ciências Biológicas pela Faculdade Frassinetti do Recife. Mestrado em Engenharia Civil pela Universidade Federal de Pernambuco.

**Thorsten Köchling**

Engenheiro de Biotecnologia pela Universidade de Ciências Aplicadas de Mannheim (Alemanha). Doutorado em Biologia Molecular pela Universidade Autônoma de Madrid (Espanha). Pesquisador pós-doutorado da Universidade Federal de Pernambuco

**Sávia Gavazza**

Engenheira Civil pela Universidade Federal de Alagoas. Doutorado em Hidráulica e Saneamento pela Escola de Engenharia de São Carlos (USP). Professora Associada da Universidade Federal de Pernambuco. Pós-doutorado pela Universidade de Cornell (EUA).

**Mario Takayuki Kato**

Engenheiro Civil pela Universidade Federal do Paraná. Doutorado em Tecnologia Ambiental e Ciências da Agricultura pela Universidade Agrícola de Wageningen (Holanda). Professor Titular do Departamento de Engenharia da Universidade Federal de Pernambuco.

**Lourdinha Florencio**

Engenheira Civil pela Universidade Federal de Pernambuco. Doutorado em Ciências Agrícolas e Ambiental (Tecnologia Ambiental) pela Universidade Agrícola de Wageningen (Holanda). Professora Titular do Departamento de Engenharia Civil da Universidade Federal de Pernambuco.

**Endereço:** Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Tecnologia e Geociências. Departamento de Engenharia Civil. Laboratório de Saneamento Ambiental (LSA – UFPE). Av. Acadêmico Hélio Ramos, s/n. Cidade Universitária. CEP: 50740-530 Recife PE, Brasil – Tel.: (81) 21268742 e-mail: [flor@ufpe.com](mailto:flor@ufpe.com); [mvinicius86@gmail.com](mailto:mvinicius86@gmail.com)

### RESUMO

Sistemas de tratamento contendo lagoas de estabilização, maturação ou polimento podem produzir elevadas densidades de fitoplâncton contendo gêneros de cianobactérias produtoras de cianotoxinas que podem acarretar problemas de saúde pública em corpos d'água receptores. Entretanto, pouco se sabe sobre a remoção de cianobactérias em filtro de pedra e nem a potencialidade de produção de toxicidade das mesmas nesse ambiente. No presente trabalho, avaliou-se a eficiência de filtro de pedra de fluxo horizontal na remoção de sólidos e de cianobactérias, além da matéria orgânica residual, através da determinação de parâmetros físico-químicos. Como também, foi verificado, por meio de PCR, a presença do gene *mcyE*, indicador de toxinas produzidas pelo gênero *Microcystis* sp. Foram monitorados dois filtros de pedra em paralelo durante 230 dias de experimento com coleta a cada 15 dias. Os resultados revelam que os filtros de pedra eram semelhantes (teste T) e foram efetivos na remoção da DBO residual, alcançando no efluente os valores de  $11 \pm 4$  mg/L para ambos os filtros. A eficiência média de remoção de SST foi 65 % e 66% correspondendo a valores de  $33 \pm 17,4$  e  $32 \pm 15,3$  mg/L para os efluentes dos filtros 1 e 2, respectivamente. Já a remoção média do número total de células do fitoplâncton foi de 98% para ambos os filtros, com densidade média de cianobactérias no efluente do filtro 1 de  $2.464 \pm 766$  cel/mL e de  $2.448 \pm 728$  cel/mL para o filtro 2, ficando muito abaixo dos limites preconizados na resolução Conama 357/05 para as águas doces superficiais. Não foram encontrados os gêneros portadores do gene *mcyE*, indicando a ausência de toxinas produzidas por *Microcystis* sp., em todas as amostras analisadas. Pode-se concluir que os filtros de pedra são eficientes na remoção de sólidos em suspensão e cianobactérias e que, nas condições estudadas, não favorecem o desenvolvimento de organismos com potencialidade de produção de toxinas.

**PALAVRAS-CHAVE:** Filtros de Pedra, Remoção de Fitoplâncton, *Microcystis*, Gene *mcyE*.

## INTRODUÇÃO

No estado de Pernambuco, ressalta o tratamento de esgotos por lagoas de estabilização em virtude da adaptação ao clima. Contudo, os efluentes de lagoas de estabilização apresentam alta turbidez, nutrientes e sólidos suspensos, com um fitoplâncton rico em cianobactérias.

Alguns gêneros de cianobactérias são aptos de liberar toxinas (metabólitos secundários) que podem causar dano à saúde humana, desde dermatite, problemas hepáticos e morte por parada respiratória (LEFLAVIE; TEM-HAGE, 2007). Dentre as toxinas liberadas pelas cianobactérias, se destaca a microcistina que é produzida por alguns gêneros, tal como a *Microcystis*, e *Planktothrix* (INDERJIT & DAKSHINI, 1994; CARMICHAEL, 1997; AZEVEDO *et al.*, 2002; CHRISTIANSEN *et al.*, 2003).

A aplicação de filtro de pedra de fluxo horizontal após essas lagoas poderia ser uma alternativa atrativa para a remoção de sólidos em suspensão e, por conseguinte, o fitoplâncton. Entretanto, pouco se sabe sobre a remoção de cianobactérias em filtro de pedra e nem a potencialidade de produção de toxicidade das mesmas cultivadas nesse ambiente.

A identificação de certos gêneros de cianobactérias perigosas à saúde humana pode ser auxiliada pelas ferramentas da biologia molecular, por exemplo, a reação em cadeia da polimerase (PCR) que têm a sua finalidade de amplificar a sequência alvo através de protocolos sensíveis e específicos (MULLIS & FALONA, 1987) para detecção de determinados microrganismos.

Por conseguinte, a eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE), apresenta uma técnica eficiente para caracterizar comunidades microbianas com alto grau de complexidade (MUYZER *et al.*, 1993), além de permitir estudos relativamente rápidos e simples em relação à variabilidade espaço-temporal da determinada população microbiana.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência de filtro de pedra de fluxo horizontal na remoção de sólidos e de cianobactérias e da matéria orgânica residual, através da determinação de parâmetros físico-químicos. Além disso, foi verificado, por meio de técnicas de biologia molecular, a presença do gene *mcyE*, indicador de toxinas produzidas pelo gênero *Microcystis sp.*

## MATERIAIS E MÉTODOS

A Estação de tratamento de esgoto do município de Rio Formoso está situado a 08° 39'19.67''S e 35°08'47.52''O distando 81 Km da sua capital, Recife. A ETE Rio Formoso é constituída por um tratamento preliminar por gradeamento e caixa de areia, três reatores do tipo UASB, leitos de secagem, uma lagoa de polimento e um conjunto de quatro filtros de pedra. Contudo, o trabalho foi realizado nos 2 melhores filtros que não apresentavam problemas operacionais.

O efluente da lagoa de polimento segue por gravidade, via tubulação de 250 mm, para uma caixa de distribuição. Em seguida, o efluente é distribuído aos dois filtros de pedra através de uma tubulação de 150 mm. O fluxo do líquido é do tipo escoamento horizontal no interior dos filtros, sendo o material suporte constituído de seixos e pedras britadas com granulometrias distintas (3 a 10 cm), classificadas como brita três comercial, brita quatro comercial e pedras de mão comercial. A saída do efluente filtrado se dá através de canalículos com diâmetro de 28 mm.

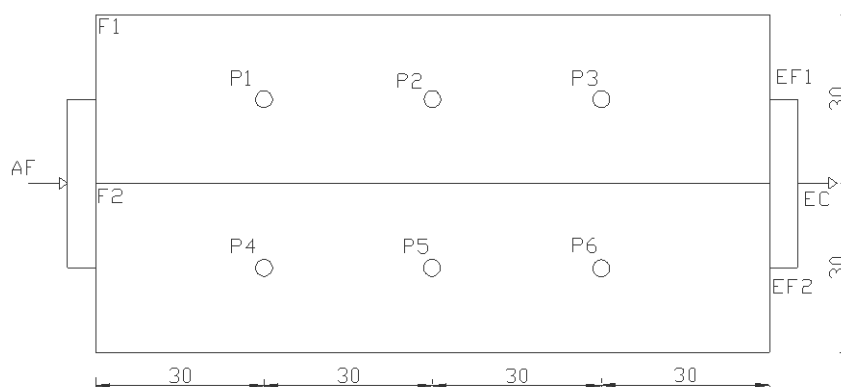
Após a reunião do efluente de cada filtro, por meio de tubos coletores, uma tubulação de 250 mm interliga os filtros à elevatória final. Por fim, após a saída deste ponto, o efluente é conduzido para o Rio Formoso, nas imediações da ponte da BR-101. As principais características dos filtros de pedra podem ser visto na Tabela 1.

**Tabela 1 – Características dos filtros de pedra de fluxo horizontal**

Comprimento (m)	120
Largura (m)	30
Altura do leito (m)	0,5
Volume (m <sup>3</sup> )	1980
Número de filtros (unidade)	2
Vazão média do filtro (m <sup>3</sup> .d <sup>-1</sup> )	504
Taxa de aplicação hidráulica (m <sup>2</sup> /m <sup>3</sup> .d <sup>-1</sup> )	30
Tempo de detenção hidráulica (d)	3

**Fonte: Adaptada da Companhia Pernambucana de Saneamento (COMPESA).**

O monitoramento do sistema foi realizado em intervalos de 15 dias, a primeira coleta foi realizada no dia 23 de outubro de 2013 e a última coleta foi realizada 10 de junho de 2014 totalizando 230 dias de experimento. Buscou-se analisar a eficiência de cada filtro individualmente e os pontos de coleta podem ser observados na Figura 1.



**Figura 1: Localização dos pontos de coleta nos filtros de pedra. Afluente – AF; efluente do filtro 1 – EF1; efluente do filtro 2 – EF2; efluente da caixa – EC; P1, P2 e P3 – pontos de coleta do Filtro 1 (F1); e P4, P5, P6 – pontos de coleta do filtro 2 (F2). Escala em metros (m)**

**Fonte: Adaptada da Companhia Pernambucana de Saneamento (COMPESA).**

Os pontos no estudo foram denominados: Afluente (AF), ponto situado na caixa de distribuição do efluente da lagoa de polimento; Pontos um (P<sub>1</sub>) e quatro (P<sub>4</sub>), pontos situados a 30 m do ponto AF (afluente do filtro); Pontos dois (P<sub>2</sub>) e cinco (P<sub>5</sub>), pontos medianos do filtro, pontos situados a 60 m do ponto AF (afluente do filtro), Pontos três (P<sub>3</sub>) e seis (P<sub>6</sub>), pontos situados a 90 m do ponto AF (Afluente do filtro) e por fim, pontos do efluente do filtro 1 (EF<sub>1</sub>) e efluente do filtro 2 (EF<sub>2</sub>). Efluente da caixa de união (EC), ponto situado no conjunto dos dois filtros de pedra. Este ponto teve a finalidade de analisar a possível presença do gene *mcyE* para a toxina microcistina.

As coletas nos pontos AF (afluente) e EC (efluente da caixa de união) foram realizadas em um recipiente plástico com auxílio de corda. Nos pontos dentro dos filtros de pedra, a medição dos parâmetros de campo *in situ* em tubos de PVC perfurados de 30 cm de altura inseridos no material suporte realizado em trabalho anterior por Martins (2012). Em relação ao estudo de biologia molecular, foram utilizados os pontos: afluente do filtro (AF), Ponto 2 (ponto médio do filtro 1) e efluente da caixa (EC).

A carga orgânica volumétrica média apresentada neste trabalho pode ser observada na Tabela 2 e 3 abaixo.

**Tabela 2: Carga orgânica volumétrica (COV) apresentada no filtro 1**

Parâmetro	Afluente	Meio do filtro 1	Efluente do filtro 1
DBO (kg.DBO/ m <sup>3</sup> .d <sup>-1</sup> )	0,000191	0,000102	0,0000513
NTK (kg.NTK/ m <sup>3</sup> .d <sup>-1</sup> )	0,000107	0,0000886	0,0000700
N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (kg.N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> / m <sup>3</sup> .d <sup>-1</sup> )	0,0000746	0,0000746	0,0000560

**Tabela 3: Carga orgânica volumétrica (COV) apresentada no filtro 2**

Parâmetro	Afluente	Meio do filtro 2	Efluente do filtro 2
DBO (kg.DBO/ m <sup>3</sup> .d <sup>-1</sup> )	0,000191	0,0000980	0,0000561
NTK (kg.NTK/ m <sup>3</sup> .d <sup>-1</sup> )	0,000107	0,0000889	0,0000701
N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (kg.N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> / m <sup>3</sup> .d <sup>-1</sup> )	0,0000746	0,0000501	0,0000561

Os parâmetros de campo foram mensurados “in loco” e auxiliado por multiparâmetro (marca HACH, modelo 40 D) e turbidímetro (marca HACH, modelo 2100 P). Os parâmetros analisados com seus respectivos métodos analíticos encontram-se referenciados na Tabela 4.

**Tabela 4: Parâmetros analisados em campo**

Parâmetro	Unidade	Método Analítico
Oxigênio dissolvido	mg/L	Eletrométrico
Condutividade elétrica	µs/cm	Eletrométrico
Potencial hidrogênico	pH	Eletrométrico
Temperatura	°C	Eletrométrico
Turbidez	NTU	Turbidímetro

As análises físico-químicas foram realizadas e embasadas pelo Standard Methods (APHA, AWWA e WPCF 2012), podendo ser observado na Tabela 5.

**Tabela 5: Parâmetros analisados em laboratório e seus respectivos métodos analíticos**

Análises	Unidade	Métodos Analíticos
Alcalinidade	mgCaCO <sub>3</sub> /L	Potenciométrico
DQO (total, filtrada e particulada)	mgO <sub>2</sub> /L	Colorimétrico
DBO (total, filtrada e particulada)	mgO <sub>2</sub> /L	Manométrico (Oxitop)
Fósforo total	mgP-PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> /L	Vanadato-molibdato
Ortofosfato	mgP-PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> /L	Vanadato-molibdato
Nitrogênio total	mgN-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /L	Macro-Kjedhal
Nitrito	mg NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> /L	Íons
Nitrato	mg NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /L	Íons
Nitrogênio amoniacal	mgN-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /L	Titulométrico
Sólidos suspensos (total, fixo e volátil)	mgSST/L	Gravimétrico

Em relação à análise qualitativa do fitoplâncton utilizou-se um microscópio óptico binocular da marca Leica-DME equipado com objetiva de 10, 20, 40 e 100 vezes e ocular de medição acoplada. Foram confeccionadas lâminas para cada amostragem, com o material vivo e outro com material preservado com lugol acético.

As características citomorfológicas e estruturais foram medidas as dimensões de 20 organismos das espécies mais abundantes e 10 para as espécies pouco frequentes, utilizando equipamento BEL view 7.1 photonics, acoplado ao microscópio. O mesmo foi utilizado para fotodocumentação dos organismos. A identificação das cianobactérias seguiu de acordo com Komárek e Anagnostidis (2000).

Em relação à contagem das células fitoplanctônicas foi utilizado o método de Utermöhl (1958), usando microscópio invertido Feldmann Wild Leitz, modelo Invert 1500, com contraste de fase.

A quantificação das células (cel/mL) foi realizada por meio de técnicas de transectos padronizados no sentido vertical e horizontal. Posteriormente, o microscópio invertido foi calibrado com o auxílio de uma lâmina micrométrica (câmeras de sedimentação de 2 e 5 mL).

Para o tratamento estatístico dos dados foi utilizada planilha eletrônica (EXCEL). Para estatística descritiva foram utilizados gráficos Box and Whiskers e tabelas, para analisar as médias e as variâncias entre os dados obtidos. Foi realizada também, a correlação de Pearson (valor de r) ao número de células de fitoplâncton encontrado no afluente e efluente dos respectivos filtros de pedra e respectivos parâmetros físico-químicos, tal como temperatura, turbidez, sólidos suspensos totais, nitrogênio amoniacal e ortofosfato, aplicado com nível de confiança de 95 %. Em relação à similaridade entre os efluentes dos filtros de pedra de fluxo horizontal, foi

realizado o teste T com duas amostras em par para médias para os parâmetros de sólidos suspensos totais e número total de fitoplâncton.

A extração do DNA foi realizada pelo Kit comercial Power Soil™ DNA Isolation Kit MOBIO laboratórios. Inc. Para adequar a amostra ao método de extração, é necessário que ocorra uma filtração de 100 mL da amostra por uma membrana de 0,22 µm (filtro de membrana de mistura de ésteres), com a finalidade de reter os microrganismos.

Os extratos de DNA genômico foram submetidos à amplificação pela técnica da PCR utilizando diferentes iniciadores (*primers*) de acordo com os estudos de Neilan *et al.*, (1999) para bactéria (968F-GC e 1392R), de acordo com os estudos de Nubel *et al.*, (1997) para cianobactéria (357F-GC e 781R) e de acordo com o trabalho de Vaitomaa *et al.*, (2003) para microcistina (mcyE-2F e Mic mcyE-8R).

Para cada reação do domínio bactéria foram utilizados volumes de 5 µL de tampão de reação (10x), 2 µL de Mg<sup>+2</sup> (50 mM), 1 µL de dNTPs (10 mM), 4 µL do primer (2 µL 968F-GC e 2 µL 1392R), 1 µL de DNA (10 ng/µL), 0,2 µL taq. polimerase (5U/ µL) e 36,8 µL de água ultra-pura. Completando o volume final da reação de 50 µL.

Para a amplificação específica de membros do filo Cianobactéria foram utilizados volumes de 5 µL de tampão de reação (10x), 2 µL de Mg<sup>+2</sup> (50 mM), 1 µL de dNTPs (10 mM), 4 µL do primer (2 µL 359F-GC e 2 µL 781R), 1 µL de DNA (10 ng/µL), 0,2 µL taq. polimerase (5U/ µL) e 36,8 µL de água ultra-pura. Deste modo finalizando um volume de reação de 50 µL.

Em relação a PCR para microcistina foram utilizados volumes de 2,5 µL de tampão de reação (10x), 1 µL de Mg<sup>+2</sup> (50 mM), 0,5 µL de dNTPs (10 mM), 2 µL do primer (1 µL de mcyE-F2 e 1 µL MicmcyE-R8), 1 µL de DNA (10 ng/µL), 0,1 µL taq. polimerase (5U/ µL) e 17,9 µL de água ultra-pura. Deste modo apresentando um volume final de 25 µL.

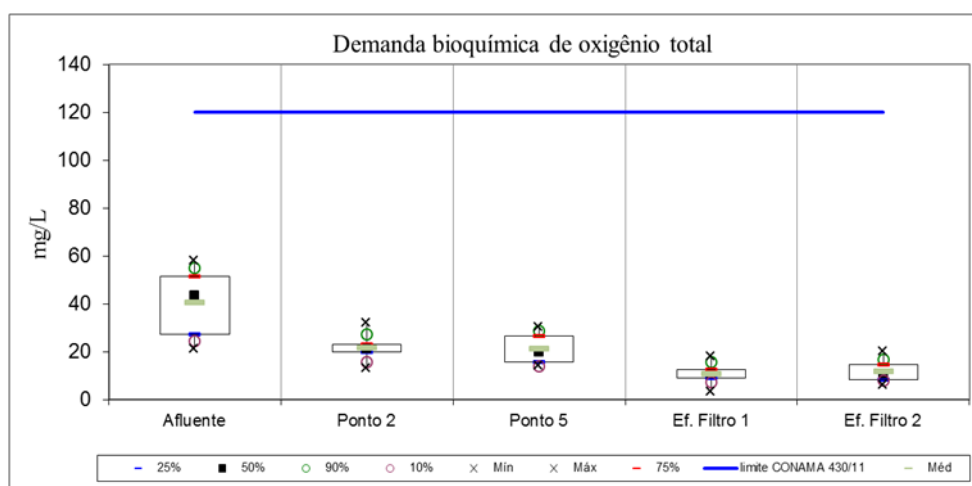
Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE). As condições de gradiente para a formação do gel para bactéria apresentou uma variação de 40% até 60% de ureia e formamida (UF) e 8% de acrilamida (AA), enquanto as condições de gradiente para a formação do gel para cianobactéria apresentou uma variação de 55% até 70% de ureia e formamida (UF) e 8% de acrilamida (AA).

## RESULTADOS

### Demanda bioquímica de oxigênio total

A concentração média da demanda bioquímica de oxigênio total observada no afluente para ambos os filtros foi de 41 mgO<sub>2</sub>/L, enquanto para o efluente do filtro 1 foi de 11 mgO<sub>2</sub>/L e para efluente do filtro 2 foi de 12 mgO<sub>2</sub>/L. A ETE Rio Formoso atendeu aos requisitos da legislação pertinente durante o período de estudo, podendo ser observada na Figura 2.

A eficiência média de remoção da demanda bioquímica de oxigênio total para o filtro 1 foi de 72 %, enquanto o filtro 2 apresentou remoção média de 69 % de demanda bioquímica de oxigênio total. A Resolução CONAMA N° 430 de 2011 estabelece que a Demanda Bioquímica de Oxigênio - DBO 5 dias, 20°C, para efluentes oriundos de sistemas de tratamento de esgotos sanitários deve ser no máximo de 120 mgO<sub>2</sub> /L. A ETE Rio Formoso atendeu aos requisitos durante ao período de estudo com concentração média em seus efluentes de 12 mgO<sub>2</sub>/L.



**Figura 2: Variação da demanda bioquímica de oxigênio total no afluente, ponto médio dos filtros de pedra e efluentes dos filtros de pedra.**

### Nitrogênio amoniacal

As concentrações médias no afluente, efluente do filtro 1 e efluente do filtro 2 foram 16 mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L, 12 mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L e 12 mgN-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L, respectivamente apresentando uma eficiência de remoção média de 25%, podendo ser observada na Figura 3. A Resolução CONAMA N° 357 de 2005 estipulava o padrão de lançamento para N amoniacal como sendo de 20 mg/L, entretanto o padrão foi suspenso. A legislação ambiental CONAMA N° 430 de 2011 não estabelece padrão máximo para lançamento de nitrogênio amoniacal para efluentes de sistemas de tratamento de esgotos sanitário.

Nos filtros de pedra, em alguns pontos ocorreram aumentos das concentrações de nitrogênio amoniacal. Pontos próximos ao afluente podem ter certo aumento devido à amonificação do nitrato precedente do afluente, outro fator importante é a ureia (CO[NH<sub>2</sub>]<sub>2</sub>) que é um composto presente em sedimentos encontrados no fundo da lagoa de estabilização oxidada com o líquido no sistema pode resultar no aumento da amônia, podendo ser observado na equação 1.



Amônia é o produto final da mineralização aeróbica do nitrogênio orgânico dissolvido e particulado. Deste modo, pode ser gerado por atividade de organismos heterotróficos. Por conseguinte, ao passo que as algas ficam aderidas ao material suporte e posteriormente a morte celular poderá haver à liberação do íon amoniacal por decomposição da biomassa algal.

No estudo de Mara e Johnson (2006) em escala piloto dois filtros de pedra em paralelo, o primeiro apresentava-se aerado e o segundo sem suprimento de oxigênio com a finalidade de remover nitrogênio amoniacal. Contudo o filtro não aerado apresentou um aumento significativo na concentração que pode ser devido à amonificação de nitrogênio orgânico atribuído a biodegradação das algas.



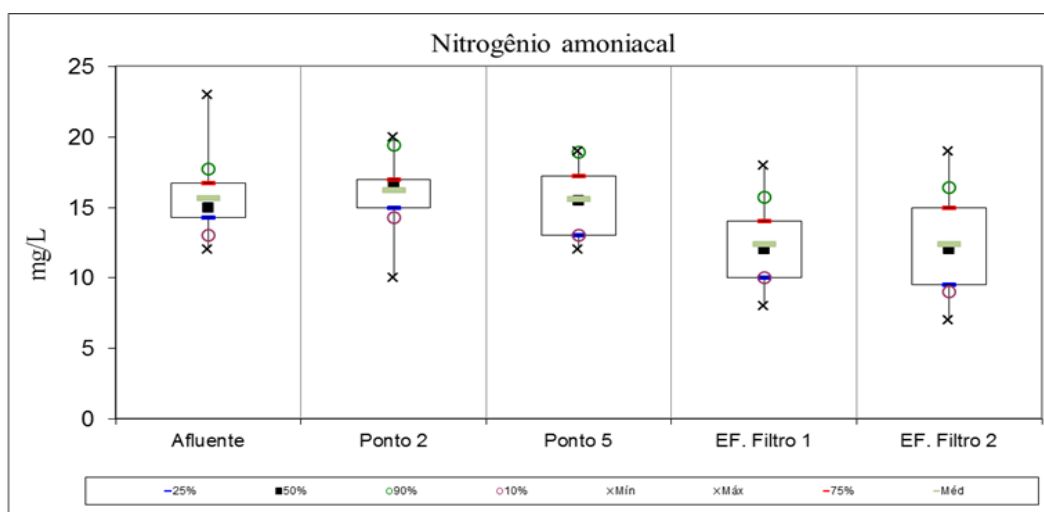


Figura 3: Variação de nitrogênio amoniacal no afluente, ponto médio dos filtros de pedra e efluentes dos filtros de pedra.

### Sólidos suspensos totais

A concentração média do afluente foi de 95 mg SST/L, enquanto o efluente do filtro 1 apresentou o valor médio de 33 mg SST/L e o filtro 2 apresentou valor médio de 32 mg SST/L, podendo ser observada na Figura 4.

O filtro de pedra 1 apresentou uma remoção média de 65 % para sólidos suspensos totais, enquanto o filtro 2 apresentou uma remoção média de 66 % de sólidos suspensos totais.

Trabalhos renomados (Middlebrooks, 1995; Saidam *et al.* 1995; Onyeka e Ochieng, 2010) argumentam que os filtros de pedra podem proporcionar de 50% a 70% de eficiência na remoção de sólidos suspensos totais.

O resultado para o Teste t entre as 14 observações dos efluentes dos filtros de pedra foi de ( $t = 0,744$ ), significa que as médias dos valores não diferem entre os tratamentos, ou seja, os filtros de pedra para este parâmetro não apresentaram diferenças significativas.

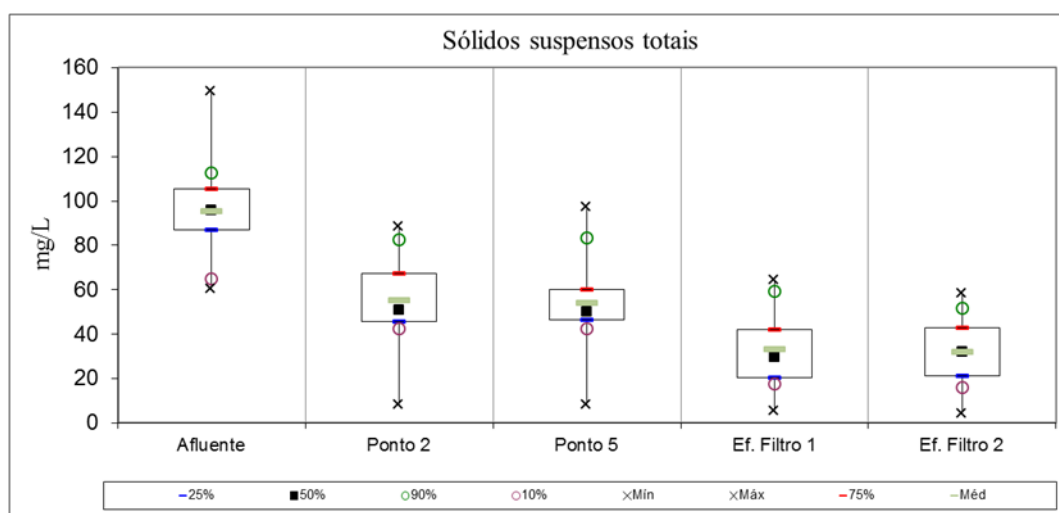


Figura 4: Variação de sólidos suspensos totais no afluente, ponto médio dos filtros de pedra e efluentes dos filtros de pedra.

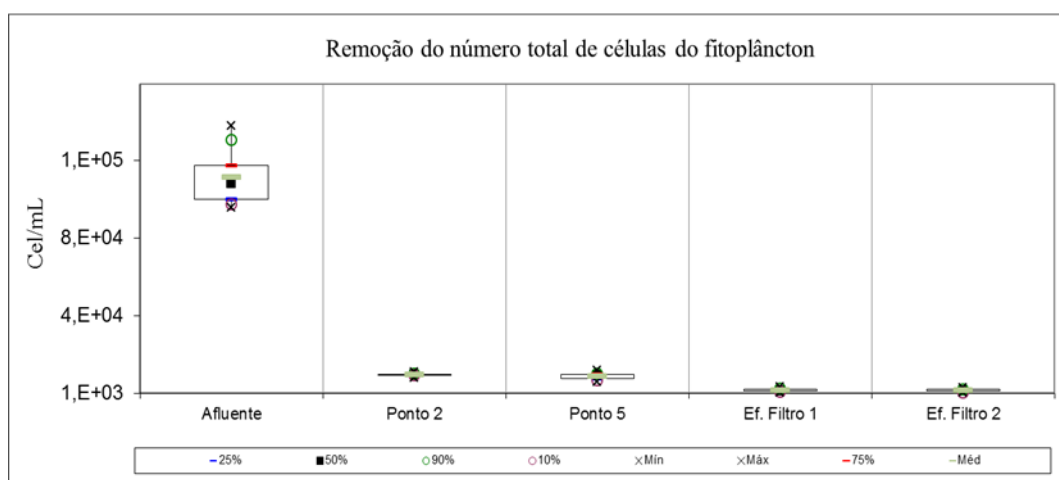
## Remoção do fitoplâncton

A figura 5 mostra a variação do número total de células do fitoplâncton nos pontos de amostragem. O valor médio observado no afluente foi de 112.200 de cel/mL. O efluente do filtro 1 apresentou o valor médio de 2.464 cel/mL, enquanto o efluente do filtro 2 apresentou um valor médio de 2.248 cel/mL, podendo ser observado na Tabela 36. Este resultado demonstra como o sistema de filtro de pedra foi eficaz na remoção do fitoplâncton apresentando uma eficiência média de redução de número total de células de aproximadamente de 98 %.

O resultado para o Teste t entre as 14 observações dos efluentes dos filtros de pedra foi de ( $t = 0,195$ ), significa que as médias dos valores não diferem entre os tratamentos, ou seja, os filtros de pedra para este parâmetro não apresentaram diferenças significativas.

Alguns autores (Stutz-Mc Donald & Williamson, 1979; Agust & Sánchez, 2002) argumentam que a remoção do fitoplâncton pode está relacionada por sedimentação, perda da vitalidade celular ocasionada áreas sombreadas e escuras. Os filtros de pedra apresentam áreas sombreadas no que se refere ao material suporte dispostas no sistema

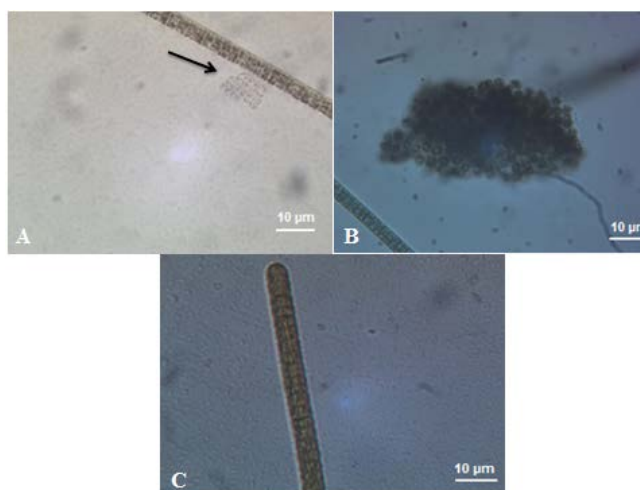
As condições advesas para o fitoplâncton apresentado pelo material suporte e o fluxo horizontal encontrados nos filtros de pedra proporcionaram uma elevada redução de fitoplâncton por tais microrganismos apresentarem distintas formas, proporcionando adsorção pelo material suporte.



**Figura 5: Variação do número total de células do fitoplâncton no afluente, ponto médio dos filtros de pedra e efluentes dos filtros de pedra.**

Após a passagem pelo sistema de filtros de pedra, a cianobactéria *Merismopedia tenuissima* continuou muito frequente (MF), enquanto que as cinaobactérias *Microcystis aeruginosa*, *Planktothrix mougeotii*, esteve pouco frequente (PF), podendo ser observado na Figura 6.





**Figura 6:** A - *Merismopedia tenuissima*; B - *Microcystis* (Fonte: Martins, 2012); C - *Planktothrix mougeotii*

De acordo com Short (2008), a velocidade da sedimentação de partículas em suspensão tende a aumentar com o tamanho. Sendo assim, uma célula de tamanho menor confere a desvantagem de diminuir a velocidade de sedimentação. Este fato pode explicar a frequência das espécies no efluente, visto que a *Merismopedia tenuissima* possui células muito pequenas (1,5 a 2,0 µm de diâmetro) quando comparadas com os outros gêneros de cianobactérias.

De acordo com Dunck *et al.* (2013) o gênero *Merismopedia* pode dominar ambientes por determinadas características, tais como, a capacidade de permanecer em suspensão na coluna de água por meio da bainha de mucilagem, apresentando baixas velocidades de decantação. Segundo Kruk *et al.* (2010) o gênero *Merismopedia* é ótima coletora de luz, desenvolvem-se em baixas concentrações de nutrientes e têm baixa velocidade de decantação em relação a outros gêneros de cianobactérias.

### Correlação de Pearson (r)

#### Temperatura x Fitoplâncton

O resultado do teste estatístico de Pearson para o parâmetro de temperatura em relação ao fitoplâncton exibiu uma correlação positiva bem fraca ( $r = 0,098$ ) para o afluente. O efluente do filtro 1, apresentou uma correlação positiva bem fraca ( $r = 0,046$ ), entretanto para o efluente do filtro 2, observou-se uma correlação positiva forte ( $r = 0,748$ ), podendo ser observada na Tabela 6.

Este resultado pode estar relacionado com a redução do fitoplâncton no efluente, já que a temperatura é reconhecida como um parâmetro que pode influenciar na. Temperaturas próximas a 25°C, a taxa de fitoplâncton de água doce geralmente eucariótica estabiliza ou diminui, enquanto as taxas de crescimento de muitas cianobactérias aumentam, proporcionando uma vantagem competitiva (PAERL & HUISMAN, 2009).

A temperatura mais elevada diminuirá a viscosidade da água de superfície e aumentará a difusão de nutrientes para a superfície da célula, um processo importante quando há competição por nutrientes entre espécies (PEPERZARK, 2003). Por estas razões, geralmente conclui-se que florações de cianobactérias podem aumentar em distribuição e intensidade, quando as temperaturas globais sobem (PAERL & HUISMAN, 2009).

#### pH X Fitoplâncton

A correlação entre fitoplâncton e pH no afluente apresentou-se positiva fraca ( $r = 0,319$ ). No efluente do filtro 1, a correlação apresentou-se positiva fraca ( $r = 0,316$ ) e para o efluente do filtro 2, a correlação apresentou-se também positiva fraca ( $r = 0,101$ ), podendo ser observada na Tabela 6

O resultado apresentado no afluente corrobora com valores altos de pH pelas condições abióticas encontradas na lagoa de estabilização. De acordo com Mara e Pearson (1992), devido à baixa entrada de matéria orgânica na lagoa, há uma menor produção de CO<sub>2</sub> nos processos de degradação da matéria orgânica. Em contrapartida,

existe um elevado consumo de CO<sub>2</sub> a partir da atividade fotossintética, gerando um saldo negativo de CO<sub>2</sub> na massa líquida.

#### *Sólidos suspensos x Fitoplâncton*

A correlação entre fitoplâncton e sólidos suspensos totais no afluente apresentou-se positiva fraca ( $r = 0,156$ ). No efluente do filtro 1 a correlação apresentou-se positiva bem fraca ( $r = 0,085$ ) e para o efluente do filtro 2, a correlação demonstrada foi positiva fraca e ( $r = 0,122$ ), podendo ser observada na Tabela 6.

Este resultado pode estar relacionado a problemas operacionais nas coletas de período chuvoso, já que o filtro de pedra encontrou-se alagado em alguns pontos. Como discutido anteriormente, os filtros de pedra promoveram uma boa remoção média de sólidos suspensos totais, já que existe uma grande densidade de algas no afluente, e posteriormente esta densidade perde sua vitalidade em ambientes sombreados pela ação do material suporte, sendo assim mais facilmente adsorvido por este.

A correlação encontrada nos efluentes dos filtros de pedra de fluxo horizontal pode estar relacionada à nitrificação, pois é responsável pelo decréscimo de pH, já que gera como produto final íons de H<sup>+</sup>, e esse decréscimo depende da capacidade de tamponamento do meio (METCALF&EDDY 2003).

#### *Turbidez x Fitoplâncton*

Em relação ao fitoplâncton e turbidez, a correlação do afluente manteve-se positiva moderada ( $r = 0,567$ ). Em relação ao efluente do filtro 1, o resultado da correlação apresentou-se forte positiva ( $r = 0,834$ ) e filtro 2 apresentou-se positiva moderada ( $r = 0,591$ ), respectivamente, podendo ser observada na Tabela 6.

Este parâmetro é um indicador de presença algal e pode estar relacionada com a decomposição das algas por ação do material suporte.

As algas perdem sua vitalidade em áreas sombreadas proporcionado pelo material suporte. O colapso das vesículas de gás em florações de cianobactérias por pressão provoca uma diminuição da turbidez (PORAT *et al.*, 1999). A diminuição da turbidez é proporcional à quantidade de vesículas de gás em colapso (WALSBY, 1994).

#### *Ortofosfato x Fitoplâncton*

A correlação apresentada pelo ortofosfato no afluente foi positiva bem fraca para o afluente ( $r = 0,063$ ), enquanto para o efluente do filtro 1 foi positiva moderada ( $r = 0,536$ ) e para o efluente do filtro 2 a correlação foi positiva fraca ( $r = 0,321$ ). O aumento no efluente pode corroborar com a informação que cianobactérias podem utilizar o polifosfato durante a deficiência do fosfato, podendo ser observada na Tabela 6.

Tal resultado pode estar relacionado por cianobactérias (*Planktothrix*, *Pseudonabaena*.) filamentosas que apresentam até 20 divisões celulares em condições adversas de fósforo, como também, a estratégia de assimilar tal elemento, além da sua necessidade momentânea, fenômeno chamado de consumo luxuriante. (SIGEE, 2005). Cianobactérias podem ser capazes de dominar tanto em condição de baixa ou alta concentração de fósforo. De acordo com Posselt *et al.* (2009), em baixas condições de nutrientes com elevada afinidade por fósforo lhe permite competir com outro fitoplâncton.

#### *Nitrogênio amoniacal x Fitoplâncton*

Em relação ao afluente, a correlação do nitrogênio amoniacal foi positiva fraca com o valor de ( $r = 0,170$ ). Em relação ao efluente do filtro 1, o valor de  $r$  ( $r = 0,336$ ) e para o efluente do filtro 2 (0,289), deste modo o a correlação do nitrogênio amoniacal foi positiva fraca para ambos efluentes dos filtros de pedra, podendo ser observada na Tabela 6.

Este resultado pode estar influenciado ao passo que as algas ficam aderidas ao material suporte e posteriormente havendo a morte celular poderá resultar na liberação do íon amoniacal por decomposição da biomassa algal. Formas inorgânicas de nitrogênio, principalmente nitrogênio amoniacal e nitrato são preferencialmente assimiladas pelo fitoplâncton, embora nitrogênio orgânico dissolvido possa aparecer ocasionalmente (CAREY *et al.*, 2012).

Tabela 6 – Correlação de Pearson (r) do fitoplâncton em relação aos parâmetros de temperatura, pH, SST, turbidez, nitrogênio amoniacal e ortofosfato.

Parâmetro	Afluente	Categoria	Efluente do Filtro1	Categoria	Efluente do Filtro 2	Categoria
°C	0,098	(+) bem fraca	0,046	(+) bem fraca	0,748	(+) forte
pH	0,319	(+) fraca	0,316	(+) fraca	0,101	(+) fraca
SST	0,156	(+) fraca	0,085	(+) bem fraca	0,122	(+) fraca
NTU	0,567	(+) moderada	0,834	(+) forte	0,591	(+) moderada
N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	0,170	(+) fraca	0,336	(+) fraca	0,289	(+) fraca
P-PO <sub>4</sub> <sup>-2</sup>	0,063	(+) bem fraca	0,536	(+) moderada	0,321	(+) fraca

## Biologia molecular

### DGGE de bactéria e cianobactéria

Houve dinâmica em determinadas populações nas amostras na DGGE das bactérias podendo ser influenciadas pelas condições abióticas e bióticas nos filtros de pedra. Em alguns casos foi capaz de observar uma diminuição na intensidade de bandas após o tratamento do afluente nas amostras (J, N) resultando clara redução de intensidade nas bandas do efluente nas amostras (M, P), o que indica a alta eficiência do filtro de pedra na remoção de microrganismos.

Também cianobactérias foram detectadas pelo método da DGGE em varias amostras dos filtros de pedra. Os padrões das bandas foram idênticos para a maioria das amostras. Contudo nas amostras (H, I) e (L,M) pode-se notar a eliminação quase por completa de cianobactérias pelo sistema de tratamento (Figura 7).

Na amostra (E, F) não houve eliminação de cianobactérias, provavelmente devido à ocorrência das chuvas que ocorreu esporádica no período de estiagem realizada neste estudo. Deste modo, diminuíram o tempo de residência do afluente no filtro. Após a realização da técnica da DGGE foram recortadas várias bandas e enumeradas, como podem ser observado na Figura 07 e Tabela 02. Estas bandas serão enviadas para sequenciamento.

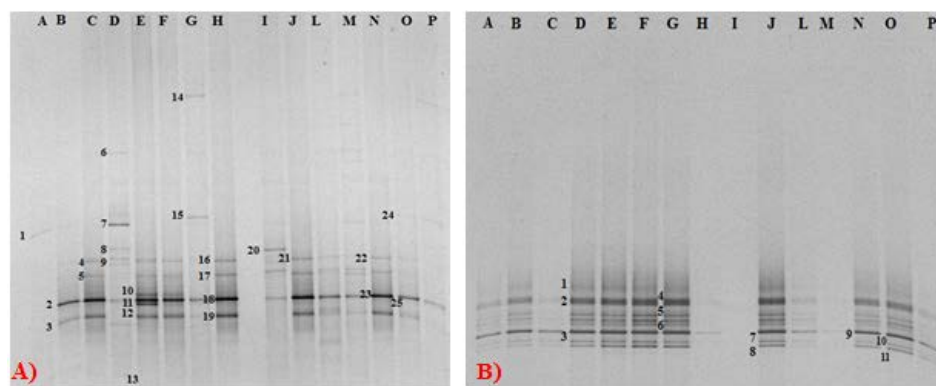


Figura 7: Geis de DGGE para *Bactéria* (A) e *Cianobactéria* (B). Os numeros indicam as bandas recortadas para reamplificação e posteriormente a serem sequenciadas

**Tabela 7 - Amostras utilizadas no determinado período do estudo e pontos caracterizados na formação do gel de ureia e formamida para a DGGE A (bactéria) e B (cianobactéria).**

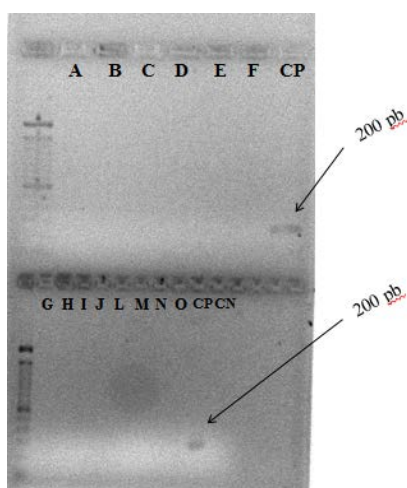
Datas	Período	Pontos
02 Dez. 2013	Estiagem	A → Afluente
02 Dez. 2013	Estiagem	B → Meio do Filtro
02 Dez. 2013	Estiagem	C → Efluente
18 Dez. 2013	Estiagem	D → Afluente
18 Dez. 2013	Estiagem	E → Meio do Filtro
18 Dez. 2013	Estiagem	F → Efluente
16 Jan. 2014	Estiagem	G → Afluente
16 Jan. 2014	Estiagem	H → Meio do Filtro
16 Jan. 2014	Estiagem	I → Efluente
21 Mai. 2014	Chuvoso	J → Afluente
21 Mai. 2014	Chuvoso	L → Meio do Filtro
21 Mai. 2014	Chuvoso	M → Efluente
10 Jun. 2014	Chuvoso	N → Afluente
10 Jun. 2014	Chuvoso	O → Meio do Filtro
10 Jun. 2014	Chuvoso	P → Efluente

### *Microcistina*

No determinado trabalho a amplificação com os primers mcyE-F2 e MicmcyE-R8 (Vaitomaa *et al.*, 2003) demonstrou-se negativa para todas as amostras durante o período do estudo. Contudo no mesmo gel foi adicionado um controle positivo da espécie *Microcystis sp.*, e este se amplificou, podendo ser observado na Figura 8 e Tabela 7.

Então, após o tratamento pode-se notar que no efluente continha cianobactérias, contudo os determinados gêneros não apresentaram gene produtor de toxina.

Este resultado corrobora com Paiva (2012) que apesar da existência de táxons potencialmente produtores de toxinas na ETE-Rio Formoso (*Microcystis*, *Anabaena*, *Oscillatoria*, *Anabaenopsis*) e elevada biomassa de cianobactérias, não foram detectado presenças de microcistinas-LR, através da análise por HPLC (cromatográfica líquida de alta precisão).



**Figura 8: Eletroforese dos produtos de PCR utilizando os primers mcyE-F2 e MicmcyE-R8, realizada nas amostras baseada na Tabela 02, controle positivo (CP) e controle negativo (CN)**

## CONCLUSÕES

Com base no trabalho realizado, concluiu-se que:

Os filtros de pedra promoveram uma excelente remoção da matéria orgânica, deste modo completando a remoção efetuada pelo reator UASB e pela lagoa de polimento. As concentrações médias dos filtros 1 e 2 atenderam aos padrões de efluentes em corpos d'água pela legislação 357/05, ou seja, o valor limite de 120 mg/L em termos de DBO.

Os resultados médios foram excelentes em relação à remoção de sólidos suspensos totais. A eficiência média de remoção de SST foi 65 % e 66% para o filtro 1 e 2, respectivamente, atingindo os valores de  $33 \pm 17,4$  mg/L e  $32 \pm 15,3$  mg/L para os filtros 1 e 2, respectivamente. Em relação a remoção de nitrogênio amoniacal os filtros de pedra apresentaram eficiência média de 25%, as concentrações médias no afluente, efluente do filtro 1 e efluente do filtro 2 foram 16 mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L, 12 mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L e 12 mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L, respectivamente. Os filtros de pedra apresentaram oscilação elevada durante o período do estudo, que podem ser explicado pelo desprendimento de algas presentes no material suporte. Vale salientar que o sólido em suspensão, a demanda bioquímica de oxigênio e o nitrogênio amoniacal são parâmetros fundamentais na caracterização da poluição dos corpos hídricos.

Em termos de remoção de cianobactérias nos filtros de pedra, os resultados apresentados para remoção média do número total de células do fitoplâncton foi de 98% para ambos os filtros, e a densidade média de cianobactérias no efluente do filtro 1 foi de  $2.464 \pm 766$  cel/mL e para o filtro 2 foi de  $2.448 \pm 728$  cel/mL ficando muito abaixo dos limites da legislação CONAMA 357/05, que é de 50.000 cel/mL.

Os resultados da DGGE de cianobactérias apoiaram os dados de contagem de fitoplâncton. O sistema de tratamento conseguiu uma grata eliminação das cianobactérias no período de estiagem. No período chuvoso o sistema foi sobrecarregado, assim provoca redução da eficiência.

Não houve no período do estudo gênero de *Microcystis* capazes de produzir microcistina através detecção por PCR específica. Isso coincide com resultados das pesquisas realizadas anteriormente na ETE Rio formoso onde não se detectou microcistina-LR via cromatografia líquida.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AZEVEDO, M.F. O., CARMICHAEL, W. W., JOCHIMSEN, E. M., RINEHART, K. L., LAU, S., SHAW, G. R., EAGLESHAM, G. K. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru – Brazil. *Toxicology*, v.181-182, p.441-446. 2002.
2. CAREY, C.C., IBELINGS, W., HOFFMANN, E., HAMILTON, D.P., BROOKES, J.D. Eco-physiological adaptations that favour freshwater cyanobacteria in a changing climate. *Water Research*, v.4, n.6, p. 1394-1407. 2012.
3. CARMICHAEL, W.W. The cyanotoxins In: Callow, J. *Advances in Botanical Research*. Academic Press, London. vol. 27, p. 211 – 256. 1997
4. DUNCK, B., BORTOLINI, J., RODRIGUES, L., RODRIGUES, L.C., JATI, S., TRAIN, S. Functional Diversity and Adaptive Strategies of Planktonic and Periphytic Algae in Isolated Tropical Floodplain Lake. Brazil. *Journal. Botany*, vol. 36, n. 4, p.:257–266. 2013.
5. KOMAREK, J. ANAGNOSTIDIS, K. Cyanoprokaryota. Teil: Chroococcales. *Spektrum, Akademische Verlag (Süßwasserflora von Mitteleuropa; Band 19/1)*, Berlin, 2000.
6. KRUK, C., HUSZAR, M., PEETERS, BONILLA, E.T.H., COSTA, L.; LURING, M.; REYNOLDS, C., SCHEFFER, M. A morphological classification capturing functional variation in phytoplankton. *Freshwater Biology*, vol. 55, p. 614–627. 2010.
7. LEFLAVIE, J. & TEM-HAGE, L. Algal and cyanobacterial secondary metabolites in freshwaters: a comparison of alleopathic compounds and toxins. Special review. *Freshwater Biology*, vol. 52, 199–214. 2007.
8. MARTINS, L., R. Remoção de fitoplâncton de lagoa de estabilização em Filtros de Pedra de Fluxo Horizontal, 2012. Dissertação de mestrado-Universidade Federal de Pernambuco, Recife 2012.
9. METCALF & EDDY. Inc. *Wastewater Engineering Treatment and reuse*, 4.ed. New York, McGraw - Hill Book, p. 611 – 623. 2003.



10. MIDDLEBROOKS, E.J. Upgrading pond effluents: an overview. *Water Science & Technology*, vol. 31, n. 12, p. 353-368. 1995.
11. MULLIS, K.B., FALOONA, F.A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, v. 55, p. 335-350. 1987.
12. MUYZER, G., DE WALL, E.C., UITTERLINDEN, A.G. Profiling of complex microbial by denaturing gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 59, p. 695-700. 1993.
13. NIELSEN, A.T., LIU, W., FILIPE, C., GRADY, L., MOLIN, S., STAHL, D.A. Identification of a novel group of bacteria in sludge from a derioated biological phosphorus removal reactor. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 1251 – 1258. 1999.
14. NUBEL, U.F., Garcia, P., Muyzer, G.. PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Applied Environmental Microbiology*, vol. 63, p. 3327-3332. 1997
15. ONYEKA, N., OCHIENG, G. Roughing filter for water pre-treatment technology in developing countries: A review, *International Journal of Physical Sciences*, vol 4, n. 9, p. 455-463. 2010.
16. PAIVA M. V. C. Avaliação da comunidade fitoplanctônica e eficiência de um sistema de tratamento de esgotos no litoral de Pernambuco, 2012. Dissertação de mestrado-Universidade Federal de Pernambuco de Recife. 2012.
17. PEPERZAK, L. Climate change and harmful algal blooms in the North Sea *Acta Oecologica*, vol. 24, p. 139–144. 2003.
18. POSSELT, A.J., BURFORD, M.A., SHAW G. Pulses of phosphate promote dominance of the toxic cyanophyte *Cylindrospermopsis raciborskii* in a subtropical water reservoir .*Journal. Phycological*, vol. 45, p.540 - 546. 2009.
19. SAIDAM, M.Y., RAMADAN, S.A., BUTLER, D. Upgrading waste stabilization pond effluent by rock filters. *Water Science Technology*, v. 31, n. 12, p. 369-378. 1995.
20. SIGGE, G. *Freshwater microbiology: biodiversity and dynamic interactions of microorganisms in the freshwater environment*. Chichester: John Wiley & Sons. 2005.
21. VAITOMAA, J., RANTALA, A., HALINEN, K., ROUHIANEN, L., TALLBERG, P., MOKELKE, L., SINVONEN, K. Quantitative real-time PCR for determination of microcystin-synthetase E copy numbers of *Microcystis* and *Anabaena* in lakes. *Applied Environmental Microbiology*, vol. 69, n. 12, p. 7289–7297. 2003.
22. WALSBY, A.E. Gas vesicles. *Microbiological Review*, vol. 58,p. 94-144. 1994