



UNIVERSIDADE DO VALE DO RIO DOS SINOS
CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA CIVIL

**AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA NITRIFICANTE NA ETAPA DE PARTIDA DE
BIOFILTRO AERADO SUBMERSO (BAS) MULTI-ESTÁGIO, COMO PÓS-
TRATAMENTO DE EFLUENTE DE REATOR ANAERÓBIO ALIMENTADO
COM MISTURA DE LIXIVIADO DE ATERRO SANITÁRIO E ESGOTO
DOMÉSTICO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

LAILA GICELLI ENGEL COLOMBO

SÃO LEOPOLDO

2010

LAILA GICELLI ENGEL COLOMBO

**AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA NITRIFICANTE NA ETAPA DE PARTIDA DE
BIOFILTRO AERADO SUBMERSO (BAS) MULTI-ESTÁGIO, COMO PÓS-
TRATAMENTO DE EFLUENTE DE REATOR ANAERÓBIO ALIMENTADO
COM MISTURA DE LIXIVIADO DE ATERRO SANITÁRIO E ESGOTO
DOMÉSTICO**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Engenharia Civil da
UNISINOS como requisito parcial para a
obtenção do grau de Mestre em Engenharia
Civil

Orientador: Prof. Dr. Luis Alcides Schiavo Miranda
Co-orientador: Prof. Dr. Luis Fernando da Costa Medina

Setembro/2010

Ficha catalográfica

C718a Colombo, Laila Gicelli Engel

Avaliação da microbiota nitrificante na etapa de partida de biofiltro aerado submerso (BAS) multi-estágio, como pós-tratamento de efluente de reator anaeróbio alimentado com mistura de lixiviado de aterro sanitário e esgoto doméstico / por Laila Gicelli Engel Colombo. – 2010.

91 f. ; il., : 30cm.

Dissertação (mestrado) — Universidade do Vale do Rio dos Sinos, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, 2010.

“Orientação: Prof. Dr. Luis Alcides Schiavo Miranda ; Co-orientação: Prof. Dr. Luis Fernando da Costa Medina”.

1. Resíduos – Gerenciamento. 2. Aterro sanitário. 3. Biofiltro aerado submerso. 4. Lixiviado. 5. Nitrificação. I. Título.

CDU 628.4

Catálogo na Fonte:

Bibliotecária Vanessa Borges Nunes - CRB 10/1556

TERMO DE APROVAÇÃO

“AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA NITRIFICANTE EM BIOFILTRO AERADO SUBMERSO (BAS) MULTI-ESTÁGIO, COMO PÓS-TRATAMENTO DE EFLUENTE DE REATOR ANAERÓBIO ALIMENTADO COM MISTURA DE LIXIVIADO DE ATERRO SANITÁRIO E ESGOTO DOMÉSTICO”

LAILA GICELLI ENGEL COLOMBO

Esta Dissertação de Mestrado foi julgada e aprovada pela banca examinadora no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil da UNISINOS como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de MESTRE EM ENGENHARIA CIVIL.

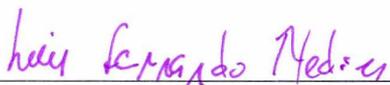
Aprovado por:



Prof. Dr. Luis Alcides Schiavo Miranda
Orientador

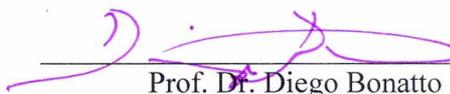


Prof. Dr. Claudio de Souza Kazmierczak
Coordenador do PPGEC/UNISINOS

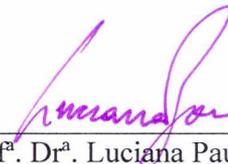


Prof. Dr. Luiz Fernando Medina
Coorientador

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Diego Bonatto



Prof.^a. Dr.^a. Luciana Paulo Gomes

SÃO LEOPOLDO, RS – BRASIL
Julho/2010

Instituições e fontes financiadoras



Universidade do Vale do Rio
dos Sinos UNISINOS



Consórcio Público de
Saneamento Básico da Bacia
Hidrográfica do Rio dos Sinos
PRÓ SINOS



Comitê de Gerenciamento da
Bacia Hidrográfica do Rio dos
Sinos
COMITESINOS



Ministério do
Meio Ambiente



Fundo Nacional de Meio
Ambiente do Ministério do
Meio Ambiente
FNMA



Secretaria Estadual de Meio
Ambiente do Rio Grande do
Sul
SEMA



Programa de apoio ao ensino
e a pesquisa científica e
tecnológica em engenharias

Edital PRÓ-ENGENHARIAS 01/2007

Dedicatória

Ao meu esposo Luís Gustavo e minha filha

Rafaella Luísa,

Por todo carinho, compreensão e amor
dedicados ao longo desta jornada.

Obrigada por todo o apoio!

Obrigada Deus, por estas pessoas
maravilhosas que colocaste em minha vida.

Agradecimentos

A Deus pelo dom da vida e força em todos os momentos.

A meus pais Irnani e Elizete por todo auxílio, carinho e incentivo, por terem me ensinado que a melhor herança são os estudos e por estarem ao meu lado em todos os momentos. A eles minha eterna gratidão.

A minha irmã Mônia e meu cunhado Tiago, pelo incentivo, amizade e pelos momentos de alegria e descontração.

Ao meu marido por todo amor, carinho, paciência e auxílio nos desenhos em Auto Cad.

A minha filha Rafaella, por ter sido uma grande incentivadora na busca desta conquista.

Ao meu orientador prof. Dr. Luis Alcides Schiavo Miranda pelo apoio, confiança e ajuda prestada.

Ao meu co-orientador prof. Dr. Luis Fernando Medina, pelo auxílio nas análises laboratoriais, por todo apoio e ajuda nas mais diversas situações.

A Taís, bolsista de iniciação científica, por toda dedicação, paciência e auxílio nas análises laboratoriais, nos ensaios de extração de DNA e PCR.

A professora Dr^a. Luciana Paulo Gomes, pelo apoio e oportunidade de fazer parte do Laboratório de Microbiologia de Resíduos da Unisinos e realizar nele as análises de NMP.

Ao professor Victor Hugo Valiatti, coordenador do Laboratório de Biologia Molecular da Unisinos, por permitir a realização das análises de Extração de DNA e PCR e utilização do material.

Ao Igor, técnico do mesmo laboratório, por todo auxílio e boa vontade, por estar sempre pronto a nos ajudar.

Ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Civil (PPGEC) da Unisinos pela oportunidade de enriquecer meus conhecimentos.

A todo o corpo docente deste PPGEC, pelo conhecimento, dedicação e amizade a nós dispensados.

Ao Plano Sinos, Comitesinos, Pró-sinos, Consórcio e demais apoiadores, pelo auxílio financeiro.

Ao Pró-Engenharias pelo auxílio na execução do experimento e ajuda financeira.

A ETE Canoas-Corsan, que cedeu espaço para as instalações do experimento.

A colega e amiga Fabiane, pelo auxílio, amizade e companheirismo em todos os momentos.

Aos demais colegas do laboratório de Microbiologia de Resíduos, Elisa, Bárbara, Débora, Maura e Roger, pela amizade e ajuda prestada.

Aos amigos conquistados ao longo deste período, em especial os colegas da segunda turma do mestrado em Engenharia Civil da Unisinos, que de forma direta ou indireta contribuíram para meu crescimento profissional.

Listas de Abreviaturas

ARDRA - Análise restrita do DNA ribossomal amplificado

BAS - Biofiltros Aerados Submersos Multi-estágio

BF - Biofiltro

CTAB - Brometo de Cetil Trimetil Amônio

DAFA - Digestor Anaeróbico de Fluxo Ascendente

DBO - Demanda Bioquímica de Oxigênio

DGGE - Eletroforese em gel de gradiente desnaturante

DNA - Ácido desoxirribonucléico

DQO - Demanda Química de Oxigênio

DQO_t - Demanda Química de Oxigênio total

ETE - Estação de Tratamento de Esgoto

FISH - Hibridização *in situ* com ondas fluorescentes

IPH - Instituto de Pesquisas Hidráulicas

NMP - Número mais provável

NT - Nitrogênio total

NTK - Nitrogênio total Kjeldahl

OD - oxigênio dissolvido

PCR - *Polymerase chain Reaction* (reação em cadeia da polimerase)

pb - Pares de base

PNSB - Pesquisa nacional de saneamento básico

PPGEC - Programa de pós-graduação em engenharia civil

rDNA – DNA ribossomal

RISA - Análise intergênica do ribossomo

RPM - Rotações por minuto

RSU - Resíduos Sólidos Urbanos

SS - Sólidos suspensos

SS_t - Sólidos suspensos totais

TEB - Tris EDTA Ácido Bórico

TSM - Tanque séptico modificado

UASB - Upflow Anaerobic Sludge Blanket (Reator anaeróbio de fluxo ascendente)

Lista de Tabelas

Tabela 1. Composição dos lixiviados provenientes de diferentes aterros sanitários	27
Tabela 2. Características dos materiais de recheio empregados	51
Tabela 3. Parâmetros e freqüência de amostragens para cada BAS.....	55
Tabela 4. <i>Primers</i> utilizados nas análises por PCR nos biofimes dos BAS para análise da biomassa nitrificante	57
Tabela 5. Parâmetros analisados para o monitoramento do processo, métodos e local de realização das análises.	58
Tabela 6. Resultados médios de DBO e DQO e relação DBO/DQO do efluente contido no sistema BAS monitorados entre 19/11/2009 e 18/02/2010.....	63
Tabela 7. Resultados das análises de NMP de <i>Nitrosomonas</i> na câmara aeróbia de cada BAS.....	69
Tabela 8. Resultados das análises de NMP de <i>Nitrobacter</i> na câmara aeróbia de cada BAS.....	70

Lista de Figuras

Figura 1. Diagrama mostrando o desenvolvimento de um biofilme como um processo de cinco estágios.....	33
Figura 2. Esquema de nitrificação através dos microrganismos <i>Nitrosomonas</i> e <i>Nitrobacter</i>	36
Figura 3. Esquema da replicação do DNA pela realização da PCR.....	42
Figura 4. Fluxograma de funcionamento do sistema experimental.....	47
Figura 5. Desenho esquemático de um biofiltro aerado submerso multi-estágio.....	50
Figura 6. Foto dos materiais suporte empregados nos BAS 1, 2 e 3.....	51
Figura 7. Imagem em duas partes do sistema BAS.....	52
Figura 8. Sistema de controle da alimentação – Bombas dosadoras e inversores de frequência.....	53
Figura 9. Foto de um dos BAS mostrando a torneira, para coleta de amostras líquidas e a escotilha, para coleta de meio suporte.....	54
Figura 10. Fotografia dos produtos da extração após eletroforese em gel de agarose do biofilme	59
Figura 11. Extração de DNA de biofilme dos reatores BAS instalados na ETE Canoas-CORSAN.....	60
Figura 12. Fotografia dos produtos de PCR após eletroforese em gel de agarose do biofilme.....	61
Figura 13. Comportamento da DQO total do efluente contido no sistema BAS, monitorados entre 19/11/2009 e 11/02/2010.....	64
Figura 14. Resultados das contagens (NMP/100 mL) de <i>Nitrosomonas</i> e <i>Nitrobacter</i> na câmara aeróbia do BAS 1, monitorado entre 16/10/09 e 18/02/2010.....	66

Figura 15. Resultados das contagens (NMP/100 mL) de <i>Nitrosomonas</i> e <i>Nitrobacter</i> na câmara aeróbia do BAS 2 monitorados entre 16/10/09 e 18/02/2010.....	67
Figura 16. Resultados das contagens (NMP/100 mL) de <i>Nitrosomonas</i> e <i>Nitrobacter</i> na câmara aeróbia do BAS 3 monitorados entre 16/10/09 e 18/02/2010.....	68
Figura 17. Resultados das contagens (NMP/100 mL) de <i>Nitrosomonas</i> na câmara aeróbia dos três BAS monitorados entre 16/10/09 e 18/02/2010.....	69
Figura 18. Resultados das contagens (NMP/100 mL) de <i>Nitrobacter</i> na câmara aeróbia dos três BAS monitorados entre 16/10/09 e 18/02/2010.....	70
Figura 19. Análise da concentração de Nitrogênio Amoniacal afluente e efluente ao sistema BAS, monitorados entre 19/11/2009 e 11/02/2010.....	71
Figura 20. Comportamento do pH do efluente contido no sistema BAS, monitorados entre 19/11/2009 e 18/02/2010	72
Figura 21. Comportamento do Nitrato do efluente contido no sistema BAS, monitorados entre 19/11/2009 e 11/02/2010	73

RESUMO

Este trabalho fundamentou-se no monitoramento de um sistema composto de três Biofiltros Aerados Submersos (BAS) multi-estágio, aplicado ao pós-tratamento de efluente de reator anaeróbio alimentado com mistura de lixiviado de aterro sanitário e esgoto doméstico, sendo testados três diferentes meios suporte: tampas e gargalo de garrafa PET, pedra britada nº4 e anéis *Pall*, sendo denominados BAS 1, 2 e 3. Os BAS são reatores com biomassa fixa, de forma que os microrganismos se aderem ao meio suporte formando biofilme. Neste sentido, este trabalho objetivou verificar a ocorrência de microbiota nitrificante no período de partida do sistema, convencionado em 90 dias. Foi avaliada a presença de bactérias nitrificantes através de técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR) e técnica do número mais provável (NMP), visando a quantificação dos microrganismos, especificamente *Nitrosomonas* e *Nitrobacter*. A presença destes foi confirmada pelos resultados das análises físico-químicas e pela técnica de NMP. A contagem de bactérias do gênero *Nitrosomonas* para os 3 BAS apresentou um perfil semelhante com valores entre $7,8 \times 10^1$ e $>1,6 \times 10^5$ (BAS1); $7,8 \times 10^1$ e $1,6 \times 10^5$ (BAS2) e $2,4 \times 10^1$ e $9,2 \times 10^4$ (BAS3). O mesmo comportamento foi observado para bactérias do gênero *Nitrobacter*, cujos valores variaram entre: $< 1,8 \times 10^1$ e $1,6 \times 10^4$ (BAS1); $1,8 \times 10^1$ e $2,4 \times 10^3$ (BAS2); $1,7 \times 10^1$ e $3,5 \times 10^3$ (BAS3). As contagens de bactérias do gênero *Nitrobacter* apresentaram-se menores em todos os reatores. Os teores de nitrato avaliados no efluente mostraram a ocorrência de um acréscimo na concentração ao longo do período monitorado em todos os reatores apresentando os seguintes valores: 74 a 922 mg/L (BAS 1), 95 a 910 mg/L (BAS 2) e 33 a 910 mg/L (BAS 3), o que pode ser relacionado com o aumento da presença de bactérias nitrificantes, conforme resultados do NMP. As análises de PCR, entretanto, foram prejudicadas possivelmente pela presença de substâncias inibidoras dificultando a amplificação. Neste estágio toda a matéria orgânica facilmente biodegradável já havia sido consumida pelo pré-tratamento anaeróbio a jusante dos BAS,

permanecendo no afluente aos BAS apenas matéria orgânica recalcitrante, o que dificultou o desenvolvimento de um biofilme adequado e possivelmente a amplificação do DNA das bactérias nitrificantes presentes no sistema. Esta pesquisa é parte de dois projetos amplos, o Programa de Apoio ao Ensino e a Pesquisa Científica e Tecnológica em Engenharias (Pró-Engenharias) e o Plano Sinos, que tem por objetivo estruturar o Plano de Bacia para o Rio dos Sinos. A importância deste trabalho vai de encontro com a necessidade de se desenvolverem alternativas que busquem melhorar a qualidade das águas residuárias lançadas na Bacia Hidrográfica do Rio dos Sinos.

Palavras chave: biofiltro aerado submerso multi-estágio, nitrificação, PCR, NMP, lixiviado de aterro sanitário.

ABSTRACT

This work was based on the monitoring of a system formed by three multi-stage Submerge Aerated Biofilters (BAS), applied to the post-treatment of effluent of the anaerobic reactor fed with mixture of landfill leachate and domestic sewage, being tested three different support media: lids and necks of PET bottles, broken stone nº4 and *Pall* rings, being denominated BAS 1, 2 and 3. The BAS are reactors with fixed biomass, in a way that the microorganisms adhere to the support media forming biofilm. In this way, this work had as objective to verify the occurrence of nitrifying microbiota in the set-off period of the system, established in 90 days. The presence of nitrifying bacteria was evaluated through polymerase chain reaction techniques (PCR) and technique of the most probable (NMP), seeking the quantifying of the microorganisms, specifically *Nitrosomonas* and *Nitrobacter*. The presence of these was confirmed by the results of the physical-chemical analysis and by the NMP technique. The counting of the bacteria of the *Nitrosomonas* gender for the 3 BAS presented a similar profile with values between $7,8 \times 10^1$ and $>1,6 \times 10^5$ (BAS1); $7,8 \times 10^1$ and $1,6 \times 10^5$ (BAS2) and $2,4 \times 10^1$ and $9,2 \times 10^4$ (BAS3). The same behavior was observed for bacteria of the *Nitrobacter* gender, which values vary between: $< 1,8 \times 10^1$ and $1,6 \times 10^4$ (BAS1); $1,8 \times 10^1$ and $2,4 \times 10^3$ (BAS2); $1,7 \times 10^1$ and $3,5 \times 10^3$ (BAS3). The counting of bacteria of the *Nitrobacter* gender presented themselves lower in all the reactors. The levels of nitrate evaluated in the effluent showed the occurrence of an increase in the concentration during the monitored period in all the reactors presenting the following values: 74 to 922 mg/L (BAS 1), 95 to 910 mg/L (BAS 2) and 33 to 910 mg/L (BAS 3), which can be related to the increase of the presence of nitrifying bacteria, according to the results of the NMP. The analysis of PCR, however, was harmed possibly by the presence of hindering substances making the amplification difficult. In this stage all the easily biodegradable organic matter had already been consumed by the anaerobic pre-treatment previously to the BAS, remaining in the affluent to the BAS only recalcitrant organic matter, which hindered the development of an adequate biofilm and possibly the

amplification of the DNA of the nitrifying bacteria present in the system. This research is part of two more ample projects, the Teaching Aid Program and the Scientific and Technological Research in Engineering (Pro-Engineering) and the Sinos Plan, which has as objective to structure the Basin Plan for the Sinos River. The importance of this work meets the necessity of developing alternatives which seek to improve the quality of the wastewater thrown in the Hydrographic Basin of the Sinos River.

Keywords: multi-stage submerge aerated biofilter, nitrification, PCR, NMP, landfill leachate.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1	Esgoto doméstico	21
2.2	Lixiviado de Aterro Sanitário de Resíduos Sólidos Urbanos	24
2.3	Processos biológicos de tratamento.....	28
2.4	Biofiltros aerados submersos	29
2.4.1	Tratamento de esgoto sanitário com BAS.....	30
2.4.2	Tratamento de esgoto sanitário consorciado com lixiviado de aterro sanitário	31
2.5	Biofilmes	32
2.6	Remoção biológica de nutrientes (nitrogênio e fósforo) em reatores com crescimento em leito fixo.....	35
2.6.1	Nitrificação	36
2.6.2	Desnitrificação	38
2.7	Métodos moleculares e microbiológicos para análises ambientais. 39	
2.7.1	Reação em Cadeia da Polimerase.....	41
2.7.2	Técnica do Número mais provável	43
3	OBJETIVOS	46
3.1	Objetivo geral.....	46
3.2	Objetivos Específicos	46
4	MATERIAIS E MÉTODOS	47
4.1	Localização do Experimento	47
4.2	Biofiltro Aerado Submerso Multi-estágio.....	48
4.2.1	Características	48
4.2.2	Funcionamento	52
4.2.3	Amostragem.....	53
4.3	Métodos moleculares e microbiológicos	55
4.3.1	Extração de DNA.....	56
4.3.2	Reação em cadeia da Polimerase (PCR)	57
4.3.3	Número mais provável (NMP) para bactérias nitrificantes.....	58

4.4 Métodos Físico-químicos	58
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	59
5.1 Resultados da extração	59
5.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	61
5.3 Número mais provável (NMP) para bactérias nitrificantes	65
6 CONCLUSÕES.....	74
7 RECOMENDAÇÕES	75
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76
APÊNDICES	83

1 INTRODUÇÃO

O nosso planeta vem sofrendo graves alterações climáticas e no equilíbrio dinâmico nos últimos anos. O homem cria, a cada dia, novas atividades produtivas que, em diferente escala, afetam o meio ambiente, provocando um fenômeno em cadeia, produzindo impacto sobre o local, repercutindo globalmente. Isto reflete, não somente ao ambiente, mas ao próprio homem, inclusive às gerações futuras a medida que esgota os recursos naturais. Faz-se necessário, portanto, a realização de projetos e ações urbanísticas que incorporem a conscientização sócio-ambiental, criando um novo sistema de desenvolvimento que materialize a sustentabilidade ambiental no Planeta.

A rápida urbanização nos países em desenvolvimento, que começou a tomar dimensões significativas a partir da década de 50, é uma das causas do aumento da quantidade e variedade de atividades produtivas. A geração excessiva de resíduos domésticos é, também, uma conseqüência desta urbanização. O fato de grande parte da população viver em áreas desprovidas de qualquer tipo de infra-estrutura básica e de serviços urbanos, agrava ainda mais a situação do meio ambiente, já que estes depositam seus resíduos diretamente ao solo, sem qualquer tratamento prévio.

O lixiviado, proveniente da disposição direta dos resíduos sólidos no solo, causa impacto ambiental ao se infiltrar no mesmo. Este efluente líquido, altamente tóxico, apresenta altas taxas de Demanda Química de Oxigênio (DQO), Nitrogênio Amoniacal (NA) e Fósforo (P). A quantidade de lixiviado gerado em aterros sanitários é decorrente da percolação de líquidos de origem externa, como águas de chuva e escoamento superficial, e da decomposição dos resíduos orgânicos, através das camadas do aterro. Devido às suas características, o lixiviado deve ser tratado antes de ser lançado no meio ambiente, evitando-se assim maiores riscos de contaminação do solo, das águas subterrâneas e superficiais, com sérias conseqüências para a saúde pública.

Os processos biológicos de tratamento geralmente são a melhor alternativa, tendo em vista, principalmente, a sua simplicidade e baixo custo operacional. O uso de Biofiltros Aerados Submersos Multi-estágios (BAS) é uma alternativa interessante para o pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios, pois estes têm a capacidade de realizar a nitrificação e desnitrificação no mesmo sistema. Além disso, estes reatores dispõem de materiais suporte, que viabilizam o aumento substancial da área disponível para formação do biofilme, alcançando-se assim concentrações altas de biomassa no reator.

Os biofilmes são comunidades bacterianas estruturadas, de múltiplas espécies, aderidas a uma superfície inerte (abiótica) ou viva (biótica), sendo considerados complexos ecossistemas microbiológicos. A disponibilidade de nutrientes, assim como as demais características específicas onde estão inseridas as bactérias, auxiliam na formação dos biofilmes. Segundo Miranda (2004) estudos indicam que os biofilmes são pontos estáveis de um ciclo biológico que inclui etapas principais: iniciação, maturação e manutenção.

A utilização de reatores nas estações de tratamento vem crescendo em decorrência de vários fatores: alta eficiência de remoção de matéria orgânica; tempo de detenção hidráulica relativamente baixo, demanda por pequenas áreas e volumes, entre outros. De acordo com Mendonça *et al.* (2001) a eficiência desses reatores, mediante as condições de operação impostas, está intimamente ligada ao desenvolvimento e atividade do biofilme. Desta forma, pretendeu-se acompanhar a evolução e as alterações microbiológicas no biofilme, especificamente no que tange a bactérias nitrificantes, buscando compreender melhor a dinâmica microbiológica envolvida no processo.

Na pesquisa objetivou-se estudar o comportamento da microbiota nitrificante através de um método de biologia molecular (Reação de Cadeia da Polimerase - PCR) e um método microbiológico clássico (Número Mais Provável - NMP), no período de partida do sistema, convencionado em 90 dias, visando verificar a presença de bactérias nitrificantes no sistema, comparando estes resultados com as análises físico-químicas. Pretendeu-se assim, avaliar a ocorrência de nitrificação a partir da presença das bactérias *Nitrosomonas* e

Nitrobacter no sistema BAS, o qual foi utilizado como pós-tratamento de efluente de reator anaeróbio alimentado com lixiviado de aterro sanitário consorciado com esgoto doméstico.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Esgoto doméstico

O lançamento de efluentes *in natura* nos recursos hídricos resulta, além de vários problemas sócio-ambientais, em impactos significativos sobre a vida aquática e o meio ambiente como um todo. Por exemplo, a matéria orgânica presente nos dejetos, ao entrar em um sistema aquático, leva a uma grande proliferação de bactérias aeróbias provocando o consumo de oxigênio dissolvido, que pode reduzir a valores muito baixos, ou mesmo extinguir, gerando impactos à vida aquática aeróbica. Têm-se como outros exemplos de impactos a eutrofização, a disseminação de doenças de veiculação hídrica, agravamento do problema de escassez de água de boa qualidade, desequilíbrio ecológico, entre outros (PIMENTA *et al.*, 2002).

A eutrofização representa um dos problemas mais sérios em relação à poluição das águas, causando uma deteriorização na aparência das águas límpidas, problemas de odores e baixo nível de oxigênio dissolvido. Figueiredo *et al.* (2007) define a eutrofização das águas como seu enriquecimento por nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo, levando ao crescimento excessivo das plantas aquáticas, com conseqüente desequilíbrio do ecossistema e progressiva degeneração da qualidade dos corpos lânticos. Um dos principais problemas relacionados à eutrofização é a proliferação de cianobactérias em detrimento de outras espécies aquáticas. O mesmo autor afirma que muitos gêneros de cianobactérias quando submetidas a determinadas condições ambientais podem produzir toxinas que chegam a ser fatais aos animais e aos seres humanos.

Os esgotos são compostos por constituintes físicos, químicos e biológicos. De acordo com Corssatto *et al.* (2009) a composição dos esgotos depende dos usos das águas de abastecimento e varia com o clima, os hábitos e as condições sócio-econômicas da população e da presença de efluentes industriais, infiltração de águas pluviais, idade das águas residuárias, etc. Os esgotos domésticos são constituídos aproximadamente de 99,9% de líquido e o

restante 0,1% de material sólido, contêm basicamente matéria orgânica e mineral (em solução e suspensão), assim como alta quantidade de bactérias e outros organismos patogênicos e não patogênicos.

Pimenta *et al.* (2002) afirma que é devido a essa fração de sólidos que ocorrem os problemas de poluição nas águas, trazendo a necessidade do tratamento. A fração inorgânica dos efluentes corresponde a 30% da quantidade de matéria sólida existente. Seus principais componentes são os detritos minerais pesados, sais e metais.

As doenças veiculadas pela água têm origem, principalmente, a partir de dejetos. Muitos microrganismos patogênicos são parasitas do intestino humano e são eliminados juntamente com as fezes. Por falta de adequados sistemas de esgotamento, muitas vezes os dejetos de origem humana alcançam mananciais superficiais ou subterrâneos. A água desses mananciais, quando utilizadas para consumo, pode resultar no acesso desses microrganismos ao organismo de uma pessoa, causando-lhe doenças (PIMENTA *et al.*, 2002).

As excreções humanas podem transmitir uma série de doenças, tais como: hepatite A, febre tifóide, cólera, amebíase, giardíase, verminoses e diarreias infecciosas. Por esse motivo, é fundamental o destino adequado do esgoto domiciliar, impedindo que ele entre em contato com o ser humano, águas de abastecimento, alimentos, vetores (moscas, baratas, ratos e outros). Os dejetos industriais são igualmente nocivos ao homem pela contaminação de produtos que o afetam diretamente e também os animais, tais como substâncias tóxicas, metais pesados, entre outros. Os dejetos industriais também lançam no meio ambiente substâncias que interferem no conjunto dos ecossistemas degradando o mesmo (CORSSATTO *et. al*, 2009).

No Brasil o tratamento de esgotos ainda é um grande desafio. De acordo com pesquisa do IBGE, em 2002 apud CORSSATTO *et al.* (2009), apresentada no Plano Nacional de Recursos Hídricos, 47,8% dos municípios brasileiros não coletam nem tratam os esgotos. Entre os 52,2% dos municípios que têm o serviço de coleta, apenas 20,2% tratam o esgoto coletado. Os municípios que não tratam o esgoto coletado (32%) possuem tubulações que o conduzem para despejo *in natura*, transformando rios e mares em focos para disseminação de

doenças, afetando a qualidade da água e o ecossistema ambiental. Conforme IHU (2007), na Bacia Hidrográfica do Rio dos Sinos são lançados, diariamente, cerca de 190.000 m³ de esgotos domésticos, sendo que apenas 5% destes são tratados.

Em função deste baixíssimo percentual de tratamento de esgoto, a alta quantidade de matéria orgânica que chega às águas sem tratamento nem sempre é biodegradada adequadamente. Uma parcela expressiva dos resíduos sólidos gerados na região é despejada no rio, contendo metais pesados e resíduos provenientes das indústrias. Haase (2003) afirma que estes fatores, quando não controlados, podem comprometer a qualidade da água que é utilizada para consumo humano. Por isso se faz necessária a realização de um Plano de Bacias para a Bacia Hidrográfica do Rio dos Sinos, que venha buscar metodologias de planejamento, manejo e recuperação. Este deve contemplar o desenvolvimento ambientalmente sustentável da região além de atender aos anseios da população.

O Plano de Bacia do Rio dos Sinos é uma das ferramentas de gestão do Sistema Estadual de Recursos Hídricos do RS. É um conjunto de ações a médio e longo prazos para se atingir a quantidade e qualidade das águas da região, de acordo com os usos que se pretende para o rio em cada trecho de seu leito. O Plano tem como objetivos o diagnóstico da situação atual da bacia dos Sinos, a identificação de obstáculos e problemas encontrados no decorrer da etapa de levantamento e diagnóstico, proposições de possíveis soluções para estes entraves, a organização e a hierarquização das ações e a formulação de um termo de compromisso para efetiva aplicação do estudo realizado (PLANO SINOS, 2007)

Segundo Seghezzeo *et al.* (1998) um sistema adequado de tratamento de águas residuais deve ser simples no projeto e eficiente na remoção de poluentes. O consumo de energia nestes sistemas deve ser baixo, reuso de água e de subprodutos valiosos devem ser maximizados, e o uso de equipamentos sofisticados deve ser mantido ao mínimo.

2.2 Lixiviado de Aterro Sanitário de Resíduos Sólidos Urbanos

Um dos grandes problemas da atualidade é a geração, tratamento e disposição final dos resíduos sólidos urbanos. Renou *et al.* (2007) afirmam que o gerenciamento dos resíduos sólidos urbanos (RSU) constitui hoje o maior problema ambiental, econômico e social do mundo, principalmente porque o volume de resíduos gerados está crescendo mais rápido que a população mundial. O grande crescimento populacional, o desenvolvimento industrial e tecnológico e a grande oferta de bens de consumo descartáveis são os principais responsáveis pelo aumento na produção destes resíduos. O crescimento da geração de resíduos sólidos e a sua concentração no espaço diminuem as chances de assimilação dos resíduos pelo meio ambiente, podendo interferir na qualidade da água, do solo e do ar.

De acordo com Castilhos Jr. (2006) as características físicas dos resíduos podem ser associadas a vários impactos negativos no meio físico, como alteração da paisagem pela poluição visual, a liberação de maus odores ou substâncias químicas voláteis pela decomposição dos resíduos. Além disso, materiais particulados podem ser dispersos pela ação do vento ou serem liberados junto com gases tóxicos quando os resíduos são queimados, por exemplo, para facilitar a catação de materiais recicláveis.

O IBGE (2000) afirma que há uma tendência de aumento da geração do lixo domiciliar per capita em proporção direta com o número de habitantes. Nas cidades com até 200.000 habitantes, pode-se estimar a quantidade coletada, variando entre 450 e 700g/hab.dia; já nas cidades com população acima de 200 mil habitantes, essa quantidade aumenta para a faixa entre 800 e 1200g/hab.dia. A quantidade de resíduos coletados diariamente é de 125.281 toneladas de lixo domiciliar, em todos os municípios brasileiros. Trata-se de uma quantidade expressiva de resíduos, para os quais deve ser dado um destino final adequado, sem prejuízo à saúde da população e sem danos ao meio ambiente.

Segundo Renou *et al.* (2007) estudos comparativos dos vários meios possíveis de eliminação dos RSU (aterro, incineração, compostagem etc.) têm

mostrado que o mais barato, em termos de exploração e custos de capital, é o Aterro Sanitário. A mesma conclusão também é compartilhada por Gomes e Gehling (2007), os quais afirmam que a forma mais amplamente utilizada para disposição de RSU é o Aterro Sanitário.

O Aterro Sanitário é uma forma de disposição final de RSU no solo, dentro de critérios de engenharia e normas operacionais específicas, proporcionando o confinamento seguro dos resíduos, normalmente, sendo recoberto com argila selecionada e compactada em níveis satisfatórios, evitando danos ou riscos a saúde pública e minimizando os impactos ambientais. A partir da disposição, e independentemente da composição dos resíduos, as populações de microrganismos existentes nos mesmos passam, em condições ambientais favoráveis, a multiplicar-se no ambiente do aterro, operando como um verdadeiro reator (BIDONE e POVINELLI, 1999).

Fleck (2003) afirma que os aterros de resíduos sólidos podem ser considerados reatores bioquímicos abertos, de operação contínua, nos quais predominam as condições anaeróbias e a interação de diferentes espécies microbianas presentes no ecossistema, atuando em diferentes fases metabólicas ao longo do volume útil disponibilizado.

Uma das desvantagens deste método, apontada por Fleck (2003) é a geração do lixiviado, um líquido escuro e fétido, com elevada instabilidade termodinâmica devido a presença de compostos não estabilizados, derivados da decomposição parcial da matéria orgânica, e com uma série de compostos naturais e sintéticos dissolvidos e dispersos.

O lixiviado é gerado como um resultado da percolação da água ou outros líquidos através dos resíduos em degradação, compactados no Aterro Sanitário. De maneira geral, segundo Gomes *et al.* (2006) a degradação dos RSU consiste na dissolução dos elementos minerais presentes, no transporte de partículas finas e do material solúvel pela água de percolação e, principalmente, na conversão biológica da matéria orgânica em formas solúveis e gasosas. Na ausência de oxigênio, bactérias facultativas e anaeróbias realizam o processo de degradação, que pode ser subdividido em quatro fases seqüenciais: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese.

Bagghi (2004) define lixiviado como um líquido contaminado que contém um grande número de materiais dissolvidos e suspensos. De acordo com Silva *et al.* (2004) as características dos lixiviados de aterro sanitário são o resultado da combinação de uma série de fatores complexos, incluindo propriedades do solo, condições climáticas, composição do lixo, idade e operação do aterro. Já Gomes *et al.* (2006) afirmam que as características físicas, químicas e biológicas dos lixiviados dependem do tipo de resíduo aterrado, do grau de decomposição, clima, estação do ano, idade do aterro, profundidade do resíduo aterrado e tipo de operação do aterro, entre outros. Para Matthews *et al.* (2009) estes processos físicos, químicos e biológicos inter-relacionados determinam a progressão do resíduo através dos estágios de degradação progressiva com implicações para a qualidade, quantidade e composição de qualquer lixiviado produzido.

As características do lixiviado de aterro sanitário, conforme Renou *et al.* (2007), são geralmente definidas em termos de Demanda Química de Oxigênio (DQO), Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), a razão DBO/DQO, pH, sólidos suspensos (SS), nitrogênio amoniacal ($\text{NH}_3\text{-N}$), nitrogênio total Kjeldahl (NTK) e metais pesados. A composição dos lixiviados provenientes de diferentes aterros sanitários apresenta uma grande variação, como mostra a tabela 1. Renou *et al.* (2007) atribui a seguinte idade para os aterros: Jovem: < 5 anos; Média idade: 5-10 anos e Velho: > 10 anos.

Tabela 1. Composição dos lixiviados provenientes de diferentes aterros sanitários

Local do Aterro	Coréia do Sul	Itália	Canadá	China (H.Kong)	Brasil	Coréia do Sul	França
Idade	jovem	jovem	média idade	média idade	velho	velho	velho
DQO	24400	10540	3210-9190	7439	3460	1409	100
DBO	10800	2300	-	1436	150	62	3
DBO/DQO	0,44	0,22	-	0,19	0,04	0,04	0,03
pH	7,3	8,2	6,9-9,0	8,22	8,2	8,57	7,7
SS	2400	1666	-	784	-	404	13-1480
NTK	1766	-	-	-	-	141	5-960
NH₃-N	1682	5210	-	-	800	1,522	0,2
Fe	76	2,7	1,28-4,90	3,811	5,5	-	26
Mn	16,4	0,04	0,028-1,541	0,182	0,2	0,298	0,13
Ba	-	-	0,006-0,164	-	-	-	0,15
Cu	0,78	-	-	0,12	0,08	0,031	0,005-0,04
Al	-	-	<0,02-0,92	-	<1	-	2
Si	-	-	3,72-10,48	-	-	-	<5

Todos os valores são em mg/L, exceto pH e a razão DBO/DQO (adimensional)

Fonte: adaptado de Renou *et al.* (2007)

Segundo Kjeldsen (2002) o lixiviado de aterro sanitário apresenta os seguintes poluentes, divididos em 4 grupos: (1) matéria orgânica dissolvida (ácidos graxos voláteis e compostos orgânicos mais refratários como ácidos húmicos e fúlvicos), (2) macrocomponentes inorgânicos (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , NH_4^+ , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Cl^- , SO_4^{2-} , HCO_3^-), (3) metais pesados (Cd^{2+} , Cr^{3+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+}) e (4) compostos orgânicos xenobióticos originários de resíduos domésticos e químicos presentes em baixas concentrações (hidrocarbonetos aromáticos, fenóis, pesticidas etc.).

De acordo com Moravia (2007) o lixiviado é originado da digestão da matéria orgânica sólida por ação de exo-enzimas produzidas pelos microrganismos envolvidos na degradação biológica, em combinação com a água de infiltração e umidade natural dos resíduos. A função dessas exo-enzimas é solubilizar a matéria orgânica para que possa ser assimilada pelas células bacterianas.

O mesmo autor afirma que o processo de geração do lixiviado pode ser influenciado pelos seguintes fatores: (1) climáticos (precipitação pluviométrica, evapotranspiração e temperatura); (2) hidrogeológicos (escoamento superficial, infiltração, topografia, geologia e recirculação do lixiviado); (3) pelas

características da camada de cobertura (umidade, vegetação, declividade); (4) características dos resíduos (composição gravimétrica, compactação, permeabilidade, granulometria, peso específico, etc.); (5) pelo método de impermeabilização do local.

2.3 Processos biológicos de tratamento

A forma biológica de tratamento reproduz, de certa maneira, os processos naturais que ocorrem em um corpo d'água após o lançamento de despejos. Os principais organismos envolvidos no tratamento dos esgotos são as bactérias, protozoários, fungos, algas e vermes, sendo as bactérias as mais importantes na estabilização da matéria orgânica (VON SPERLING, 1996).

O tratamento biológico consiste na remoção de poluentes dissolvidos e coloidais em águas residuárias urbanas e industriais, mediante ação de microrganismos que tem a capacidade de degradar a matéria orgânica a produtos finais estáveis. Estes podem ser aeróbios, com presença de oxigênio livre, ou anaeróbios, sem oxigênio.

O objetivo destes processos, que costumam ser os mais utilizados no tratamento de lixiviado, é alterar a forma dos constituintes orgânicos e aumentar a biodegradabilidade do lixiviado, pois apresentam elevada eficiência de remoção de matéria orgânica e inorgânica, associada a vantagens de facilidade operacional, flexibilidade no controle de variáveis de processo, simplicidade de equipamentos e facilidade na mudança de escala de produção.

Os principais processos biológicos de tratamento são: Oxidação biológica (aeróbia, como lodos ativados, filtros biológicos aeróbios e lagoas de estabilização; e anaeróbia, como reatores anaeróbios de fluxo ascendente, ou de manta de lodo, lagoas anaeróbias e tanques sépticos) ou Digestão de lodo (aeróbia e anaeróbia, fossas sépticas) (JORDÃO E PESSOA, 2005).

Neste trabalho foi utilizado o Biofiltro Aerado Submerso Multi-Estágio como processo biológico de tratamento, por isso, este reator será mencionado com maior ênfase a seguir:

2.4 Biofiltros aerados submersos

De acordo com Gonçalves *et al.* (2001) um biofiltro aerado submerso é constituído por um tanque preenchido com um material poroso, através do qual esgoto e ar fluem permanentemente. Na quase totalidade dos processos existentes, o meio poroso é mantido sob total imersão pelo fluxo hidráulico, caracterizando-os como reatores trifásicos compostos por: (1) fase sólida: constituída pelo meio suporte e pelas colônias de microrganismos que nele se desenvolvem, sob a forma de um filme biológico (biofilme); (2) fase líquida: composta pelo líquido em permanente escoamento através do meio poroso; (3) fase gasosa: formada pela aeração artificial e, em reduzida escala, pelos gases subprodutos da atividade biológica.

Os sistemas combinados anaeróbio/aeróbio vêm mostrando ser uma opção viável de implantação em situações encontradas em áreas tanto rurais como urbanas. Com relação aos tipos de combinações, ou arranjos, dentre os processos aeróbios que vêm sendo estudados para atuarem no pós-tratamento de efluentes de reatores com base em processos anaeróbios, a tecnologia dos Biofiltros Aerados Submersos (BAS) surge como uma promissora alternativa para o tratamento complementar de efluentes de reatores anaeróbios (MAGRI *et al.*, 2007). A possibilidade de realizar-se, no mesmo reator, a nitrificação e a desnitrificação, tem aumentado seu uso.

Gonçalves *et al.* (1997) afirmam que os BAS podem se constituir numa excelente opção de pós-tratamento de reatores UASB (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket*) devido a sua capacidade de remover os compostos solúveis e reter as partículas em suspensão no efluente anaeróbio no mesmo reator. A razoável eficiência do reator UASB na remoção de material carbonáceo, aliada a baixa produção de lodo e reduzido consumo de energia no estágio secundário de tratamento do BAS, são vantagens do sistema UASB+BAS.

As principais vantagens do uso dos biofiltros, segundo Jordão e Pessoa (2005) são: (1) apresentam dimensões reduzidas em planta (ocupam menor área que os processos de lodos ativados); (2) apresentam elevada eficiência mantendo resultados estáveis; (3) podem dispor de uma zona anóxica,

oferecendo nitrificação e desnitrificação e (4) podem operar sem decantador final, mantendo a concentração de DBO efluente menor que 30 mg/L e de SS inferior a 40 mg/L.

2.4.1 Tratamento de esgoto sanitário com BAS

Gonçalves *et al.* (1997) propuseram um estudo da associação destes dois reatores de alta taxa (UASB + Biofiltro (BF)) para o tratamento secundário. O principal objetivo do estudo foi o desenvolvimento de uma ETE compacta e robusta, adequada às regiões urbanas brasileiras, congregando as principais características em comum dos dois processos: compactidade, alta concentração de biomassa ativa no volume reacional, idades de lodo elevadas (resultando em pequena produção de lodo), resistência a choques hidráulicos e de carga orgânica e possibilidade de cobertura (evitando problemas com odores e impacto visual). Nos testes realizados com o reator UASB operando com um tempo de detenção hidráulica de 6 horas, as eficiências médias de remoção de SS, DBO₅ e DQO do conjunto foram respectivamente 94%, 96% e 91%. O efluente final, correspondendo ao efluente do BF, apresentou rigoroso estado de mineralização, com as seguintes características médias: SS = 10 mg/l, DBO₅ = 9 mg/l e DQO = 38 mg/l.

Hirakawa *et al.* (2002) estudaram o emprego de BAS no pós-tratamento de efluente de reator UASB, avaliando uma unidade em escala piloto recebendo esgoto sanitário. Buscou-se no experimento avaliar o comportamento dessa combinação no tocante à possibilidade de atendimento à legislação ambiental. A unidade piloto era constituída, basicamente, por um reator UASB de 604 L seguido por um BAS de fluxo descendente, com leito fixo com 32,7 L de volume aparente. Os resultados obtidos demonstram que o desempenho do conjunto foi satisfatório, com 91% de eficiência média na remoção de DBO₅₂₀ e concentração na faixa de 6 a 17 mg/L no efluente final. Constatou-se, também, que o BAS foi capaz, durante determinado período do experimento, de promover a remoção de nitrogênio amoniacal com eficiência suficiente para manter concentrações inferiores a 5 mg/L no efluente final.

Magri *et al.* (2007) realizaram um experimento com aplicação de dois BAS, preenchidos com cascas de ostras (BAS₁) e com tampas PET (BAS₂), no tratamento de efluentes de um tanque séptico modificado, visando a avaliação do sistema, em termos de remoção de matéria carbonácea e nutrientes. Neste trabalho os autores observaram excelentes resultados na configuração utilizando tanque séptico modificado (TSM) + BAS₁, obtendo remoção de DQO_t de aproximadamente 98% e SSt de 99,8%. Já o BAS₂ não obteve resultados tão satisfatórios na remoção de SS_t e DQO_t quanto o BAS₁, em virtude do constante desprendimento da biomassa. Entretanto observou-se a ocorrência de nitrificação, destacando-se a melhor eficiência do BAS₁ com 100% de nitrificação.

2.4.2 Tratamento de esgoto sanitário consorciado com lixiviado de aterro sanitário

O tratamento combinado de lixiviado de aterro sanitário com esgoto doméstico nas ETEs vem sendo adotado em diversos países como forma de reduzir os custos de implementação e operação do aterro, onde o custo de tratamento do lixiviado pode atingir valores bastante elevados, sobretudo por continuar a se fazer necessário mesmo após décadas de encerramento do aterro.

Alguns requisitos são necessários para a sua viabilidade: o transporte do lixiviado até a ETE, a capacidade da estação em assimilar esse efluente, a compatibilidade do processo com as características desse material e a possibilidade do manejo do provável aumento de produção de lodo.

Henry (1985) sugere que a alternativa da adição de lixiviado às estações de tratamento de esgotos deve ser adotada quando possível. Segundo o autor, estudos demonstraram que lixiviados altamente concentrados (DQO de 24.000 mg/L), quando combinados até 2 % em volume com águas residuárias municipais, não causaram alterações significativas na performance das estações de tratamento.

Pode-se notar, dos trabalhos publicados na literatura, que a eficiência do tratamento combinado reside no estabelecimento de faixas de carga carbonácea e nitrogenada do lixiviado a ser misturado com o efluente doméstico, em função das características físico-químicas de projeto e das concentrações tipicamente observadas em esgotos domésticos.

Cossu *et al.* (1998) estudaram a remoção de nutrientes no tratamento combinado em escala de laboratório. Utilizaram duas seqüências de reatores anaeróbios, anóxicos e aeróbios. Uma das seqüências foi alimentada com esgoto e a outra com mistura de 1 a 5% de lixiviado. A eficiência de remoção de nutrientes, nitrogênio e fósforo, e a velocidade de nitrificação/desnitrificação foram maiores na seqüência alimentada com a mistura de esgoto e lixiviado. Foi observado também que a mistura esgoto/lixiviado não causou problemas de inibição e instabilidade nos reatores.

Não foram encontradas na literatura pesquisas envolvendo o tratamento de lixiviado consorciado com esgoto sanitário utilizando BAS multi-estágio como processo de tratamento. Em função disto este projeto de pesquisa torna-se relevante, pois vem colaborar para ampliar o entendimento sobre o tratamento conjugado de Lixiviado de aterro sanitário e esgoto doméstico, utilizando uma nova configuração de BAS.

2.5 Biofilmes

Nicolella *et al.* (2000) define biofilme como uma estrutura complexa de células e produtos extracelulares, como polímeros, no qual se formam espontaneamente grânulos densos ou crescem aderidos a uma superfície sólida estática ou ainda em uma superfície sólida suspensa. Melo (2005) afirma que a maioria dos biofilmes são predominantemente matrizes heterogêneas de células e polímeros, distribuídos aleatoriamente ao longo de uma estrutura tridimensional e rodeado por canais de água que se estendem do interior para a superfície do biofilme. Em geral, o teor de água de biofilmes alcança de 90 a 99% da massa total úmida.

Conforme Giustina (2009) a estruturação básica e o mecanismo de desenvolvimento de um biofilme é resultado da sobreposição de culturas puras de diversas proteobactérias e da mistura de populações de diferentes ecossistemas sobre um suporte sólido. De acordo com Miranda (2004) estudos indicam que os biofilmes são pontos estáveis de um ciclo biológico que inclui três etapas principais: iniciação, maturação e manutenção. As bactérias parecem iniciar a formação e o desenvolvimento de um biofilme como resposta a uma característica específica do meio ambiente em que estão inseridas, como por exemplo, a disponibilidade de nutrientes. A figura 1 mostra o desenvolvimento do biofilme.

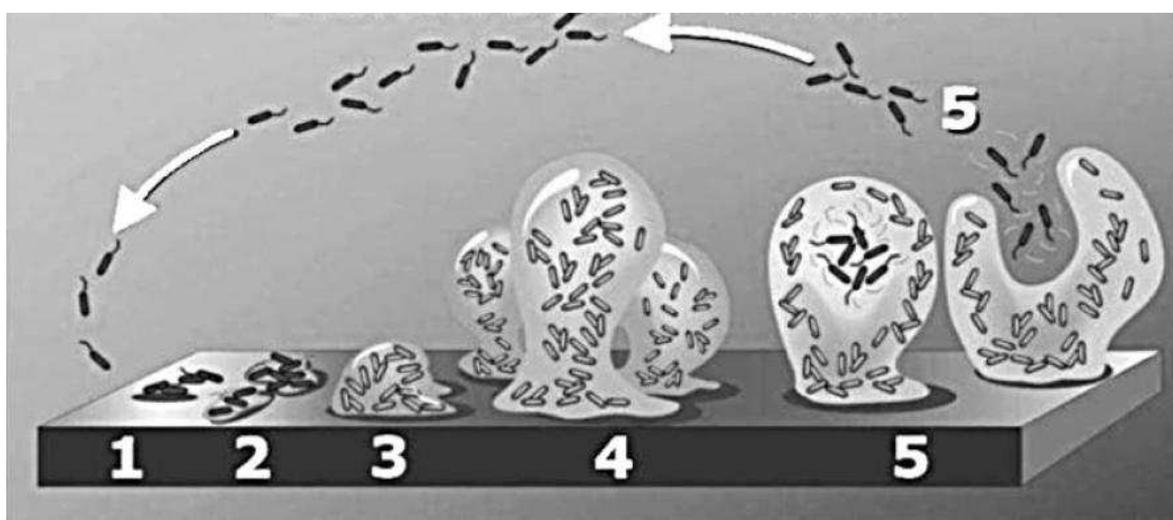


Figura 1: Diagrama mostrando o desenvolvimento de um biofilme como um processo de cinco estágios. Fase 1 – aderência inicial das células ao suporte sólido; Fase 2 – produção de exopolissacarídeos, aumentando a adesão das células; Fase 3 – desenvolvimento da arquitetura do biofilme; Fase 4 – maturação da arquitetura do biofilme; Fase 5 – dispersão das células a partir do biofilme maduro.

Fonte: adaptado de Stoodley *et al.* (2002)

A cinética envolvida nas reações que ocorrem em um biofilme é complexa, já que o suprimento de substrato para o interior do agregado de bactérias é um processo limitado pela difusão por meio deste, sendo governado pelo gradiente de concentração que se desenvolve através do

biofilme. Desta forma, a concentração de substrato à superfície do biofilme decresce conforme se direciona para regiões mais próximas ao meio suporte (fundo do biofilme), conforme o substrato vai sendo consumido e se difunde pelas camadas do biofilme (GIUSTINA, 2009).

O tipo e forma dos meios suporte interferem grandemente na aderência do biofilme ao substrato, o que influencia no desempenho do mesmo. Conforme Ortega *et al.* (2001) a utilização de suportes capazes de imobilizar a biomassa ativa permite aumentar o tempo médio de permanência desta no interior dos reatores, favorecendo o regime de operação contínua e proporcionando sistemas mais estáveis, controláveis e com elevada eficiência de degradação. Fatores como rugosidade, porosidade e tamanho dos poros afetam a velocidade de colonização microbiana no suporte. Sabe-se que o uso de suportes porosos favorece o crescimento do biofilme, reduzindo o tempo de partida do reator.

Os biofilmes têm um papel importante nos reatores com biomassa fixa, pois os processos metabólicos de conversão ocorrem no interior deles. O transporte de substratos se realiza através de processos de difusão, inicialmente através do filme líquido na interface líquido/biofilme e, em seguida, através do próprio biofilme. Os produtos das reações de oxiredução são transportados no sentido inverso, ao exterior do biofilme. Tanto o substrato doador quanto o receptor de elétrons devem penetrar o biofilme para que a reação bioquímica se processe.

No biofilme, os componentes necessários para o desenvolvimento bacteriano como matéria orgânica, oxigênio e micro nutrientes, são adsorvidos à sua superfície. Após aderência, são transportados pelo processo de difusão, inicialmente através do filme líquido, na interface líquido/biofilme e, em seguida, transportados por difusão através do próprio biofilme e metabolizados pelos microrganismos. Sólidos de natureza coloidal ou suspensa necessitam antes ser hidrolizados em moléculas menores. Os produtos finais, obtidos das reações de oxiredução são transportados no sentido inverso, ao exterior do biofilme (CAMPOS, 2006).

2.6 Remoção biológica de nutrientes (nitrogênio e fósforo) em reatores com crescimento em leito fixo

Reatores com biomassa fixa são aqueles que dispõem de um meio suporte para a fixação dos microrganismos em sua superfície, formando biofilmes, e desta maneira se mantêm dentro do reator. À medida que os microrganismos se desprendem do biofilme, eles crescem no ambiente líquido e, normalmente, tem um papel menor na remoção do substrato (RITTMANN e McCARTY, 2001).

As vantagens dos sistemas de crescimento em leito fixo (biofilmes) sobre os de crescimento suspenso incluem: (1) menor produção de excesso de biosólidos; (2) alta idade do lodo, beneficiando microrganismos de crescimento lento, como as nitrificantes; (3) ocorrência de desnitrificação em zonas anóxicas em regiões mais profundas do biofilme; (4) grande estabilidade do processo. Como desvantagens dos sistemas de biofilmes destacam-se: (1) custo de material suporte; (2) risco de entupimento em filtros com leito de pedra britada ou areia; (3) retrolavagem requerida em BAS.

O conteúdo de nitrogênio dos esgotos e lixiviados brutos encontra-se basicamente nas formas orgânica (proteínas, aminoácidos, uréia, etc.) e amoniacal, proveniente das reações bioquímicas que as formas orgânicas sofrem em meio anaeróbio. De acordo com Araújo Jr. (2006) o processo básico ou convencional de remoção biológica do nitrogênio nas águas residuárias se dá pelas etapas de amonificação, assimilação, nitrificação e desnitrificação. O processo de amonificação consiste na conversão biológica de materiais orgânicos presentes nas águas residuárias, tais como proteínas, aminoácidos e uréia em nitrogênio amoniacal. O nitrogênio amoniacal pode se apresentar na forma de amônia ($N-NH_3$) ou íon amônio ($N-NH_4^+$), sendo que as proporções de cada composto dependem do pH e da temperatura da água residuária.

Este processo de remoção baseia-se no ciclo natural da transformação do nitrogênio, isto é, promove a nitrificação por meio de organismos autotróficos, em ambientes aeróbios, e a desnitrificação por organismos heterotróficos, em ambientes anóxicos.

2.6.1 Nitrificação

A nitrificação é tradicionalmente definida como a oxidação do nitrogênio amoniacal (N-NH_4^+) a nitrato (N-NO_3^-) via nitrito (N-NO_2^-) utilizando o oxigênio molecular (O_2) como acceptor final de elétrons (ARAÚJO JR., 2006). As bactérias nitrificadoras são extremamente susceptíveis a uma série de substâncias inibidoras. Entretanto, conforme Ferreira (2000), elas podem adaptar-se a diversos inibidores desde que os mesmos estejam constantemente presentes no meio, caso contrário a inibição poderá ocorrer com o metabolismo celular ou com as reações oxidativas.

As variações de pH, temperatura e concentração de nitrogênio amoniacal influenciam na atividade e velocidade de crescimento das bactérias nitrificantes. De acordo com Fleck (2003) a faixa ótima de pH para a nitrificação situa-se entre 7,5 e 8,6, embora em sistemas aclimatados a pH inferiores possa haver sucesso na nitrificação. Von Sperling (1997) reporta ocorrência de nitrificação entre 5 e 50°C, identificando porém a faixa 25-36°C como ótima para o processo.

A amônia é um dos compostos nitrogenados responsáveis pela eutrofização dos corpos d'água, sendo esta um composto tóxico presente em diversos efluentes industriais e domésticos (ARAÚJO, 2009). Na nitrificação a amônia é convertida, em condições aeróbias, a nitrato. Isoladamente a nitrificação não remove nitrogênio da água residuária, mas remove sua demanda de oxigênio. O processo ocorre em duas fases: conversão de amônia a nitrito através da ação de bactérias do gênero *Nitrosomonas* e conversão do nitrito a nitrato por ação dos organismos do gênero *Nitrobacter* (FLECK, 2003), como mostra o esquema da figura 2.

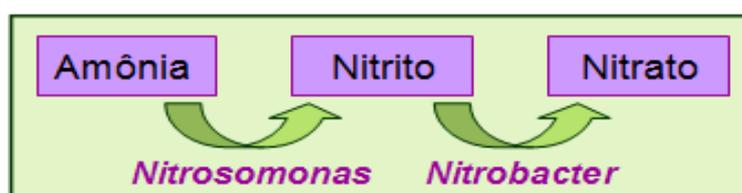


Figura 2: Esquema de nitrificação através dos microrganismos *Nitrosomonas* e *Nitrobacter*.

As reações podem ser assim descritas (METCALF & EDDY, 2003):

- Conversão de nitrogênio amoniacal à nitrito:



- Conversão de nitrito a nitrato:



- Reação de oxidação total:



Baseado na reação de oxidação total, verifica-se que o oxigênio requerido para completa oxidação da amônia é 4,57g O₂/g N oxidado, sendo 3,43 g O₂ /g para a produção de nitrito e 1,14 g O₂/g NO₂ oxidado. Porém, quando a síntese é considerada, o montante de O₂ necessário é menor do que 4,57g O₂/g N (METCALF & EDDY, 2003).

Os microrganismos envolvidos no processo de nitrificação são autotróficos quimiossintetizantes (ou quimioautótrofos), para os quais o gás carbônico é a principal fonte de carbono, e a energia é obtida através da oxidação de um substrato inorgânico, como a amônia, a formas mineralizadas. As taxas de crescimento dos organismos autotróficos nitrificantes, sobretudo do gênero *Nitrosomonas*, são lentas, inferiores às taxas dos microrganismos responsáveis pela estabilização da matéria carbonácea (VON SPERLING, 1997).

Ma *et al.* (2009) realizaram a remoção de nutrientes via nitrito. É demonstrado que o “via nitrito” pode ser alcançado de forma repetida e confiável, com mais de 95% dos compostos de nitrogênio oxidado no final da zona aeróbia. O “via nitrito” melhorou a remoção do nitrogênio total (NT) cerca de 20% em comparação com o “via nitrato” e também reduziu os custos de aeração em 24%. A remoção de nitrogênio via nitrito de águas residuárias domésticas foi atingido com sucesso usando um processo de tratamento contínuo de pré-desnitrificação. Foi demonstrado que o “via nitrito” pode ser

atingido controlando o oxigênio dissolvido (OD) na zona aeróbia em níveis baixos (0,4-0,7 mg/L) e destruído pelo aumento do OD para 2–3 mg/L.

2.6.2 Desnitrificação

A conversão biológica de compostos oxidados de nitrogênio como nitrito e nitrato em compostos mais reduzidos como óxido nítrico (NO), óxido nitroso (N₂O) e gás nitrogênio (N₂) é denominada desnitrificação (ARAÚJO JR., 2006). O processo convencional ocorre em condições anóxicas, onde uma quantidade suficiente de matéria orgânica é utilizada como doadora de elétrons para a conversão de nitrito a gás nitrogênio (N₂) (GIUSTINA. 2009).

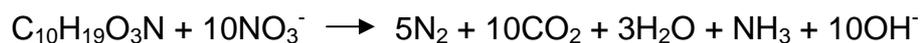
A desnitrificação corresponde à redução dos nitratos a nitrogênio gasoso. Ela ocorre necessariamente a partir do nitrato, e não da amônia, sendo esta a razão de que no tratamento de esgotos a desnitrificação deve ser precedida da nitrificação (VON SPERLING, 1997). As bactérias desnitrificantes são comuns entre as Proteobactérias Gram-Negativas, tais como: *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Paracoccus* e *Thiobacillus*. Algumas bactérias Gram-Positivas, incluindo *Bacillus*, podem desnitrificar igualmente como algumas Archaea halofílicas, tal como *Halobacterium* (RITTMANN e McCARTY, 2001).

A desnitrificação, que ocorre em condições anóxicas (ausência de oxigênio e presença de nitrato) envolve a oxidação biológica de muitos substratos orgânicos no tratamento de resíduos, usando nitrato ou nitrito como acceptor de elétrons ao invés de oxigênio, reduzindo-o a nitrogênio gasoso. Nesta há uma economia de alcalinidade do meio e um aumento da capacidade tampão do mesmo. Na ausência de Oxigênio dissolvido (OD) ou sob concentrações limitadas de OD, a enzima nitrato redutase no transporte de elétrons da cadeia respiratória é induzido, e ajuda a transferir hidrogênio e elétrons para o nitrato como o acceptor final de elétrons. A reação de redução do nitrato envolve os seguintes passos de redução de nitrato para nitrito, para óxido nítrico, óxido nitroso e para gás nitrogênio (METCALF & EDDY, 2003):



Conforme Metcalf & Eddy (2003), nos processos de remoção biológica de nitrogênio, o doador de elétrons é tipicamente um dos três tipos: (1) DQO biodegradável solúvel na água residuária afluente, (2) DQO biodegradável solúvel produzida durante a decadência endógena, (3) fonte exógena tal como metanol ou acetato. As reações estequiométricas para os diferentes doadores de elétrons são mostradas a seguir:

Água residuária:



Metanol:



Acetato:



As condições para se atingir uma efetiva nitrificação/desnitrificação via nitrito são (Yoo *et al.*, 1999): (1) usar processo simultâneo e/ou alternado de nitrificação e desnitrificação em um mesmo reator; (2) manter baixas concentrações de OD durante a aeração; (3) manter organismos em contato com água residuária afluente em condições de suprimento de oxigênio deficiente, para induzir contato com altas concentrações de amônia livre ou hidroxilamina livre; (4) elevar pH; (v) adicionar hidroxilamina ao reator; (5) manter a temperatura do reator próxima a 25°C.

A desnitrificação ocorre em uma ampla faixa de temperaturas (0-50°C), sendo a faixa ótima 35-50°C (VON SPERLING, 1997). A faixa de pH própria para o processo encontra-se entre 7,0 e 8,0 (METCALF & EDDY, 1991).

2.7 Métodos moleculares e microbiológicos para análises ambientais

A caracterização de comunidades microbianas do ambiente, de modo geral, é limitada devido à dificuldade em cultivar estes microrganismos. As técnicas convencionais de cultivo apresentam algumas restrições quanto à

realização, pois se sabe que a diversidade das bactérias é maior que a de qualquer outro grupo de organismos. No entanto, os meios de cultivo são seletivos a grupos particulares, onde a maioria das culturas, conforme Sanz e Köchling (2007) tendem a favorecer o crescimento de alguns grupos de microrganismos, enquanto que outros grupos importantes não crescem adequadamente. Somada a esta idéia, Malik *et al.* (2008) afirmam que técnicas moleculares proporcionam uma ótima oportunidade de superar a necessidade de cultivar e tem, portanto, aumentado imensamente o conhecimento da diversidade microbiana e funcionalidade no meio ambiente.

As técnicas de biologia molecular permitem a identificação de populações específicas de microrganismos em seu habitat nativo sem a necessidade de isolá-lo o que, conforme Sanz e Köchling (2007), tem auxiliado nos estudos de ecologia microbiana, dando origem a várias novas aplicações em numerosos campos de pesquisa. No tratamento de efluentes as técnicas de ecologia molecular microbiana têm sido aplicadas principalmente no estudo de lodo ativado e biofilmes que crescem em sistemas de tratamento aeróbio.

Entre os diferentes métodos moleculares utilizados no estudo de microrganismos do ambiente estão: Análise restrita do DNA ribossomal amplificado (ARDRA), onde os fragmentos do rDNA 16S amplificados são digeridos em sítios específicos com enzimas de restrição e a digestão resultante é separada por gel de eletroforese; análise intergênica do ribossomo (RISA), que amplifica a região entre o 16S e o 23S do rDNA; eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE), que separa os fragmentos do rDNA amplificado da mesma extensão, mas com diferentes composições de pares de base; Hibridização *in situ* com ondas fluorescentes (FISH), método utilizado para quantificar a presença e relativa abundância de populações microbianas em uma amostra (Malik *et al.* 2008).

Outra técnica molecular bastante utilizada é a reação em cadeia da polimerase (PCR), cuja amplificação depende da extração e purificação do ácido nucléico de rendimento e qualidade suficientes das amostras ambientais (Malik *et al.* 2008). Para a detecção de organismos ou genes de ambientes contaminados, duas técnicas de PCR são geralmente utilizadas: PCR simples

e PCR múltiplo. O PCR simples usa um par de *primers* em uma reação de amplificação única. Já o PCR múltiplo, conforme Markoulatos *et al.* (2002), utiliza múltiplos pares de primers simultaneamente para amplificar vários genes em uma única reação. A vantagem deste método, conforme Gilbride *et al.* (2006), é que um tempo e esforço considerável podem ser economizados quando analisados diferentes regiões alvo.

No entanto, a eficiência de amplificação do PCR pode ser severamente dificultada pela presença de substâncias inibitórias que são extraídas com ácidos nucléicos, que incluem ácidos húmicos, matéria orgânica e partículas de argila (Atlas e Bartha, 1988; Kirk *et al.* 2004).

2.7.1 Reação em Cadeia da Polimerase

A tecnologia da reação de polimerase em cadeia (PCR) tem a habilidade de produzir milhões de cópias de uma porção do gene desejado, o gene todo ou grupos do gene, com grande fidelidade, entre 3 e 4 horas (MALIK *et al.*, 2008). Ela foi concebida por Kary Mullis em meados da década de 80. Desde sua concepção, esta tecnologia causou uma verdadeira revolução na biologia, tanto na pesquisa visando o entendimento de processos biológicos fundamentais, como nas áreas aplicadas, envolvendo diagnósticos e melhoramento genético de plantas e animais domésticos (ANTONINI, 2004).

Este ensaio baseia-se no processo de replicação de DNA *in vitro*. Envolve 3 etapas: desnaturação, anelamento e extensão. A fita dupla do DNA alvo é desnaturada através da elevação da temperatura para 92 a 95°C. Na etapa de anelamento, a temperatura é rapidamente reduzida para 35 a 60°C, dependendo essencialmente do tamanho e sequência do *primer* utilizado, permitindo a hibridização DNA-DNA de cada *primer* com as sequências complementares que flanqueiam a região alvo (ANTONINI, 2004). Primers são os iniciadores, são segmentos de ácidos nucléicos que se hibridizam com a fita complementar de DNA complementando o mesmo. Eles são necessários para o início da replicação do DNA.

Em seguida, a temperatura é elevada para 72°C para que a enzima DNA polimerase realize a extensão a partir de cada terminal 3' dos primers. Esta extensão envolve a adição de nucleotídeos utilizando como molde a seqüência alvo, de maneira que uma cópia desta seqüência é feita no processo. Este ciclo é repetido por algumas dezenas de vezes. Uma vez que a quantidade de DNA da seqüência alvo dobra a cada ciclo, a amplificação segue uma progressão geométrica de maneira que, depois de apenas 20 ciclos, são produzidos mais de um milhão de vezes a quantidade inicial de seqüência alvo (ANTONINI, 2004).

A Figura 3 mostra um esquema de como ocorre a técnica de PCR.

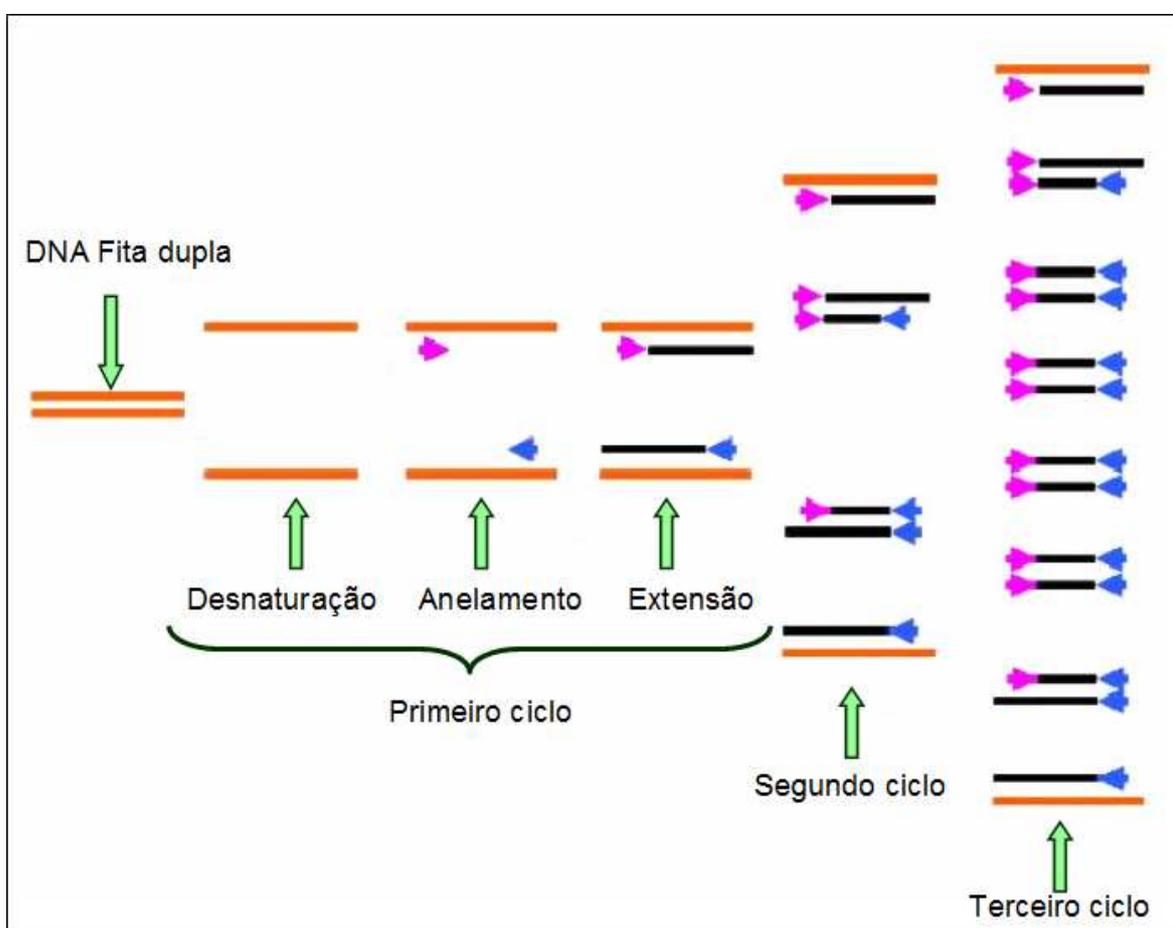


Figura 3: Esquema da replicação do DNA pela realização da PCR

Nos estudos de ecologia microbiana a PCR é amplamente empregada para caracterizar comunidades de microrganismos pois, como já mencionado, muitos não são cultiváveis, sendo este um método que permite acessar a

diversidade de bactérias. O gene mais empregado nestes estudos é o 16S rDNA. No entanto, genes de enzimas, como a metano monooxigenase que oxida metano a metanol no ambiente e caracteriza a presença e atividade de certos gêneros (Atlas e Bartha, 1988). Além disto, a PCR direcionada para um determinado gene permite a clonagem do mesmo, para posteriormente o sequenciamento do material (Sanz e Köchling, 2007).

Mehmood *et al.* (2009) realizou análises de PCR e subseqüentes análises de DGGE no DNA usando o gene 16S rRNA, para analisar o tratamento microbiano de lixiviado de aterro sanitário utilizando lagoas aeradas. Foram utilizadas 4 lagoas no tratamento. As análises de DGGE mostraram que os valores da diversidade bacteriana nas lagoas 1 e 4 eram similares, mas diferente dos valores obtidos nas lagoas 2 e 3.

2.7.2 Técnica do Número mais provável

Conforme Araújo (2009) as bactérias nitrificantes, tendo como principais representantes àquelas pertencentes aos gêneros *Nitrosomonas* e *Nitrobacter* são responsáveis, respectivamente, pela oxidação do íon amônio (NH_4^+) à nitrito e posteriormente, oxidação do nitrito à nitrato. Tendo em vista a importância ambiental destes microrganismos, torna-se relevante a quantificação dos mesmos, inclusive para monitorar sistemas biológicos de tratamento desenvolvidos para promover a nitrificação.

Tradicionalmente, as bactérias nitrificantes vêm sendo quantificadas através do método convencional dependente de cultivo (tubos múltiplos), apesar da possibilidade desse método subestimar essa população devido às características dessas bactérias de formarem aglomerados, e/ou das diferentes exigências de cultivo entre as diversas espécies de oxidadoras de amônia. A metodologia dos tubos múltiplos é também conhecida como método do Número Mais Provável (NMP), sendo esta uma técnica de contagem baseada na estatística dos valores dos resultados obtidos. O método do NMP permite estimar a densidade da população microbiana sem uma contagem individual das células ou colônias (ARAÚJO, 2009).

A técnica de NMP vem sendo bastante utilizada para detectar a abundância de bactérias oxidadoras de amônia em amostras líquidas, especialmente em serviços públicos de água (HOEFEL *et al.*, 2005). Weagant e Feng (2002) afirmam que o NMP também é amplamente utilizado para estimar níveis de *Escherichia coli* em águas e alimentos. De acordo com Philips (2008) este também se apresenta como um método bastante utilizado na quantificação de populações. Entretanto os métodos de atividades fisiológicas e as técnicas de biologia molecular têm sido amplamente utilizados para o estudo da microbiologia de sistemas de tratamento de efluentes. Estes permitem o estudo da composição, atividade, quantidade e diversidade das bactérias presentes na amostra.

Para enumerar *Nitrosomonas*, bactéria oxidadora de amônia, as diluições da amostra devem ser inoculadas em meio inorgânico contendo o íon amônio como fonte de nitrogênio. Caso estejam presentes *Nitrosomonas* na forma viável no inoculo haverá crescimento e o nitrito será produzido. Porém, é necessário não ter produção de nitrito nos tubos não inoculados (controle). Mesmo que o nitrito não seja encontrado, antes de afirmar que o teste é negativo, é necessário fazer o teste para nitrato, porque as bactérias oxidantes de nitrito convertem o nitrito produzido pelas *Nitrosomonas* em nitrato. Portanto, no caso do nitrato ser encontrado, indica também a presença de *Nitrobacter*, bactéria nitrito-oxidante, mas, novamente, os testes nos tubos controle devem ser negativos. Na enumeração de *Nitrobacter*, o meio empregado deve ser livre de matéria orgânica e como fonte de energia é utilizado nitrito. A presença de *Nitrobacter* é dada pelo teste negativo (ausência) de nitrito e teste positivo nos tubos não inoculados (KIELING, 2004).

Hoefel *et al.* (2005) utilizaram a técnica de NMP para enumerar a quantidade de bactérias oxidadoras de amônia, associadas com a perda de cloramina residual em um sistema de água potável. Estes ensaios foram comparados com os de Extração de DNA, PCR utilizando o 16S rRNA, DGGE e FISH. Estas técnicas revelaram uma disparidade entre a abundância das bactérias oxidantes de amônia e o número de bactérias detectadas pelo ensaio de NMP.

Carey *et al.* (2006) realizaram ensaios de NMP para verificar a existência de oocistos como contaminantes de águas públicas. As análises de NMP foram acopladas ao PCR (NMP-PCR) e ao método de detecção de focos (NMP-FDM). Os resultados mostraram que a relação NMP-PCR foi o melhor método para a detecção de doenças infecciosas com oocistos de *C. parvum* em amostras ambientais de água.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estudar a presença da microbiota nitrificante na etapa de partida de três Biofiltros Aerados Submersos (BAS) multi-estágio, utilizados como pós-tratamento de efluente de reator anaeróbio, alimentado com mistura de lixiviado de aterro sanitário e esgoto doméstico.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a presença de bactérias nitrificantes por PCR e pela técnica do número mais provável (NMP), visando a quantificação dos microrganismos, especificamente *Nitrosomonas* e *Nitrobacter*;
- Estudar a existência de relações entre a eficiência de remoção de nutrientes, especificamente nitrogênio amoniacal, e a presença de organismos nitrificadores no biofilme circulante do sistema BAS.
- Verificar a existência de relação entre os resultados obtidos nas análises moleculares (PCR) e microbiológicas (NMP) com relação a presença de bactérias do gênero *Nitrosomonas* e *Nitrobacter*.
- Avaliar a influência dos diferentes meios suporte (tampas e gargalos de garrafa PET, anéis *Pall* e brita nº 4) de cada BAS sobre a microbiota nitrificante.
- Estabelecer um protocolo de extração adequado para as amostras provenientes do Sistema BAS instalado na ETE Canoas/CORSAN, alimentado com esgoto doméstico e lixiviado de aterro sanitário.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Localização do Experimento

O experimento foi desenvolvido na Estação de Tratamento de Esgotos (ETE) Canoas-CORSAN, situada na cidade de Canoas, RS. O sistema experimental é composto de um reator anaeróbio do tipo Digestor Anaeróbio de Fluxo Ascendente (DAFA), seguido de três biofiltros areados submersos multi-estágio (BAS 1, 2 e 3), como unidades de pós-tratamento do efluente gerado no sistema anaeróbio, conforme pode ser observado na Figura 4.

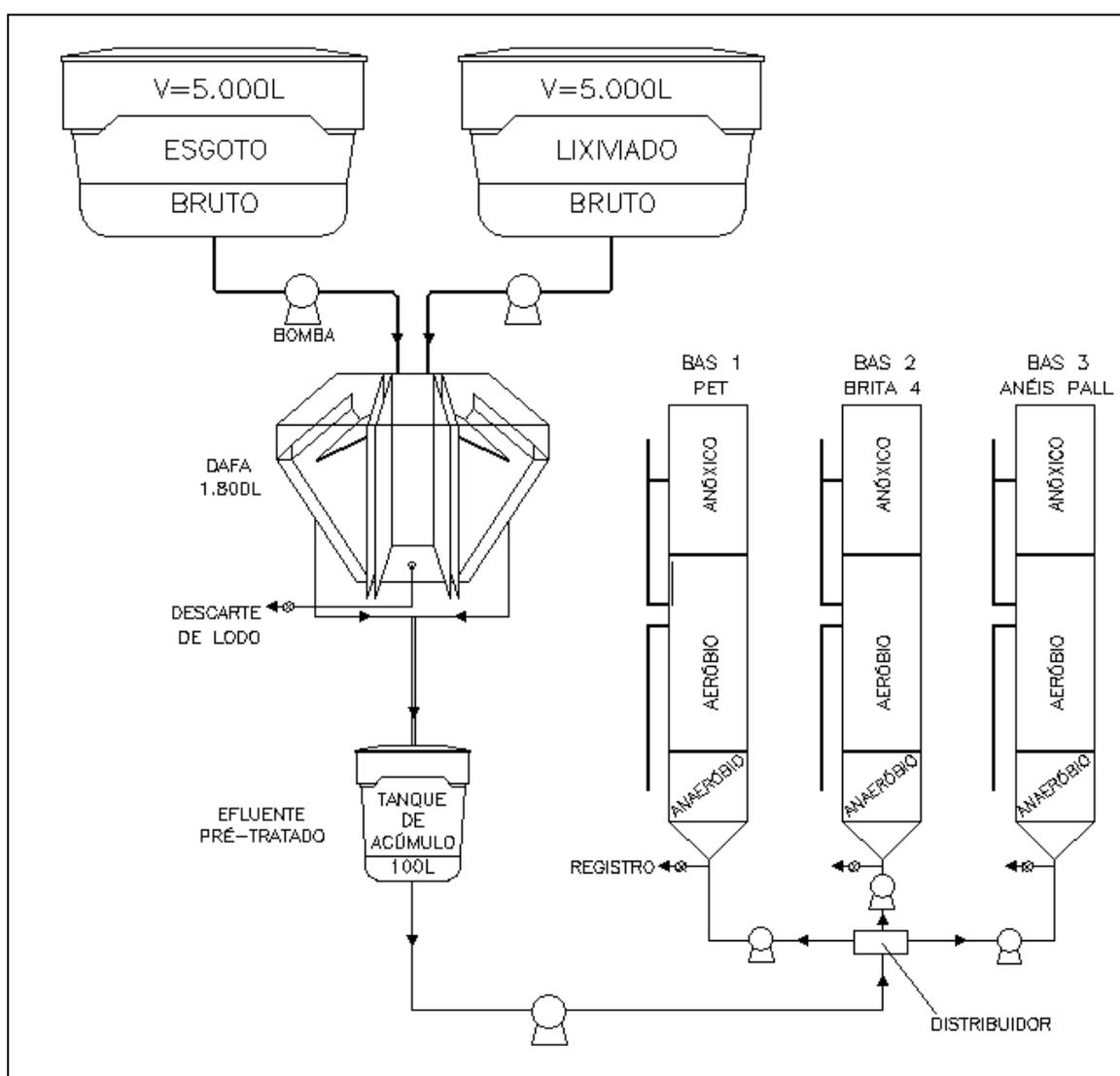


Figura 4: Fluxograma de funcionamento do sistema experimental

Este projeto é parte de um experimento maior apoiado pelo Programa de Apoio ao Ensino e a Pesquisa Científica e Tecnológica em Engenharias (Pró-Engenharias) tendo como instituições participantes, o Instituto de Pesquisas Hidráulicas (IPH) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e o Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil da Universidade do Vale do Rio dos Sinos (UNISINOS).

A ETE Canoas-Corsan atualmente opera com cerca de 40% da sua capacidade instalada, correspondendo a uma vazão atual afluyente de aproximadamente 60 L/s. A esta são somados cerca de 300 m³/dia de efluentes externos, compostos de lixiviado de aterro sanitário, proveniente dos aterros de Gravataí, Porto Alegre, Alvorada e Canoas, e efluentes de banheiros químicos e lodos de fossa séptica, correspondendo a aproximadamente 5,8% da vazão de esgoto sanitário afluyente. Neste experimento foi utilizado o lixiviado do Aterro Sanitário de Canoas, cidade localizada na Bacia Hidrográfica do Rio dos Sinos, o qual é pré-tratado no próprio aterro por um sistema composto por 5 lagoas sendo duas anaeróbias, duas facultativas e uma de maturação. O lixiviado foi coletado separadamente e mantido em um reservatório para uso no sistema experimental.

4.2 Biofiltro Aerado Submerso Multi-estágio

4.2.1 Características

O sistema experimental é composto de um reator anaeróbio do tipo DAFA, tendo como unidades de pós-tratamento três BAS. Estes reatores foram alimentados individualmente através de bombas dosadoras controladas por inversores de frequência, permitindo desta forma uma maior precisão nas vazões de alimentação. Os reatores foram confeccionados em acrílico de forma tubular, com diâmetro interno de 150 mm e altura útil de 4 m. Cada BAS é composto de três câmaras em série, separadas por flanges, sendo a inferior anaeróbia, seguida pela aeróbia e a superior anóxica, dimensionadas de

acordo com dados da literatura, visando promover a nitrificação e desnitrificação.

As dimensões e volume útil de cada câmara são de:

- 1) Câmara Anaeróbia: altura de 0,75m, volume de 0,0132m³
- 2) Câmara Aeróbia: altura de 1,75m, volume de 0,030m³;
- 3) Câmara Anóxica: altura de 1,5m, volume de 0,0264m³.

O volume total das câmaras é de 0,070m³. A câmara anaeróbia está posicionada na base da coluna e recebe o efluente provindo do reator anaeróbio. A injeção de ar é realizada mediante difusor posicionado a 0,75 m da base do BAS, o que delimita o início da câmara aeróbia, como mostra a figura 5. A zona aeróbia possui a função de remover a matéria orgânica residual afluente e promover a oxidação do nitrogênio amoniacal, enquanto na zona anóxica espera-se que ocorra a desnitrificação. Caso esta possibilidade não se confirme pode-se testar diferentes recirculações entre a câmara anóxica e a anaeróbia.

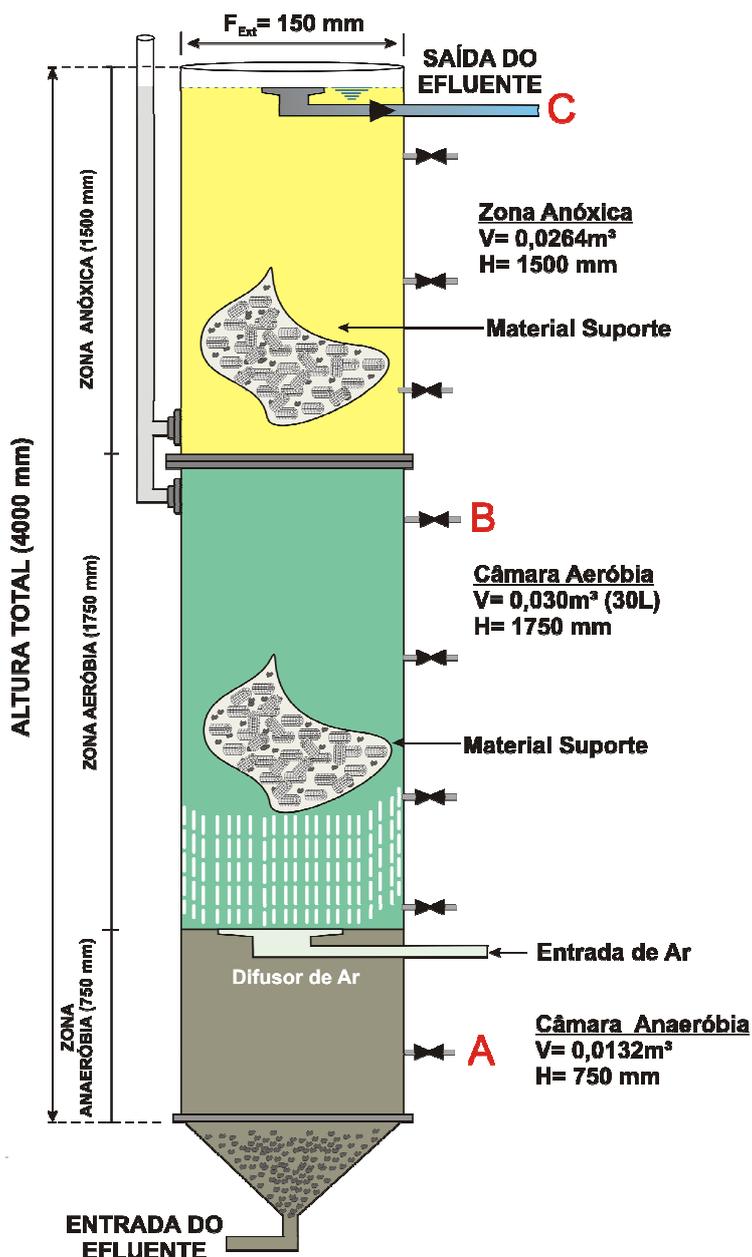


Figura 5: Desenho esquemático de um biofiltro aerado submerso multi-estágio, destacando os pontos de coleta de amostra (A, B e C).

Os BAS são preenchidos com três materiais suporte distintos, sendo estes, tampas e gargalos de garrafas PET (BAS 1), pedra britada nº 4 (BAS 2) e anéis *Pall* de 1,5'' (BAS 3), com características apresentadas na tabela 2.

Tabela 2. Características dos materiais de recheio empregados

Material	Massa Específica do Leito (kg/m ³)	Superfície específica (m ² /m ³)	Índice de Vazios (%)
Gargalos PET	270	165	70
Pedra britada nº4	1650	50	50
Anel Pall (1,5")	112	135	95

Fonte: Giustina, 2009

Estes materiais suporte foram escolhidos por motivos diversos. O Anel *Pall*, de acordo com a literatura, é um dos materiais mais eficientes, já que apresenta uma alta superfície específica e índice de vazios, permitindo a aderência de grande quantidade de biofilme. As tampas e gargalos de garrafa PET foram utilizados por serem um resíduo sólido urbano, praticamente sem custo para obtenção. Este apresenta um índice de vazios semelhante ao do Anel *Pall*. Já a brita nº 4 foi escolhida por ser um meio suporte de valor acessível e amplamente utilizado neste tipo de tratamento.

Os reatores foram plenamente preenchidos com os materiais de recheio, como mostra a Figura 6.

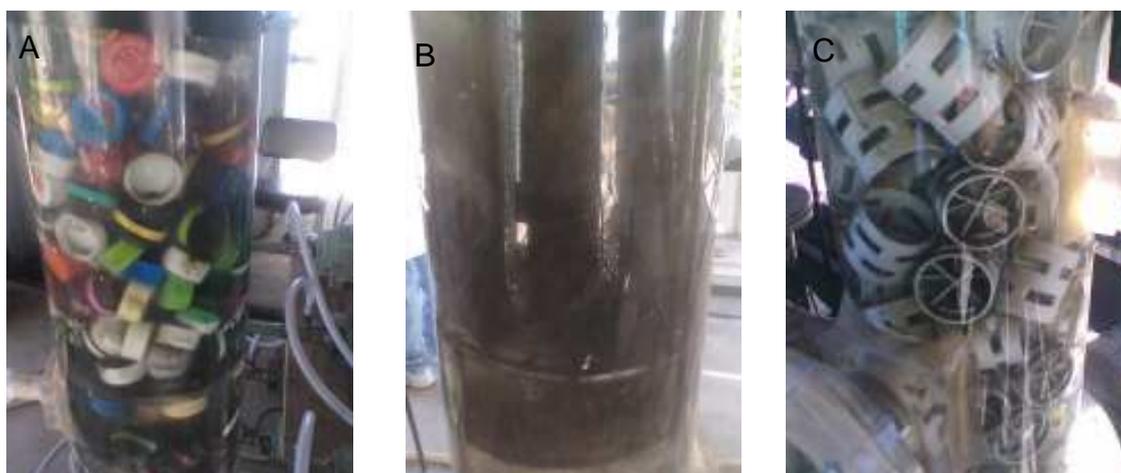


Figura 6: foto dos materiais suporte empregados nos BAS 1, 2 e 3. A) Tampas e Gargalos de garrafas PET; B) Brita nº4; C) Anéis *Pall*.

A figura 7 apresenta uma imagem em duas partes do sistema BAS.

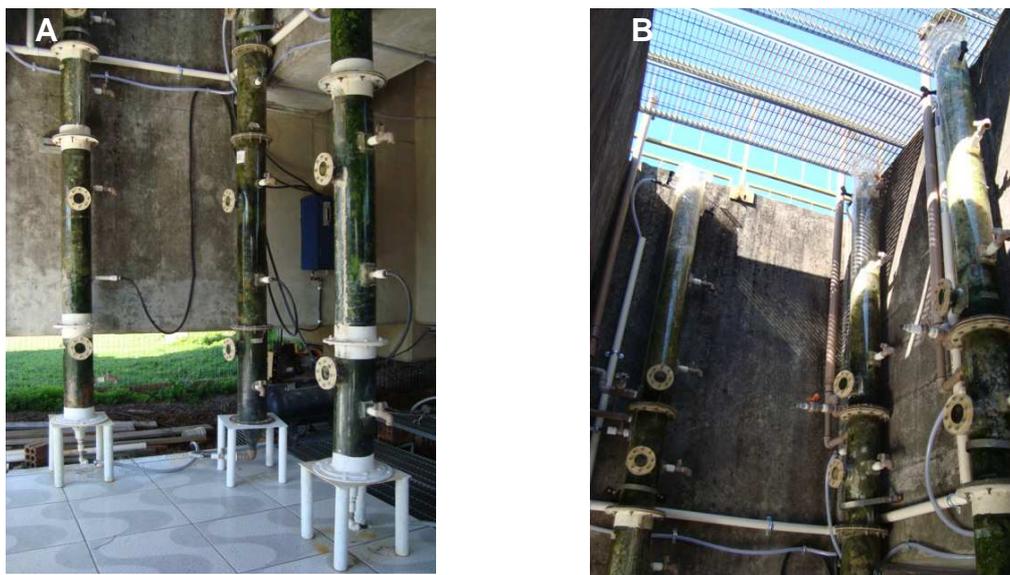


Figura 7: Imagem em duas partes do sistema BAS. A) Fotografia da parte inferior dos BAS mostrando as câmaras anaeróbia e aeróbia; B) Fotografia da parte superior dos BAS mostrando o final das câmaras aeróbia e câmara anóxica (superior);

4.2.2 Funcionamento

O esgoto sanitário foi coletado e reservado em um tanque de fibra de vidro com volume útil de 5 m³. A coleta foi feita via tubulação instalada no canal que conduz o efluente após o gradeamento para o tanque aerado da ETE. O abastecimento do tanque de acúmulo de esgoto sanitário foi feito em momento onde somente estivesse passando esgoto sanitário, portanto livre da adição de cargas extras (lixiviado, banheiro químico e lodos de fossa séptica). O volume de reservação era suficiente para que o sistema fosse abastecido por três dias, permitindo a operação ininterrupta durante os finais de semana. O abastecimento do tanque de acúmulo de lixiviado, com igual volume ao de esgoto, foi feito diretamente do caminhão que transporta o lixiviado do aterro sanitário de Canoas.

O lixiviado e o esgoto sanitário foram bombeados individualmente para a caixa de alimentação do reator anaeróbio e o efluente deste foi direcionado

para um tanque de acúmulo com volume de 100 L, de onde era bombeado novamente para alimentação dos BAS. O sistema operou com 10% de lixiviado de aterro sanitário misturado ao esgoto doméstico. O objetivo do reator anaeróbio neste sistema é promover a remoção da matéria orgânica rapidamente biodegradável, produzindo efluente para o sistema de pós-tratamento (BAS), objeto desta pesquisa.

O sistema anaeróbio não foi avaliado nesta pesquisa, a qual deu ênfase às características do biofilme gerado no material suporte que compõe os BAS.

Os reatores foram operados em regime contínuo de alimentação, com injeção de ar comprimido em corrente ascendente. As unidades atuaram a nível secundário de tratamento do efluente do reator anaeróbio. A alimentação foi feita utilizando-se bombas helicoidais, de deslocamento positivo, marca Netzsch, modelo NM008 e NM005*06, individuais para cada BAS, e comandadas por inversores de frequência, conforme se observa na Figura 8.



Figura 8: Sistema de controle da alimentação – Bombas dosadoras e inversores de frequência.

4.2.3 Amostragem

Cada biofiltro possui ao longo de sua altura 7 pontos equidistantes para tomada de amostras líquidas, os quais estão espaçados entre si em 50cm

sendo que o primeiro encontra-se a 25cm do fundo do reator. Entretanto neste trabalho foram utilizadas amostras coletadas em apenas 3 pontos, sendo eles: ponto A (câmara anaeróbia), ponto B (final da câmara aeróbia) e ponto C (saída da câmara anóxica – efluente final). Também existem 4 pontos para coleta de biofilme do material suporte (escotilhas), conforme mostrado na Figura 9. Entretanto, não foi realizada coleta de biofilme aderido ao material suporte, já que seria inviável a coleta deste material, pois o sistema teria que ser esvaziado por completo. Então se coletou apenas biomassa suspensa, que se desprende e se mantém nos interstícios do material suporte, em cada câmara (pontos A, B e C).

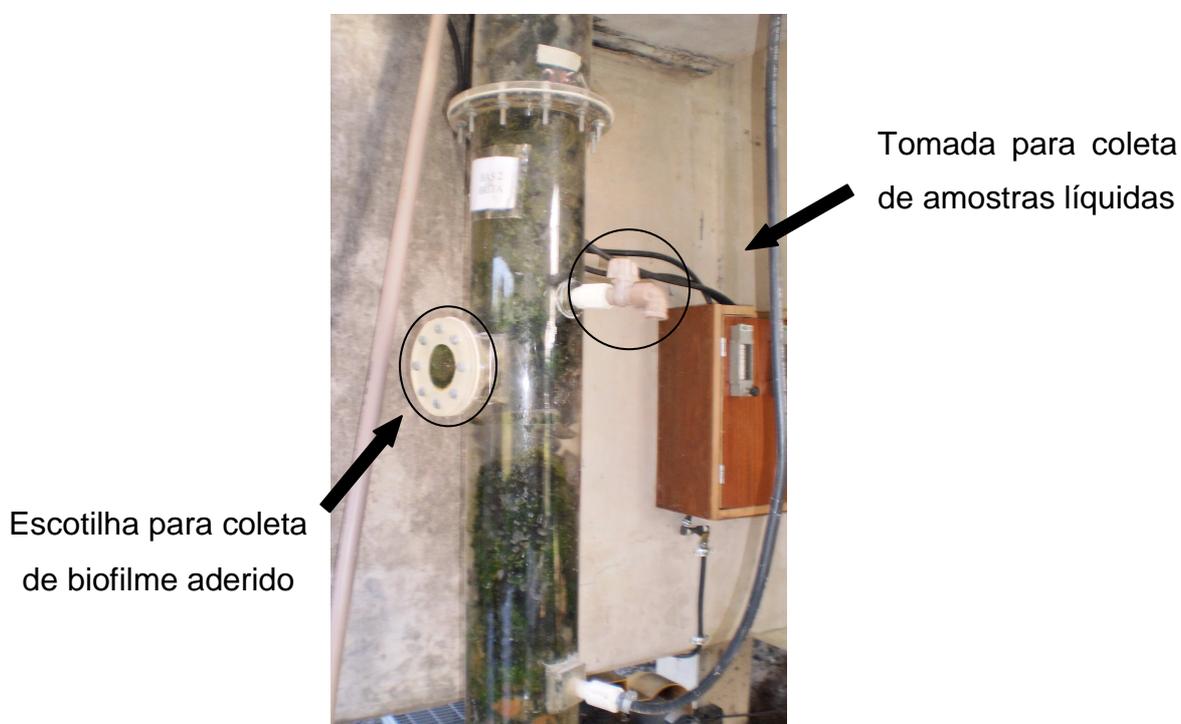


Figura 9: Foto de um dos BAS mostrando a torneira, para coleta de amostras líquidas e a escotilha, para coleta de meio suporte.

As análises de extração de DNA e PCR foram iniciadas no mês de abril de 2009 e finalizadas em de janeiro de 2010, sendo que os 6 primeiros meses foram de testes, realizados com amostra do mesmo sistema, porém quando estava instalado na ETE Navegantes / Porto Alegre, sendo alimentado apenas com esgoto doméstico. Nos últimos meses de análises, foi utilizado o efluente

proveniente do sistema BAS instalado na ETE Canoas/CORSAN, sendo alimentado com esgoto doméstico e lixiviado de aterro sanitário. Já as análises de NMP foram realizadas de julho de 2009 a janeiro de 2010, sendo as coletas realizadas a cada 3 semanas.

Nos pontos A, B e C também foram feitas coletas para os ensaios físico-químicos, realizados de outubro de 2009 a janeiro de 2010, conforme tabela a seguir.

Tabela 3. Parâmetros e frequência de amostragens para cada BAS.

Parâmetro	Frequência
BAS 1, 2 e 3 - Pontos A, B e C	
PCR	semanal
NMP	a cada 21 dias
DQO	semanal
DBO ₅	semanal
N-NH ₄	semanal
N-NO ₂ , NO ₃	semanal
pH	semanal

Nesta pesquisa foi realizada análise molecular utilizando a técnica de PCR na biomassa suspensa coletada nos pontos A, B e C, com frequência semanal, e determinação do NMP no efluente do ponto B (saída da câmara aeróbia), realizada a cada 21 dias, visando identificar a presença ou ausência, e a quantificação de microrganismos nitrificantes no sistema, de forma que se possa acompanhar a evolução da nitrificação em cada BAS.

4.3 Métodos moleculares e microbiológicos

Antes de se iniciar as coletas de amostra que compreenderam o período de partida do monitoramento do sistema piloto na ETE Canoas-CORSAN, foram realizados, durante 6 meses, ensaios de padronização de extração de

DNA e PCR com amostras de biofilme do sistema BAS. Saliencia-se que neste período o sistema BAS estava operando na ETE São João Navegantes em Porto Alegre como unidades de pós-tratamento de reator UASB alimentado somente com esgoto sanitário.

Para estes ensaios foram utilizados 5 protocolos de extração diferentes, sendo que cada um foi modificado conforme a necessidade da amostra. Estes ensaios tiveram por objetivo a familiarização com as técnicas e permitir que se obtivesse um protocolo adequado às amostras provenientes do sistema BAS, além de verificar a eficiência dos *primers* escolhidos para as análises de PCR, mostrados na tabela 3. Objetivou-se, também, a implantação deste tipo de análises no laboratório de Biologia Molecular da Unisinos, já que estas ainda não haviam sido utilizadas para análise de amostras ambientais, nem como ferramentas para o monitoramento microbiológico de sistemas de tratamento de efluentes.

4.3.1 Extração de DNA

Após o período de testes com diferentes protocolos, não foi possível identificar um protocolo adequado para extração do DNA destas amostras. Foram realizados 90 dias de monitoramento (período convencionado como partida do sistema), utilizando-se dos seguintes tipos de extração:

- Extração mecânica, com microdesmembrador do tipo *beat beater* da marca Biospec (São Paulo, Brasil) fazendo-se uso do clorofórmio-álcool-isoamílico para limpeza da amostra. O protocolo, modificado de Sambroock *et al.* (2001), está descrito no Apêndice A.

- Extração química, empregando CTAB (brometo de cetil trimetil amônio), conforme descrito por Doyle (1990) no Apêndice B.

- Extrações com o emprego do *kit Wizard SV Gel* e do *kit PCR Clean-Up System* (Promega, USA), conforme recomendação do fabricante.

Os três protocolos acima foram utilizados nas extrações, variando-se entre eles quando uma ou outra extração não era eficiente a ponto de permitir a obtenção de material genético para amplificação. A dificuldade de definir um

protocolo padrão pode estar relacionada com a variabilidade da qualidade do afluente aos BAS.

Todos os ensaios foram avaliados através de eletroforese em gel de agarose a 1%.

4.3.2 Reação em cadeia da Polimerase (PCR)

Os ensaios da reação em cadeia da polimerase foram realizados conforme descrito por Degrange e Bardin (1995), com o seguinte programa: desnaturação inicial por 4 min. a 94°C e então 28 ciclos de desnaturação do DNA por 1 min. a 94°C, anelamento dos *primers* por 1 min. a 52°C, extensão do DNA por 2 min. a 72°C e extensão final por 10 min. a 72°C. Os *primers* utilizados estão na Tabela 4.

Tabela 4. *Primers* utilizados nas análises por PCR nos biofimes dos BAS para análise da biomassa nitrificante.

Nome	Primer	Sequencia (5'-3')	Fonte
16S rRNA AOB	CTO 189f A/B ^b	GGAGRAAAGCAGGGGATCG	Kowalchuk <i>et al.</i> (1997)
	CTO 189f C ^b	GGAGGAAAGTAGGGGATCG	
	CTO 654R	CTAGCYTTGTAGTTTCAAACGC	
16S rRNA Nitrobacter sp.	FGPS872	TTTTTTGAGATTTGCTAG	Degrange e Bardin (1995)
	FGPS1269	CTAAAACTCAAAGGAATTGA	
16S rRNA Nitrospira sp.	NSR 1113F	CCTGCTTTCAGTTGCTACCG	Dionisi <i>et al.</i> (2002)
	NSR 1264R	GTTTGCAGCGCTTTGTACCG	
Ammonium monooxygenase (amoA)	amoA - 1F	GGGTTTCTACTGGTGGT	Rotthauwe <i>et al.</i> (1997)
	amoA - 2R	CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC	

As reações em cadeia da polimerase foram realizadas em um termociclador da marca Eppendorf[®], modelo Mastercycle.

4.3.3 Número mais provável (NMP) para bactérias nitrificantes

A técnica de NMP foi realizada utilizando-se 5 diluições seriadas, as quais foram incubadas por 21 dias, à 28°C, conforme protocolo descrito no apêndice C, modificado de Araújo (2009). Todas as diluições foram realizadas em quintuplicata.

Para os tubos que não apresentaram resultado positivo, foi realizado o teste para identificação de nitrato. Neste teste foi adicionada uma gota do reagente de difenilamina. O surgimento de uma coloração azul, após a adição da difenilamina, significa resultado positivo, ou seja, o nitrito produzido pelas *Nitrosomonas* foi convertido pelas *Nitrobacter* em nitrato.

4.4 Métodos Físico-químicos

Os ensaios físico-químicos ocorreram durante um período de 90 dias, com frequência semanal, permitindo avaliar o comportamento do efluente na etapa de partida do experimento, conforme tabela abaixo.

Tabela 5: Parâmetros analisados para o monitoramento do processo, métodos e local de realização das análises.

Parâmetro	Método Analítico	Local de Realização
DQO	Método Refluxo Fechado, Método Colorimétrico (Merck) / Método Titulométrico	UNISINOS / CORSAN
DBO ₅	Manométrico/Titulometria	CORSAN
N - NH ₄ ⁺	Digestão Kjeldhal e Titulometria – Kjeldhal Microprocessado	UNISINOS / UFRGS
N - NO ₂ ⁻ , NO ₃ ⁻	Cromatografia Iônica	IPH
pH	Potenciometria	UNISINOS

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A unidade experimental teve sua partida em outubro de 2009, permanecendo em operação até o momento. Entretanto os reatores já se encontravam em operação como pós-tratamento de efluente de reator anaeróbio, recebendo apenas esgoto sanitário. A partir de outubro de 2009 os reatores passaram a ser alimentados com esgoto sanitário consorciado com 10% (v/v) de lixiviado de aterro sanitário, proveniente do aterro de resíduos sólidos de Canoas, RS. A partir deste momento os BAS operaram como pós-tratamento de reator anaeróbio de fluxo ascendente do tipo DAFA, o qual recebia a mistura bruta.

No período estudado foi avaliada a influência da mistura de lixiviado de aterro sanitário ao esgoto doméstico visando estudar a remoção de matéria orgânica nitrogenada e o monitoramento de bactérias *Nitrosomonas* e *Nitrobacter*. Também se procurou estabelecer uma relação entre a eficiência de cada BAS e o meio suporte utilizado para o crescimento do biofilme.

5.1 Resultados da extração

Os primeiros 6 meses de ensaios, que visaram otimizar o processo de extração de DNA total bacteriano e identificar um protocolo mais adequado a este tipo de amostra, mostraram-se bastante diferentes entre si, no que tange a efetividade da extração, conforme pode-se observar na Figura 10.

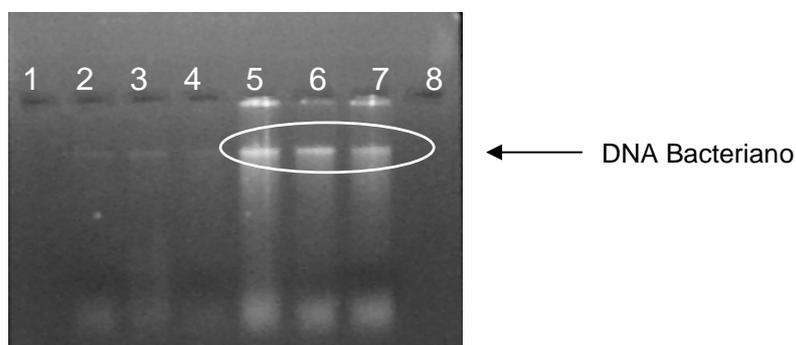


Figura 10: Fotografia dos produtos da extração após eletroforese em gel de agarose do biofilme dos BAS, mostrando extração mecânica (1,2,3 e 4) e extração química (5,6,7 e 8).

A figura 10 apresenta a revelação do gel de agarose da extração da amostra coletada de cada BAS, com o protocolo de extração químico e mecânico, utilizando Clorofórmio-álcool-isoamílico na limpeza da amostra. O biofilme utilizado neste ensaio foi o biofilme já existente em cada BAS quando da operação somente com esgoto sanitário.

Nas colunas 1 a 4 se observa a extração realizada com *bead-beater*, onde foi obtido um baixo rendimento de DNA total da amostra.

As amostras das colunas 5 a 7 correspondem as extrações realizadas empregando o detergente CTAB para limpeza da amostra. Neste caso o rendimento de DNA foi maior do que pelo emprego do método mecânico.

Por fim, as extrações realizadas com o emprego dos *kits* citados no item 4.3.1 não apresentaram resultados satisfatórios, pois após a realização da extração e aplicação em gel de agarose não foram obtidas bandas visíveis.

Na figura 11, obtida a partir de extração química realizada com amostra proveniente do sistema BAS instalado na ETE Canoas/CORSAN, alimentado com esgoto doméstico e lixiviado de aterro sanitário, é demonstrado a presença de DNA total no biofilme circulante nas três câmaras de cada BAS.

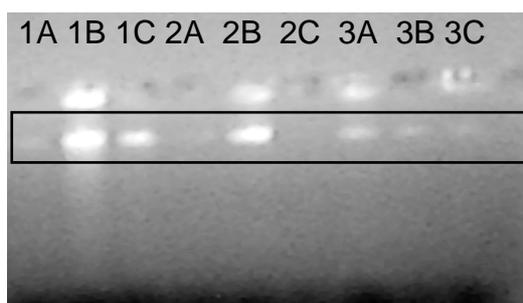


Figura 11: Extração de DNA do biofilme circulante das zonas anaeróbia (A), aeróbia (B) e anóxica (C) dos BAS 1 (PET), 2 (Pedra Brita) e 3 (Anel *Pall*) instalados na ETE Canoas-CORSAN.

Na figura 11 se percebe a presença de DNA bacteriano principalmente nas extrações do biofilme das câmaras aeróbias (B) de cada BAS, bem como a presença de uma considerável quantidade de material que ficou retido nos *slots*

do gel de agarose. Convém salientar que a presença de substâncias contaminantes em extração de amostras ambientais é bastante comum, pois há grande quantidade de substâncias orgânicas complexas que permanecem aderidas ao biofilme, e que são extraídas junto com o material genético.

5.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A Figura 12 apresenta os resultados para a PCR realizada com os *primers* amoA-1F e amoA-2R, os quais são específicos para enzima monooxigenase que, de acordo com Rotthauwe *et al.* (1997) realiza a oxidação da amônia a hidroxilamina, que é o primeiro passo no ciclo do nitrogênio. Este processo é primordial para oxidação da amônia a nitrito pelas bactérias autotróficas nitrificantes.

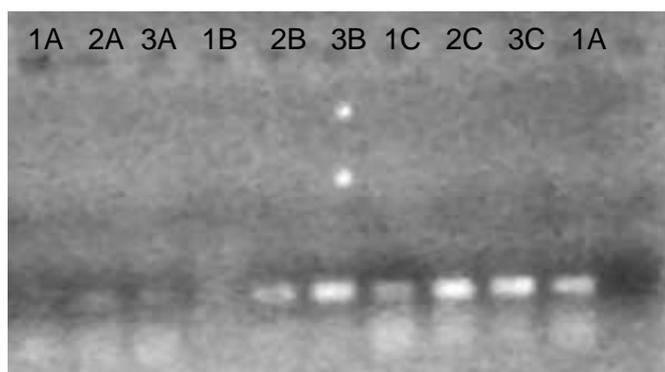


Figura 12: Fotografia dos produtos de PCR após eletroforese em gel de agarose do biofilme circulante dos BAS 1 (PET), 2 (Pedra Brita) e 3 (Anel *Pall*). (A) Câmara anaeróbia, (B) câmara aeróbia e (C) câmara anóxica.

Percebe-se a presença de bactérias nitrificantes nas 3 câmaras de cada BAS, embora nas câmaras anaeróbias (BAS 1A, 2A e 3A) a amplificação tenha sido pouco visível, provavelmente devido a escassez de material genético de organismos nitrificantes, pois a câmara anaeróbia não apresenta as condições ideais para desenvolvimento deste tipo de biomassa, e os *primers* utilizados podem ter amplificado outros microrganismos, pois a reação não é específica, uma vez que os *primers* utilizados são para identificação de gênero.

Rotthauwe *et al.* (1997) utilizaram os mesmos *primers*, para verificar a presença de bactérias oxidadoras de amônia em amostras ambientais. Os autores utilizaram também outros *primers*, obtendo, entretanto, os resultados mais confiáveis utilizando os *primers* amoA - 1F e amoA - 2R. Estes autores trabalharam com amostras ambientais provenientes de camadas superficiais do solo, da zona de raízes de arroz e de lodo ativado de um sistema de tratamento de esgotos. Os autores referem que as bactérias autotróficas oxidadoras de amônia não representam um clado monofilético, mas são membros de pelo menos dois diferentes grupos filogenéticos. O primeiro grupo é caracterizado por membros das *Nitrosomonas* e *Nitrospira* em uma subclasse das *Proteobacteria* e o segundo grupo é caracterizado por cepas do gênero *Nitrosococcus* em outra subclasse das *Proteobacteria*.

Também foram utilizados outros *primers* na realização dos testes de PCR, já mostrados na tabela 3, sendo que não se obteve a amplificação do DNA com a maioria deles. Alguns destes *primers* permitiram a visualização de uma pequena banda de DNA amplificado, representando uma baixa de eficiência no processo de amplificação. Os autores Kowalchuk *et al.* (1997) utilizaram os *primers* CTO 189f A/B^b (GGAGRAAAGCAGGGGATCG), CTO 189f C^b (GGAGGAAAGTAGGGGATCG) e CTO 654R (CTAGCYTTGTAGTTTCAAACGC), também utilizados nesta pesquisa, e suas subdivisões para analisar as bactérias oxidadoras de amônia em dunas de areia litorâneas, através de DGGE e PCR, obtendo uma eficiência correspondente a 25% do esperado.

As amplificações da PCR foram dificultadas, provavelmente pela presença de substâncias inibidoras (ácidos húmicos) oriundas tanto do lixiviado, quanto do esgoto sanitário. As dificuldades na amplificação da PCR podem estar relacionadas a qualidade das substâncias recalcitrantes presentes no afluente aos BAS, pois os sistemas de tratamento que antecedem os biofiltros removem plenamente a matéria orgânica facilmente biodegradável, porém concentram nutrientes, que no meio reacional podem estar na forma de diferentes sais ou complexos metálicos, interferindo na reação da PCR.

Cabe salientar que o afluente aos BAS passa anteriormente por dois sistemas de tratamento; o sistema de lagoas no próprio aterro e o DAFA no site experimental (ETE Canoas-CORSAN). Desta forma, a qualidade da matéria orgânica afluente aos BAS é de baixíssima biodegradabilidade, apresentando relação DBO_5/DQO entre 0,06 e 0,13, como mostra a tabela 5, e concentração de DQO na ordem de 3000 mg/L, conforme determinado por Rocha (2010). É preciso observar que em uma água residuária que apresenta DQO de aproximadamente 3000 mg/L, e em uma relação DBO/DQO tão baixa quanto apresentada na tabela 6, a qualidade da matéria orgânica presente praticamente impossibilita a biodegradação.

Tabela 6. Resultados médios de DBO e DQO e relação DBO/DQO do efluente aos BAS com adição de 10% de lixiviado de aterro sanitário ao esgoto doméstico, monitorados entre 19/11/2009 e 18/02/2010.

	DBO (mg/L)	DQO(mg/L)	DBO/DQO
Afluente BAS	33,50	255,56	0,13
Efluente BAS 1	12,63	200,33	0,06
Efluente BAS 2	11,50	196,00	0,06
Efluente BAS 3	11,25	195,56	0,06

Segundo Forgie (1988) um lixiviado com tal relação DBO/DQO , e com elevada concentração de DQO é característico de um lixiviado velho, ou seja, foi gerado em células de aterro em que a fração orgânica biodegradável já foi quase totalmente removida, o que dificulta o tratamento por processos biológicos. Este fato é confirmado pelas análises físico-químicas do lixiviado afluente ao sistema experimental, conforme figuras 13 e 14.

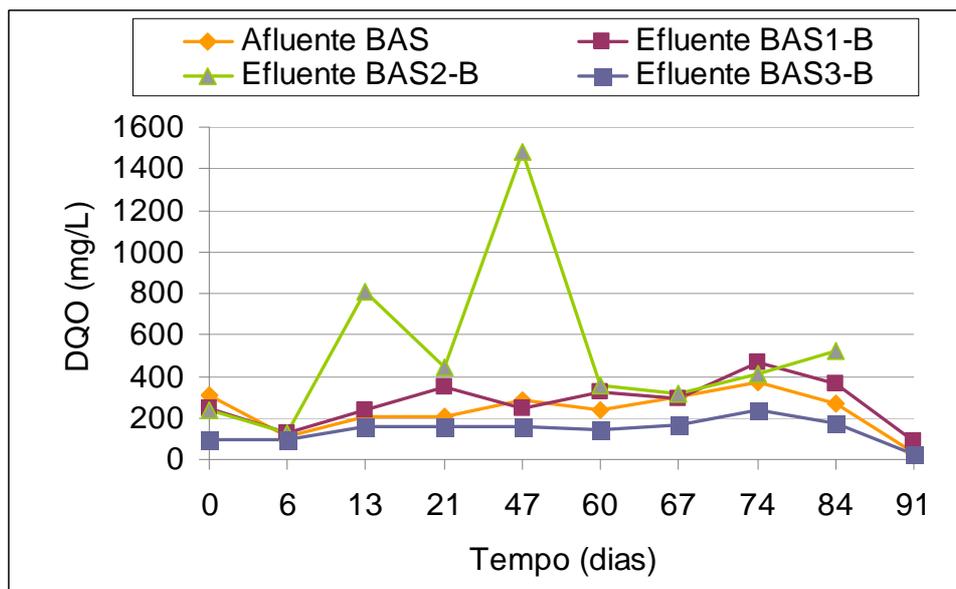


Figura 13: Comportamento da DQO total do efluente da câmara aeróbia dos BAS 1 (PET), 2 (Pedra Brita) e 3 (Anel *Pall*) monitorados entre 19/11/2009 e 11/02/2010.

Os valores elevados de DQO observados no efluente da câmara aeróbia do BAS 2 foram decorrentes da perda excessiva de sólidos (biomassa) que se desprendia do material suporte. Segundo Giustina (2009), o qual utilizou este mesmo tipo de reator no pós-tratamento de efluente de reator UASB tratando esgoto sanitário, a perda de sólidos contribuiu significativamente para o aumento da DQO efluente do BAS empacotado com pedra brita, atribuindo este efeito a característica do material suporte.

A figura acima mostra o comportamento da DQO total ao longo dos 90 dias de monitoramento do experimento. Pode-se observar que os BAS não atuaram de forma complementar a redução de DQO Total. Observou-se um pequeno aumento na remoção de DQO ao longo dos 90 dias de monitoramento. Isto se deu, provavelmente, pelo fato de a relação DBO/DQO afluente aos BAS ser baixa, conforme já referido. Este efeito possivelmente dificultou o crescimento de organismos nitrificadores no biofilme dos BAS, provavelmente devido a má qualidade da matéria orgânica presente (difícil biodegradabilidade). Pode-se inferir pelos resultados que há necessidade de

adição de uma fonte externa de carbono biodisponível para que o sistema possa desenvolver um bom biofilme nitrificante.

As reações de PCR também foram dificultadas pela presença de substâncias recalcitrantes, provavelmente por ácidos húmicos de cadeias longas, e com a presença de grupos aromáticos, muito comuns em lixiviados de aterros antigos. Estas substâncias sabidamente podem interferir na reação de PCR, dificultando ou até impedindo a amplificação do DNA.

A presença de grande quantidade de substâncias inorgânicas, como sais e complexos metálicos, característicos em lixiviados de aterros velhos, também podem ter dificultado a amplificação do DNA.

Outra problemática enfrentada foi o protocolo de extração do DNA. Este deveria ter sido executado com um número maior de purificações, visto a grande quantidade de substâncias interferentes que provavelmente estavam presentes no afluente aos BAS.

A combinação de duas marcas diferenciadas de colunas de purificação poderia ser uma opção. Este procedimento foi realizado por Degrange e Bardin (1995), no estudo de PCR de populações de *Nitrobacter* no solo. Os autores testaram duas diferentes colunas de purificação, a Elupit e a Sephadex G-20, utilizadas separadamente e em conjunto, com o objetivo de remover substâncias húmicas. Esta combinação de colunas resultou em um DNA altamente purificado, sendo recomendado pelos autores como a forma mais eficiente de extração e purificação.

Nesta pesquisa utilizou-se apenas a coluna Wizard para a purificação da amostra, não se obtendo resultados satisfatórios, pois não foi possível a visualização de bandas na eletroforese em gel de agarose.

5.3 Número mais provável (NMP) para bactérias nitrificantes

As figuras 15, 16 e 17 ilustram o comportamento referente à presença de bactérias do gênero *Nitrosomonas* e *Nitrobacter* no efluente das câmaras aeróbia dos BAS. Apesar do tempo de monitoramento ter sido reduzido, cerca de 90 dias da partida do sistema, observou-se um aumento das concentrações

destes microrganismos até a quarta coleta de amostra (aproximadamente 63 dias após a partida). Entretanto, as coletas finais demonstraram um decréscimo nesta concentração, conforme pode ser observado pelos valores da tabela 6. Não é possível estabelecer uma relação clara deste comportamento com os parâmetros operacionais do sistema, devido ao curto tempo de monitoramento. Sabe-se que toda dinâmica bacteriana em um sistema biológico é dependente das características do substrato disponível, principalmente da biodisponibilidade de carbono.

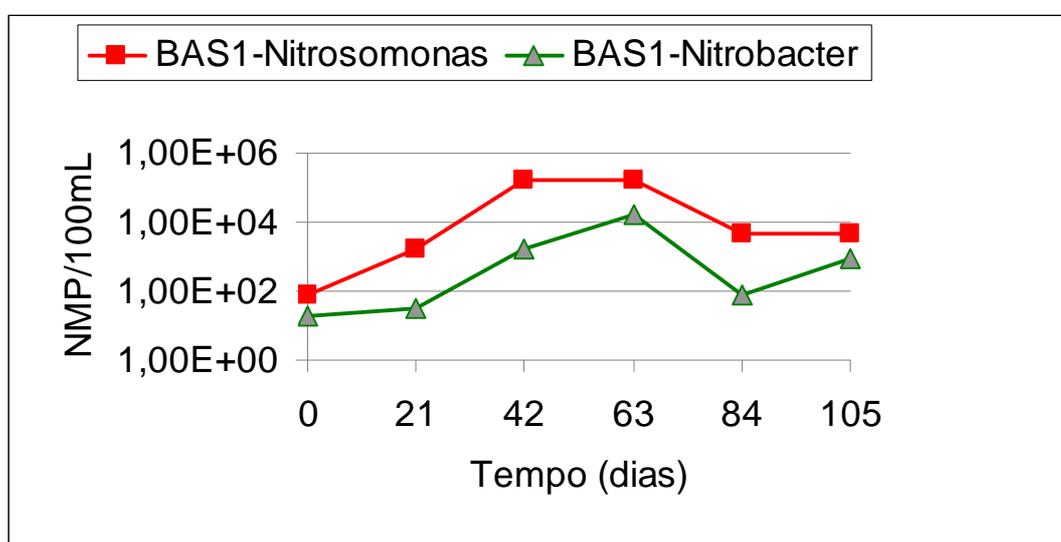


Figura 14: Resultados das contagens (NMP/100 mL) de *Nitrosomonas* e *Nitrobacter* na câmara aeróbia do BAS 1 (PET), monitorado entre 16/10/09 e 18/02/2010.

O perfil de desenvolvimento de *Nitrosomonas* e *Nitrobacter* na câmara aeróbia do BAS1 foi semelhante. Após 84 dias de monitoramento observou-se um decréscimo nos eventos positivos tanto para *Nitrosomonas* quanto para *Nitrobacter*. Este decréscimo pode estar associado à falta de substrato, pois neste período observou-se grande quantidade de chuva, diluindo tanto o lixiviado quanto o esgoto sanitário afluente ao sistema.

Segundo Defesa Civil (2010) no mês de janeiro de 2010 foi observada precipitação pluviométrica de 212 mm, chegando a 94 mm de precipitação num único dia (15/01/2010). Eventos desta natureza dificultam muito a operação de

qualquer sistema de tratamento, principalmente a operação de sistemas biológicos.

Com relação a influência do material suporte sobre a nitrificação Giustina (2009) observou que para o BAS empacotado com tampas e gargalos de garrafa PET foram observados os melhores resultados, em termos de eficiência de nitrificação e em estabilidade do processo. Este efeito provavelmente está se refletindo nas contagens de bactérias nitrificantes, conforme pode-se observar na figura 15, quando comparado com os resultados observados para os BAS 2 e 3, que utilizaram pedra brita e anéis *pall* como recheio, respectivamente.

A utilização de tampas e gargalos de garrafa pet como recheio possui também um forte apelo social, por poder ser coletado em centrais de triagem, a um custo inferior ao de recheios plásticos comumente empregados em países desenvolvidos, como os anéis *Pall*. Desta forma torna-se uma opção atrativa para uso como material suporte.

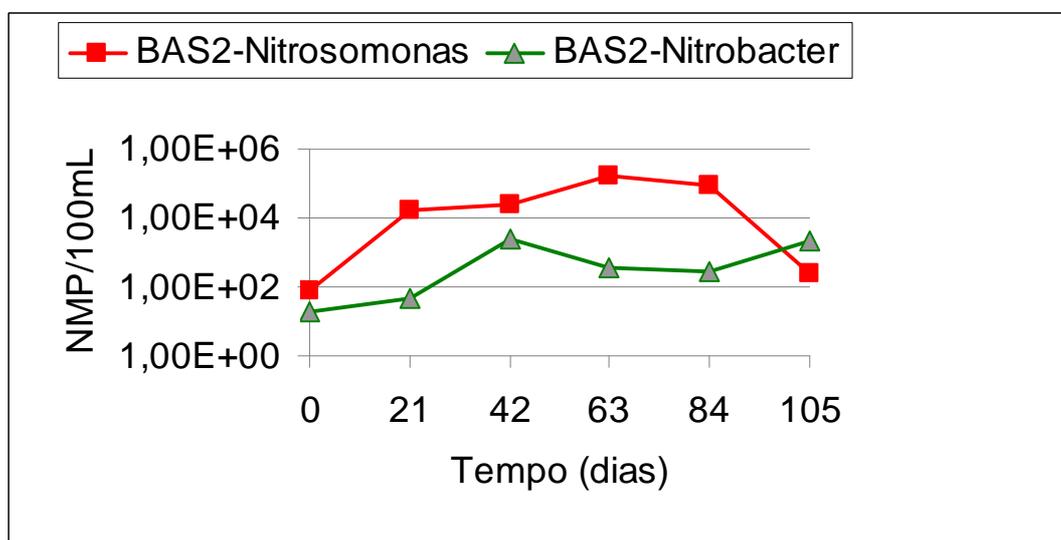


Figura 15: Resultados das contagens (NMP/100 mL) de *Nitrosomonas* e *Nitrobacter* na câmara aeróbia do BAS 2 (pedra Brita) monitorados entre 16/10/09 e 18/02/2010.

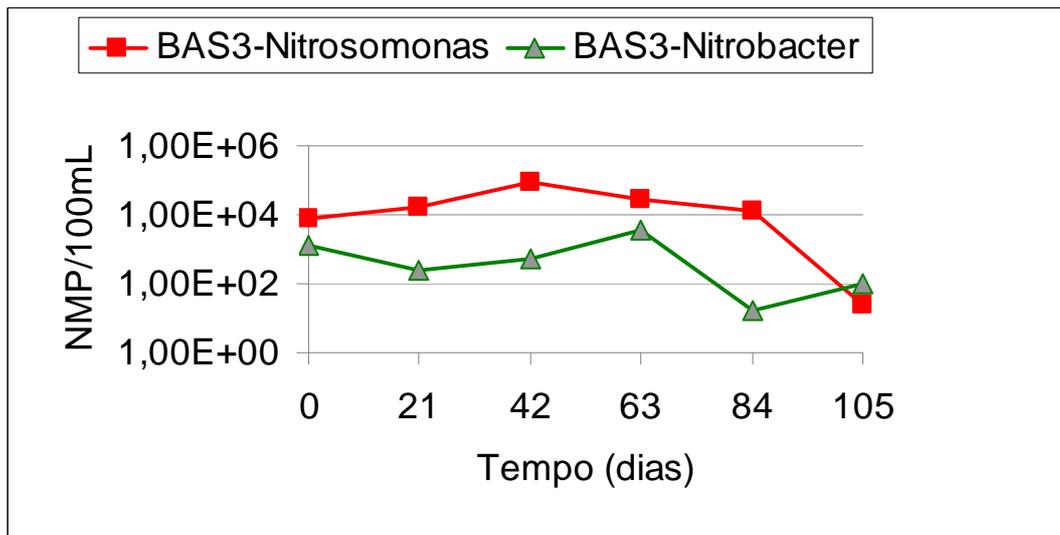


Figura 16: Resultados das contagens (NMP/100 mL) de *Nitrosomonas* e *Nitrobacter* na câmara aeróbia do BAS 3 (Anel *Pall*) monitorados entre 16/10/09 e 18/02/2010.

Nos gráficos das figuras 15 e 16 percebe-se que os BAS 2 e 3 tiveram comportamento semelhante no que se refere as contagens (NMP/100 mL) de *Nitrosomonas* e *Nitrobacter*. Entretanto, embora os materiais suporte sejam extremamente diferentes, o perfil das contagens foi semelhante, logo não está claro neste caso a influência do material suporte. Possivelmente as características do substrato exerceram maior efeito sobre o desenvolvimento do biofilme, do que a natureza do substrato.

A figura 17 e a tabela 7 resumem as contagens (NMP/100mL de *Nitrosomonas*) para os 3 BAS.

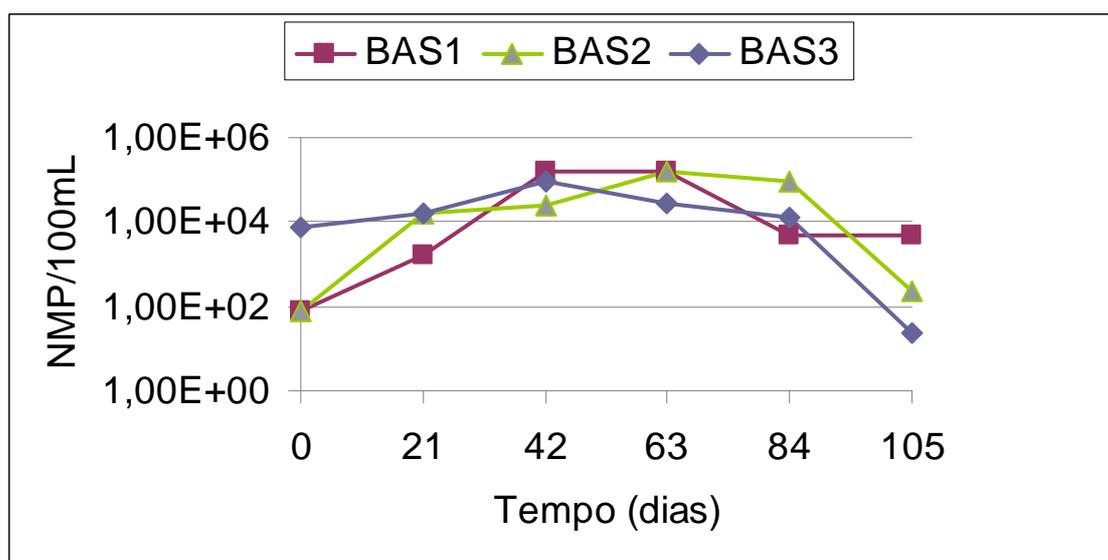


Figura 17: Resultados das contagens (NMP/100 mL) de *Nitrosomonas* na câmara aeróbia dos BAS 1 (PET), 2 (Pedra Brita) e 3 (Anel Pall) monitorados entre 16/10/09 e 18/02/2010.

Tabela 7. Resultados das análises de NMP/100mL de *Nitrosomonas* na câmara aeróbia de cada BAS.

Nº dias	Nitrosomonas		
	BAS 1	BAS 2	BAS 3
0	7,80E+01	7,80E+01	7,90E+03
21	1,60E+03	1,60E+04	1,60E+04
42	>1,60E+05	2,40E+04	9,20E+04
63	1,60E+05	1,60E+05	2,80E+04
84	4,80E+03	9,20E+04	1,30E+04
105	4,80E+03	2,40E+02	2,40E+01

Há uma diminuição nas contagens de *Nitrosomonas* ao final do período de monitoramento devido a falta de substrato (baixa relação DBO/DQO) necessário para o desenvolvimento dos microrganismos.

A figura 18 e a tabela 8 apresentam o NMP/100mL de *Nitrobacter* para os 3 BAS, e neste caso o decréscimo observado para *Nitrosomonas*, também

foi verificado para *Nitrobacter*. Entretanto observou-se um aumento na concentração em relação ao último tempo monitorado.

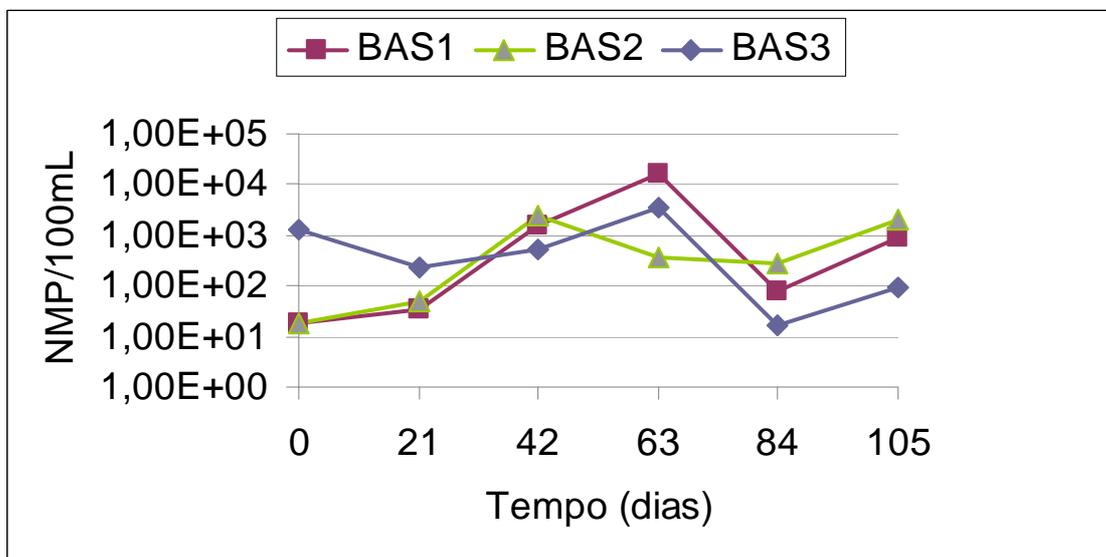


Figura 18: Resultados das contagens (NMP/100 mL) de *Nitrobacter* na câmara aeróbia dos BAS 1 (PET), 2 (Pedra Brita) e 3 (Anel *Pall*) monitorados entre 16/10/09 e 18/02/2010.

Tabela 8. Resultados das análises de NMP/100mL de *Nitrobacter* na câmara aeróbia de cada BAS.

Nº dias	Nitrobacter		
	BAS 1	BAS 2	BAS 3
0	<1,80E+01	1,80E+01	1,30E+03
21	3,30E+01	4,90E+01	2,40E+02
42	1,60E+03	2,40E+03	5,40E+02
63	1,60E+04	3,50E+02	3,50E+03
84	7,90E+01	2,80E+02	1,70E+01
105	9,20E+02	2,10E+03	9,40E+01

As discrepâncias observadas nas contagens são características do monitoramento de amostras ambientais, tornando necessário um longo tempo de monitoramento para obtenção de valores estáveis.

O método do NMP avalia a contagem de bactérias *Nitrosomonas* e *Nitrobacter*, as quais são, conforme Kieling (2004), as principais representantes

do grupo de bactérias oxidadoras de amônio e nitrito, respectivamente. Portanto deve-se presumir que há possibilidade de que outras bactérias também estejam sendo quantificadas, uma vez que o método não possui especificidade.

Outro aspecto relevante é o lento crescimento desses microrganismos frente a outras bactérias presentes no sistema, o que dificulta ainda mais seu monitoramento. A baixa relação DBO/DQO afluente ao sistema, conforme observado na Tabela 5, torna este cenário ainda mais difícil, pois as bactérias oxidadoras de amônia necessitam uma fonte de carbono prontamente disponível, caso contrário a nitrificação e desnitrificação não ocorrerá, e por consequência o desenvolvimento destes microrganismos fica prejudicado.

De qualquer maneira foi possível observar um tênue decréscimo na concentração efluente de nitrogênio amoniacal em todos os reatores, conforme se observa na Figura 19.

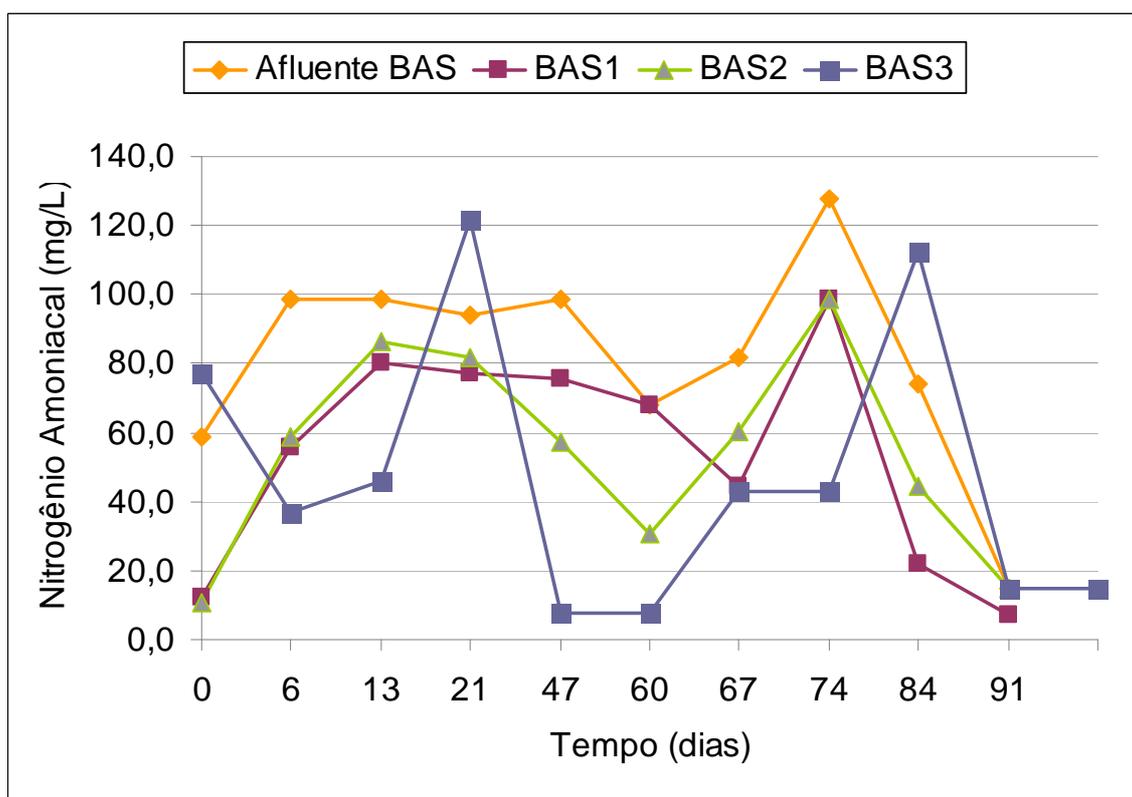


Figura 19: Análise da concentração de Nitrogênio Amoniacal afluente e efluente ao sistema BAS - BAS 1 (PET), 2 (Pedra Brita) e 3 (Anel Pall), monitorados entre 19/11/2009 e 11/02/2010.

Este decréscimo é atribuído à atividade nitrificadora, evidenciado pelo aumento da concentração de nitrato (figura 21) no efluente dos BAS, uma vez que as condições físico-químicas do meio reacional não permitem a remoção de nitrogênio amoniacal por *stripping*. Este obedece a determinados padrões físico-químicos para que comece a ocorrer, sendo um deles a elevação do pH a valores superiores a 8,5, conforme Metcalf & Eddy (2003). Esta elevação do pH, de acordo com Caetano (2009), converte os íons amônio em amônia livre que podem passar para o meio gasoso. Entretanto, durante o monitoramento dos BAS o pH se manteve próximo da neutralidade, conforme se observa na figura 20.

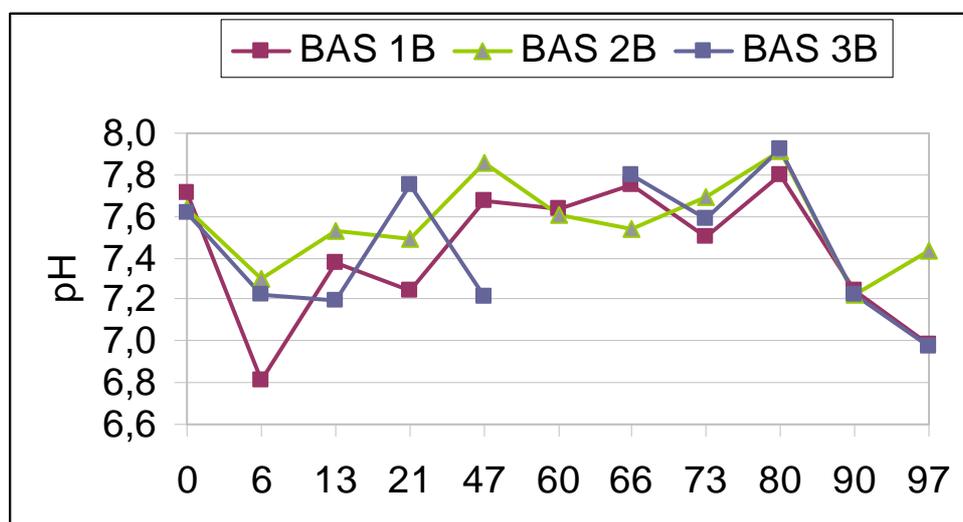


Figura 20: Comportamento do pH do efluente contido no sistema BAS, monitorados entre 19/11/2009 e 18/02/2010.

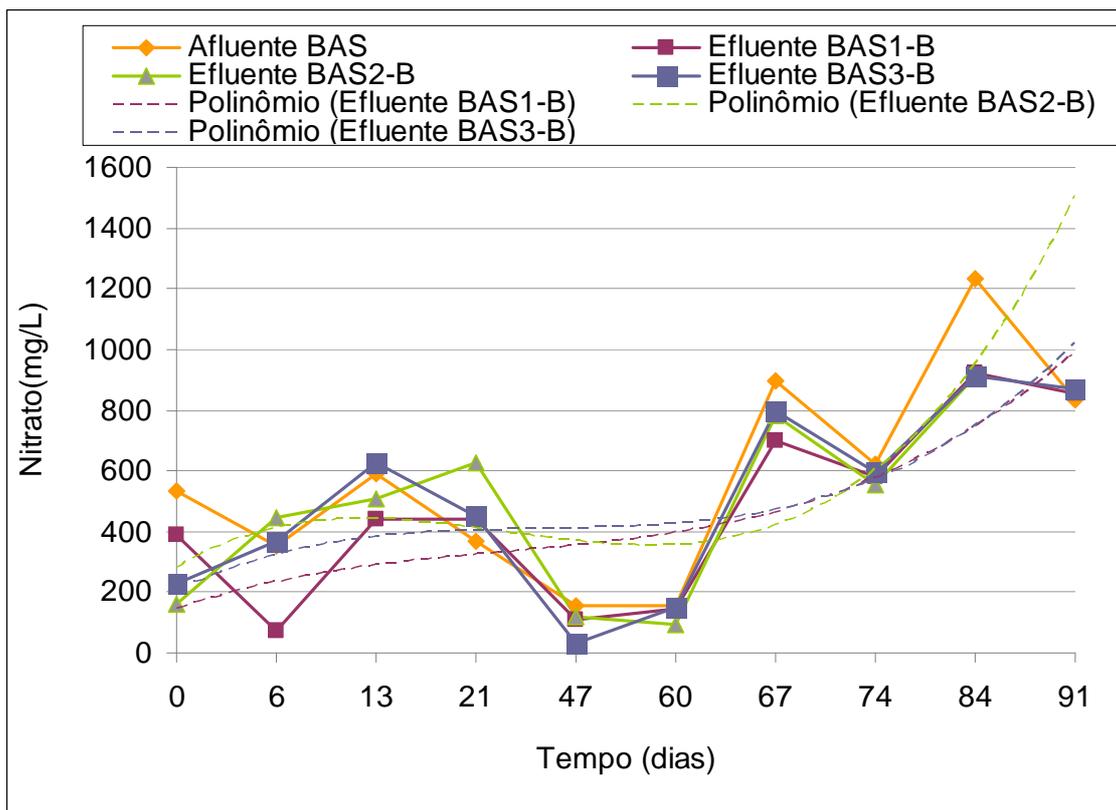


Figura 21: Comportamento do Nitrato do efluente contido no sistema BAS, monitorados entre 19/11/2009 e 11/02/2010.

As curvas de tendência traçadas na figura 20 são um indicativo do aumento gradativo da nitrificação nos reatores.

6 CONCLUSÕES

As análises de nitrogênio amoniacal demonstraram um decréscimo deste parâmetro no efluente dos BAS ao longo do período analisado. Este fato foi associado a presença de bactérias nitrificantes no biofilme, conforme contagens através da técnica do NMP, e pela presença de nitrato efluente.

As contagens de bactérias nitrificadoras através da técnica de NMP mostraram que a nitrificação ocorreu associada à presença de *Nitrosomonas* e *Nitrobacter* no biofilme circulante de cada BAS.

Os BAS apresentaram comportamento semelhante com relação a população de *Nitrosomonas* e *Nitrobacter*, não permitindo uma avaliação definitiva da influência do tipo de material suporte sobre a concentração bacteriana.

Os três diferentes meios suporte comportaram-se de forma semelhante na remoção de matéria orgânica, embora o meio suporte composto de tampas e gargalos de garrafa pet tenha apresentado um melhor desempenho.

As análises de PCR, embora dificultadas pela fraca amplificação, demonstraram a presença de bactérias dos gêneros *Nitrosomonas* e *Nitrobacter* no biofilme dos BAS, evidenciando a necessidade de pesquisa de um método de extração mais eficiente, que poderá permitir uma melhor amplificação, bem como estudo de outros *primers*.

A etapa de partida do sistema não foi completa, pois a variação dos parâmetros monitorados torna necessário mais tempo de operação até se atingir um estado estacionário, no qual a variação dos parâmetros efluentes sejam menores e/ou constantes.

Não foi possível a obtenção de um protocolo de extração do DNA bacteriano adequado ao tipo de efluente testado, bem como a amplificação eficiente do DNA bacteriano, por vezes obtido no processo de extração.

7 RECOMENDAÇÕES

Neste trabalho ficou evidente a grande dificuldade em se obter extratos de DNA puros, para amplificação por PCR, quando se trabalha com amostras ambientais, principalmente quando há o aporte de lixiviado de aterro sanitário ao esgoto doméstico, pois as reações que compreendem o ensaio por PCR são extremamente específicas, o que as torna bastante susceptíveis a interferências por substâncias húmicas, por exemplo. Desta forma faz-se as seguintes recomendações:

- A implantação de uma rotina de remoção de lodo acumulado na câmara anóxica pode contribuir para a redução da interferência de perda de sólidos nos valores de DQO total.
- Realizar um monitoramento semanal do NMP, embora isto exija um aparato laboratorial significativo. Seriam necessárias 3 estufas com temperatura de 28°C e, aproximadamente, 600 tubos de ensaio, o que inviabilizou a análise semanal nesta pesquisa, porém deve ser considerada para trabalhos futuros.
- Testar um maior número de *primers*, buscando ampliar a especificidade desta análise como requisito para uma melhor caracterização da biomassa.
- Pesquisar métodos de purificação da amostra que possibilitem uma menor interferência de substâncias contaminantes.
- Monitorar o sistema de reatores por um período maior, buscando atingir um estado estacionário, e então testar alternativas externas de adição de carbono para viabilizar um aumento da nitrificação e conseqüente desnitrificação.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTONINI, Sandra R.C.; MENEGHIN, Silvana P.; URASHIMA, Alfredo S. **Técnicas básicas de biologia molecular**. Centro de ciências agrárias, Campus de Araras. Universidade Federal de São Carlos. São Paulo, 56 p., 2004.

ARAÚJO, Juliana C. **Curso teórico-prático para capacitação nas Técnicas do Número Mais Provável -NMP e FISH (hibridação in situ com sondas fluorescentes) para quantificação de bactérias nitrificantes e desnitrificantes**. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental (DESA), Universidade de Minas Gerais. Belo Horizonte, 34p., 2009.

ARAÚJO JR., Moacir Messias. **Reator combinado anaeróbio-aeróbio de leito fixo para remoção de matéria orgânica e nitrogênio de água residuária de indústria produtora de lisina**. Tese de doutorado. Escola de Engenharia de São Carlos. São Paulo, 136p., 2006.

ATLAS, Ronald. M.; BARTHA, Richard. **Microbial ecology**. Fundamentals and applications. Fourth edition. California, 1988.

BAGGHI, Amalendu. **Design of landfills and integrated solid waste management**. 3.ed. John Wiley and sons, Inc. New Jersey, 2004.

BIDONE, Franciscos Ricardo Andrade e POVINELLI, Jurandyr. **Conceitos Básicos de Resíduos Sólidos**. Publicação EESC - USP, São Carlos, SP. 1999.

CAETANO, Marcelo O. **Aplicação de Reator de Chicanas no Tratamento de Lixiviados de Aterros Sanitários de resíduos Sólidos Urbanos para Remoção de Nitrogênio Amoniacal por "Stripping"**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Engenharia Civil. Unisinos. São Leopoldo, 150p., 2009.

CAMPOS. Rosane H. **Estudo da remoção de carbono e nitrogênio de efluentes urbanos em um reator de leito fluidizado operado em bateladas seqüenciais**. Tese (doutorado em Engenharia Ambiental). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2006.

CAREY, C.M.; LEE, H.; TREVORS, J.T. **Comparison of most probable number-PCR and most probable number-foci detection method for quantifying infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in environmental samples**.

Journal of Microbiological Methods, Volume 67, Issue 2, Pages 363-372, November 2006.

CASTILHOS JR., Armando Borges (coordenador). **Gerenciamento de resíduos sólidos urbanos com ênfase na proteção de corpos d'água:**

prevenção, geração e tratamento de lixiviados de aterros sanitários. Rede cooperativa de pesquisas PROSAB. Florianópolis, 2006.

CORSSATTO, Daniel; ZULIZN, Henrique W.; HAAS, Mariana; BROERING, Talita A. **Esgotos: trabalho de tecnologia da edificação.** Disponível em http://www.arq.ufsc.br/arq5661/trabalhos_2006-2/esgotos/problematika.html Acesso em 13/07/2009.

COSSU, R.; CASU, G.; LAVAGNOLO, M. C.; ANDREOTTOLA, G. **Biological removal of nutrients in co-treatment of leachate and sewage.** In: Simpósio Nacional de Fermentações, 14, 2003, Florianópolis, p 353., 2003.

DEFESA CIVIL RS. **Consulta de índices pluviométricos.** 2010. Disponível em http://www2.defesacivil.rs.gov.br/estatistica/pluviometro_consulta.asp Acesso em 11/07/2010.

Doyle, J. J. T.; Doyle, J. L. **Isolation of plant DNA from fresh tissue.** Focus, 12:13-18, 1990.

DEGRANGE, V.; BARDIN, R. **Detection and Counting of *Nitrobacter* Populations in Soil by PCR.** Applied and Environmental microbiology. P. 2093-2098. 1995.

DIONISI, H.M.; LAYTON, A.C.; HARMS, G. GREGORY, I.R.; ROBINSON, K.G.; SAYLER, G.S. **Quantification of *Nitrosomonas oligotropha*-Like Ammonia-Oxidizing Bacteria and *Nitrospira* spp. from Full-Scale Wastewater Treatment Plants by Competitive PCR.** Applied and Environmental Microbiology, p. 245–253. Jan. 2002.

FERREIRA, E. S. **Cinética química e fundamentos dos processos de nitrificação e desnitrificação biológica.** In XXVII Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental, Porto Alegre. ABES: Rio de Janeiro, 2000.

FIGUEIREDO, Maria C.B.; TEIXEIRA, Adunias S.; ARAÚJO, Lúcia F.P.; ROSA, Morsyleide F.; PAULINO, Walt D.; MOTA, Suetônio; ARAÚJO, José C. **Avaliação da vulnerabilidade ambiental de reservatórios à eutrofização.** Engenharia sanitária e ambiental. Vol.12 - Nº 4 - 399-409, out./dez. 2007.

FLECK, Eduardo. **Sistema Integrado por Filtro Anaeróbio, Filtro Biológico de Baixa Taxa e Banhado Construído Aplicado ao Tratamento de Lixiviado de Aterro Sanitário.** Dissertação de Mestrado. Instituto de Pesquisas Hidráulicas. UFRGS. Porto Alegre, RS, 2003.

FORGIE, D. **Selection of the Most Appropriate Leachate Treatment Methods.** Part 1: A Review of Potencial Biological Leachate Treatment Methods. Water Pollution Research in Canada. Vol 23, pp 308-328, 1988.

GILBRIDE, K.A.; LEE, D.Y.; BEAUDETTE, L.A. **Molecular techniques in wastewater: Understanding microbial communities, detecting pathogens, and real-time process control.** Journal of Microbiological Methods 66 (2006) 1–20. Canada, 2006.

GIUSTINA, Saulo V.D. **Remoção biológica de nitrogênio utilizando biofiltro aerado submerso multi-estágio.** Dissertação de mestrado, Instituto de pesquisas hidráulicas, UFRGS. Porto Alegre, 2009.

GOMES, Luciana Paulo, GEHLING, Gino. **Guia do Curso de Capacitação: Gestão Integrada de Resíduos Sólidos,** ReCESA, 56p., 2007.

GOMES, Luciana Paulo. LANGE, Lisete Celina.; JUCÁ, José F. Thomé; FERNANDES, Fernando; SILVA, Sandra. M.C.P. Processos e monitoramento da digestão anaeróbia de Resíduos Sólidos Urbanos. In: CASTILHOS Jr., Armando Borges de (Orgs.). **Gerenciamento de Resíduos Sólidos Urbanos com ênfase na proteção de corpos d'água: prevenção, geração e tratamento de lixiviados de aterros sanitários.** PROSAB, 475 p. Florianópolis, 2006.

GONÇALVES, Ricardo F.; CHERNICARO, Carlos A.L.; NETO, Cícero O.A.; SOBRINHO, Pedro A.; KATO, Mario T.; COSTA, Rejane H.R.; AISSE, Miguel M.; ZAIAT, Marcelo. **Pós - tratamento de Efluentes de Reatores Anaeróbios por Reatores com Biofilme.** PROSAB, cap. 4. Edital 2, 1ª Edição, FINEP – RJ, 544 p., 2001.

GONÇALVES, Ricardo F.; ARAÚJO, Vera L.; CHERNICHARO, Carlos A. **Tratamento secundário de esgoto doméstico sanitário através da associação em série de reatores UASB e biofiltros aerados submersos.** In: Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, 19, Foz do Iguaçu, 1997. Anais. Rio de Janeiro, ABES, p. 450-61. 1997.

HAASE, Janine F. e SILVA, Maria Lúcia B. C. **Enquadramento das águas do Rio dos Sinos – Um processo participativo.** In: XV Simpósio Brasileiro de Recursos Hídricos. Curitiba/PR, 2003.

HENRY, J. G. **New Developments in Landfill Leachate Treatment.** In: International Conference on New Directions and Research in Waste Treatment and Residuals Management. Proceedings. University of British Columbia. p. 1-139. 1985.

HIRAKAWA, Carlos; PIVELI, Roque P.; SOBRINHO, Pedro A. **Biofiltro aerado submerso aplicado ao pós-tratamento de efluente de reator uasb – estudo em escala piloto com esgoto sanitário.** 21º Congresso Engenharia Sanitária e Ambiental, Vol. 7 - Nº 1 - jan/mar 2002 e Nº 2 - abr/jun 2002.

HOEFEL, D.; MONIS, P.T.; GROOBY, W.L.; ANDREWS, S.; SAINT, C.P. **Culture-Independent Techniques for Rapid Detection of Bactéria**

Associated with Loss of Chloramine Residual in a Drinking Water System. Applied and Environmental Microbiology, p. 6479–6488, nov. 2005.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa Nacional de Saneamento Básico – PNSB de 2000.** Rio de Janeiro: IBGE, 2000. Disponível em <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pnsb/pnsb.pdf> . Acesso em 28/05/09.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Atlas de Saneamento, 2004. Disponível em http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_impressao.php?id_noticia=119 Acesso em 13/07/09.

IHU. Instituto Humanitas Unisinos. **Rio dos Sinos. Um ano depois da tragédia. Ainda é possível salvá-lo?** Revista do Instituto Humanitas Unisinos, Ed. 242. São Leopoldo, p. 1-43. 2007.

JORDÃO, Eduardo P.; PESSÔA, Constantino A. **Tratamento de Esgotos Domésticos.** 4ª edição. Rio de Janeiro, 906 p.,2005.

KIELING, D.D. **Estudo da remoção biológica de nitrogênio a partir de lodo nitrificante cultivado em meio autotrófico sob condições anóxicas.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos. Florianópolis, 2004.

KIRK, J.L; BEAUDETTE, L.A; HART, M; MOUTOGLIS, P; KLIRONOMOS, J.N; LEE, H; et al. **Methods of studying soil microbial diversity.** J Microbiol Methods, 58: 169-88., 2004.

KJELDSEN P. I.; BARLAZ, M.A; ROOKER, A.P.; BAUN, A.; LEDIN, A.; CHRISTENSEN, T. H. **Present and long-term composition of MSW landfill leachate: a review.** Critical Reviews in Environmental Science and Technology, v.32, p.297-336, 2002.

KOWALCHUK, G.A.; STEPHEN, J.R.; BOER, W.; PROSSER, J.I.; EMBLEY, T.M.; WOLDENDORP. **Analysis of Ammonia-Oxidizing Bacteria of the b 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, p. 1489–1497. Apr. 1997.

MA, Yong; PENG, Yongzhen; WANG, Shuying; YUAN, Zhiguo; WANG, Xiaolian. **Achieving nitrogen removal via nitrite in a pilot-scale continuous pre-denitrification plant.** Water research 43, 563-572. 2009.

MAGRI, Maria Elisa; SEZERINO, Pablo Heleno; PHILIPPI, Luiz Sérgio. **Aplicação de biofiltros aerados submersos com os meios suportes: cascas de ostras e tampas de polietileno, no pós-tratamento de efluentes de um tanque séptico.** 24º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental – ABES. Belo Horizonte, 2007.

MALIK, Seidu; BEER, Michael; MEGHARAJ, Mallavarapu; NAIDU, Ravi. **The use of molecular techniques to characterize the microbial communities in contaminated soil and water.** Environment International, 34 (2008) 265-276. Australia, 2008.

MARKOULATOS, P; SIAFACAS, N; MONCANY, M. **Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach.** J. Clin Lab Anal 16:47-51, 2002.

MATTEHWS, Richard; WINSON, Michael; SCULLION, Jonh. **Treating landfill leachate using passive aeration trickling filters; effects of leachate characteristics and temperature on rates and process dynamics.** Science of the Total Environment, 407 (2009) 2557–2564. Wales, UK, 2009.

MEHMOOD, M.K.; ADETUTU, E.; NEDWELL, D.B.; BALL, A.S. **In situ microbial treatment of landfill leachate using aerated lagoons.** Bioresource Technology 100, 2741–2744. 2009.

MELO, L.F. (2005). **Biofilm physical structure, internal diffusivity and tortuosity.** Water Science and Technology, v.52 (7), 77-84. Portugal, 2005.

MENDONÇA, Neyson M.; CAMPOS, José R.; GIANOTTI, Eloisa P.; NICIURA, Cristiano L. **Avaliação da evolução e da atividade do biofilme em reator anaeróbio de leito expandido alimentado com esgoto sanitário.** 21º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental. João Pessoa, 2001.

METCALF & EDDY, **Wastewater Engineering: treatment, disposal and reuse.** Mc Graw Hill, 3ª ed. 1991.

METCALF & EDDY, **Wastewater Engineering: treatment and reuse.** Mc Graw Hill, 4ª ed. 1819 p. 2003.

MIRANDA, Luis A.S. **Estudo dos efeitos dos óleos e graxas em reatores de alta taxa, utilizando técnicas clássicas e Hibridação *in situ* com sondas fluorescentes.** Tese de doutorado, Centro de Biotecnologia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2004.

MORAVIA, Wagner Guadagnin. **Estudos de caracterização, tratabilidade e condicionamento de lixiviados visando tratamento por lagoas.** Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos. Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, 2007.

NICOLELLA, C.; VAN LOODRECHT, M.C.M.; and HEIJNEN, J.J. **Wastewater treatment with particulate biofilm reactors.** *Journal of Biotechnology.* v.80, nº 1, p.1-33. 2000a.

ORTEGA, Fernando dos Santos; ROCHA, K. M.; ZAIAT, Marcelo.; PANDOLFELLI, Vitor Carlos. **Aplicação de espumas de cerâmicas produzidas via “gelcasting” em biorreator para tratamento anaeróbio de águas residuárias.** *Cerâmica,* 47(304):199-203, 2001.

PHILIPS, Angelina M.L. **Utilização de reator de biodiscos para tratamento de efluentes com altas concentrações de nitrogênio.** Tese de doutorado. Programa de pós-graduação em engenharia química. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 178 p., 2008.

PIMENTA, Handson C.D.; TORRES, Felipe R.M.; RODRIGUES, Bernardo S.R.; ROCHA JR., Josenberg M. **O esgoto: a importância do tratamento e as opções tecnológicas.** XXII Encontro Nacional de Engenharia de Produção. 8 p. Curitiba/PR, 2002.

PLANO SINOS. **Plano de Bacias do Rio dos Sinos.** Demanda Induzida - Nº Edital:4.12. São Leopoldo, 2007.

PUROHIT, H. J.; KAPLEY, A.; MOHARIKAR, A.A.; NARDE, G. **A novel approach for extraction of PCR-compatible DNA from activated sludge samples collected from different biological effluent treatment plants.** *Journal of microbiological methods* 52, 315-323, 2003.

RENOU, S.; GIVAUDAN, J.G.; POULAIN, S.; DIRASSOUYAN, F.; MOULIN, P. **Landfill leachate treatment: review and opportunity.** *Journal of Hazard Materials* 150(2008)468–493. France, 2007.

ROCHA, D.C. **Pós-Tratamento de Lixiviado de Aterro Sanitário Consorciado com Esgoto Doméstico utilizando Biofiltro Aerado Submerso Multi Estágio - Avaliação da Etapa de Partida.** *Dissertação de mestrado.* Programa de Pós graduação em Engenharia civi. Unisinos, 2010.

RITTMANN, B. and McCARTY, P. **Environmental Biotechnology - Principles and Applications.** McGraw. Hill Series in Water Resources and Environmental Engineering. 2001.

ROTHAUWE, J.H.; WITZEL, K.P.; LIESACK, W. **The Ammonia Monooxygenase Structural Gene amoA as a Functional Marker: Molecular Fine-Scale Analysis of Natural Ammonia-Oxidizing Populations.** *Applied and Environmental Microbiology,* p. 4704–4712. Dec. 1997.

SAMBROOCK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual.** 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 2001.

SANZ, José L.; KÖCHLING, Thorsten. **Molecular biology techniques used in wastewater treatment: An overview.** Process Biochemistry, 42 (2007) 119-133. Spain, 2007.

SGHEZZO, Lucas; ZEEMAN, Grietje; VAN LIEL, Jules B.; HAMELERS, H.V.M.; LETTINGA, Gatze. **A review: the anaerobic treatment of sewage in uasb and egbs reactors.** PI1:S0960-8524(98)00046-7. 1998.

SILVA, A.C.; DEZOTTI, M.; SANT'ANNA JR.,G.L. **Treatment and detoxication of a sanitary landfill leachate.** Chemosphere 55 (2004) 207–214. Brazil, 2004.

STOODLEY, P.; SAUER, K.; DAVIES, D.G.; COSTERTON, J.W. **Biofilms as complex differentiated communities.** Annual Review of Microbiology. 56, 187-209, 2002.

VON SPERLING, Marcos. **Lodos Ativados.** Ed. DESA-UFMG. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, UFMG. Belo Horizonte, 416p., 1997.

VON SPERLING, Marcos. **Princípios básicos do tratamento de esgotos.** Ed. DESA-UFMG. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, UFMG. Belo Horizonte, 211p. 1996.

WEAGANT, S.D.; FENG, P.C.H. **Comparative analysis of a modified rapid presence/absence test and the standard MPN method for detecting Escherichia coli in orange juice.** Food Microbiology, 19, 111-115, 2002.

YOO, Hyungseok; AHN, Kyu-Hong; LEE, Hyung-Jib; LEE, Kwang-Hwan; KWAK, Youn-Jung; SONG, Kyung-Guen. **Nitrogen removal from synthetic wastewater by simultaneous nitrification and denitrification (SDN) via nitrite in an intermittently-aerated reactor.** Water resource, 33, (1), 145-154. 1999.

APÊNDICES

Apêndice A – Protocolo de Extração mecânica de DNA (modificado de Sanbroock, 2001)

- 1- Transferir 50 mL da amostra para tubos de centrifugação e centrifugar à 3.500 rotações por minuto (RPM) por 10 min, remover o sobrenadante;
- 2- Adicionar 900 µL de tampão Tris EDTA Ácido Bórico (TEB);
- 3- Pesar 0,2 g de pérolas de vidro de 0,02mg em um tubo de rosca de 2mL;
- 4- Colocar a amostra dentro do tubo contendo as pérolas de vidro;
- 5- Levantar o tubo a um microdesmembrador e agitar a 4.000 RPM por 1 minuto, transferir o tubo para um banho de gelo e manter por 1 min. Repetir a operação;
- 6- Deixar a amostra sedimentar por 5 min em temperatura ambiente. Transferir todo o sobrenadante para um novo tubo de centrifugação;
- 7- Adicionar 1 volume (mesmo volume de sobrenadante) de Fenol tamponado (pH 8,0) e agitar em vórtex por 40 segundos;
- 8- Adicionar 1 volume de clorofórmio-álcool-isoamílico (24:1) e agitar novamente;
- 9- Centrifugar a 13.000 rpm por 10 min e transferir o sobrenadante para um novo tubo de centrifugação;
- 10-Adicionar 1 volume de clorofórmio-álcool-isoamílico, agitar em vórtex e centrifugar a 13.000 rpm por 10 min;
- 11-Transferir todo o sobrenadante para um novo tubo de centrifugação. Adicionar 0,1 volume de uma solução de acetato de sódio 3M (pH 5,2) e 2 volumes de etanol 100% gelado;
- 12-Manter o frasco à -20°C por, no mínimo 2h, ou *overnight* (a noite toda) para precipitação do DNA;
- 13-Centrifugar a 13.000 RPM por 20 min e descartar o sobrenadante;
- 14-Adicionar 300 µL de etanol 70%, centrifugar a 13.000 RPM por 10 min e descartar o sobrenadante;

- 15-Verter o tubo sobre um papel toalha e deixar o DNA secar por aproximadamente 30 min;
- 16-Ressuspender o DNA em 50 μ L de água ultra-pura estéril, previamente aquecida a 70°C;
- 17-Aplicar o DNA em gel de agarose para verificação em eletroforese.

OBS: A adição de 1 volume de reagente corresponde sempre ao volume medido nas alíquotas sobrenadantes anteriores em cada passo do protocolo.

Apêndice B – Protocolo de extração química de DNA (modificado de Doyle, 1990)

- 01-Precipitar 1,5 – 3,0 mL de amostra
- 02-Transferir para tubos de centrifugação de 2mL adicionando 700 μ L de tampão de extração
- 03-Agitar no vortex e deixar por 30 minutos à 65°C num Banho-Maria homogeneizando suavemente a cada 10 minutos
- 04-Adicionar 650 μ L de Clorofórmio-álcool-isoamílico (CIA) homogeneizando até formar uma emulsão
- 05-Centrifugar à 12000 – 15000 rpm durante 7 minutos e transferir a fase aquosa para o novo tubo
- 06-Adicionar 650 μ L de fenol, homogeneizar até formar uma emulsão e centrifugar à 12000 – 15000 rpm durante 7 minutos
- 07-Transferir 750 μ L da fase aquosa para um novo tubo de centrifugação adicionando 200 μ L de tampão de extração sem Proteinase K
- 08-Homogeneizar adicionando 650 μ L de CIA e homogeneizar novamente centrifugando à 12000 – 15000 rpm durante 7 minutos
- 09-Transferir a fase aquosa para outro tubo, adicionando 650 μ L de CIA, centrifugando à 12000 – 15000 rpm durante 7 minutos (repetir mais 2 vezes se for preciso – até que a amostra esteja limpa)
- 10-Precipitar DNA com 1 volume (mesmo volume da amostra presente no novo tubo) de isopropanol à temperatura ambiente, homogeneizar (20 vezes) centrifugando à 12000 – 15000 rpm durante 7 minutos
- 11-Lavar superfície do precipitado 1 vez com 250 μ L de etanol 70% (preparado um pouco antes do uso) centrifugando por 2 minutos
- 12-Secar o precipitado deixando-o sobre o balcão por 30 minutos
- 13-Ressuspender em 40 μ L de Tris – RNase e deixar em banho-maria à 37°C por 30 minutos
- 14-Utilizar 5 μ L da amostra para aplicar em gel de agarose para verificação em eletroforese.

Apêndice C – Protocolo da quantificação de bactérias nitrificantes pela técnica do número mais provável (NMP) – (modificado de Araújo, 2009)

Preparo da amostra:

- Uma alíquota de 10 ml da amostra de biofilme deve ser macerada em frasco contendo 5 g de pérolas de vidro, sendo homogeneizado em agitador magnético por 20 minutos. Este preparo é feito para permitir a quebra de flocos.

Água de diluição:

- Misturar 1mL da solução de K_2HPO_4 0,2M com 0,25 mL da solução de KH_2PO_4 0,2M e completar o volume para 250 mL com água Mili-Q.
- Adicionar 9,0 mL de água de diluição nos tubos de ensaio e tampar com rolhas de algodão envoltos em gaze.
- Esterilizar os tubos, em autoclave, por 20 minutos sob pressão de 1 atm e temperatura de 120°C.
- Sob ambiente de assepsia (próximo ao bico de Bunsen), realizar as diluições necessárias, seguindo o procedimento:

Diluição Seriada:

- Adicionar 1,0 mL de amostra em um dos tubos de ensaio com água de diluição (9,0 mL), obtendo a diluição 10^{-1} . Cada diluição é feita em quintuplicata (portanto, são 5 tubos 10^{-1} , 5 tubos 10^{-2} e assim sucessivamente).
- Após a homogeneização do tubo com a diluição 10^{-1} , retira-se 1,0 mL, adicionando a outro tubo contendo água de diluição, obtendo a diluição 10^{-2} .
- Esse procedimento deverá ser seguido até obter-se todas as diluições desejadas.

Metodologia para Número Mais Provável (NMP) de bactérias nitrificantes

Número mais provável de *Nitrosomonas*

Meio de Cultura Amônia-carbonato de cálcio para *Nitrosomonas*

Reagente	Quantidade
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,302 g
K_2HPO_4	1,0 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,03 g
NaCl	0,3 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,3 g
CaCO_3	3,33 g

Preparo:

- Todos os reagentes citados devem ser dissolvidos em 1000 mL de água
- Desta solução são transferidos 3mL para cada tubo de ensaio, sendo utilizados 5 tubos para cada diluição.
- Os tubos devem ser tampados com rolha de algodão envolto com gaze.
- Esterilizar dos tubos, em autoclave, por 15 minutos sob pressão de 1 atm e temperatura de 120°C.

Reagente de Griess-Ilosvay

Reagente	Quantidade
$\text{C}_6\text{H}_7\text{NO}_3\text{S}$ (ácido sulfanílico)	0,6 g
HCl concentrado	21mL
alfa-naftalamina	0,6 g
$\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	16,4 g

Preparo:

- Dissolver o ácido sulfanílico em 70mL de água destilada quente. Após resfriar a solução deve ser adicionado 20mL de HCl concentrado, diluindo a seguir a mistura para 100mL com água destilada e misturando bem.
- Dissolve-se a alfa-naftalamina em 10 a 20mL de água contendo 1mL de HCl concentrado, diluindo em seguida para 100mL com água.
- Dissolver o $\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ em água e completado o volume da solução para 100mL com água.
- As soluções devem ser acondicionadas em vidros escuros, separadamente, e estocadas sob refrigeração.

Reagente de nitrato:

Reagente	Quantidade
$[(\text{C}_6\text{H}_5)_2\text{NH}]$ (Difenilamina)	50 mg
H_2SO_4 concentrado	25mL

Preparo:

- Dissolver a difenilamina em H_2SO_4 concentrado.
- A solução deverá ser armazenada em frascos protegidos da luz por no máximo 14 dias, sob refrigeração.

Preparação dos Brancos:

- Serão feitos brancos com água destilada.

Procedimento analítico:

- Preparar as diluições em série transferindo alíquotas de 1mL para cada um dos cinco tubos contendo meio estéril em ambiente de assepsia, a partir da mais alta diluição preparada. Esse mesmo procedimento foi repetido para as outras quatro diluições mais baixas.
- Os tubos inoculados são incubados por 3 semanas a 28°C , juntamente com uma seqüência de tubos não inoculados (brancos), utilizados como controle.

- Após o período de incubação, deverá ser realizado o teste para nitrito, em cada tubo, usando o reagente de Griess-Ilosvay.
- Primeiramente, mistura-se partes iguais dos três reagentes e, então, adiciona-se três gotas da mistura na cultura a ser testada. Se ocorrer, em poucos minutos, o aparecimento de uma cor vermelho-púrpura, há indicativo da presença de nitrito, sendo o teste, portanto, positivo.
- Para os tubos que não apresentarem resultado positivo, será feito o teste para nitrato, adicionando uma gota do reagente de difenilamina.
- Se ocorrer desenvolvimento de uma cor azul o teste será considerado positivo para *Nitrosomonas*, significando que o nitrito produzido pelas *Nitrosomonas* terá sido convertido pelas *Nitrobacter* em nitrato.
- Caso ocorrer teste positivo para nitrito ou nitrato nos tubos controle (brancos), significa a ocorrência de alguma contaminação e o resultado obtido deverá ser desprezado.

Leitura das amostras

- A leitura das amostras segue a seguinte regra: será positivo a amostra que apresentar cor vermelho-púrpura, após a adição do reagente de Griess-Ilosvay, pois isso indica a presença de nitrito.
- De acordo com o número de positivos nas cinco repetições de cada diluição deve-se consultar a tabela encontrando o valor de NMP/ml de amostra inoculada.
- O valor encontrado na tabela deve ser multiplicado pelo inverso da diluição média.

Número mais provável de *Nitrobacter*

Meio Nitrito-carbonato de cálcio para *Nitrobacter*

Reagente	Quantidade (g)
KNO ₂	0,006
K ₂ HPO ₄	1,0
NaCl	0,3

MgSO ₄ .7H ₂ O	0,1
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,03
CaCO ₃	1,0
CaCl ₂	0,3

Preparo:

- Todos os reagentes citados devem ser dissolvidos em 1000mL de água.
- Desta solução são transferidos 3mL em cada tubo de ensaio, sendo utilizados 5 tubos para cada diluição.
- Os tubos devem ser tampados com rolha de algodão envolto com gaze.
- Deverá ser feita a esterilização dos tubos, em autoclave, por 15 minutos sob pressão de 1 atm e temperatura de 120°C.

Reagente Griess-Ilosvay

Reagente	Quantidade
C ₆ H ₇ NO ₃ S (ácido sulfanílico)	0,6 g
HCl concentrado	21mL
alfa-naftalamina	0,6 g
CH ₃ COONa.3H ₂ O	16,4 g

Preparo:

- Dissolver o ácido sulfanílico em 70mL de água destilada quente. Após resfriar a solução, deve ser adicionado 20mL de HCl concentrado, diluindo a seguir a mistura para 100mL com água destilada e misturando bem.
- Dissolve-se a alfa-naftalamina em 10 a 20mL de água contendo 1mL de HCl concentrado, diluindo em seguida para 100mL com água.
- Deve-se dissolver o CH₃COONa.3H₂O em água e completado o volume da solução para 100mL com água.
- As soluções foram acondicionadas em vidros escuros, separadamente, e estocadas sob refrigeração.

Preparação dos Brancos:

- Serão feitos brancos com água destilada.

Procedimento analítico:

- Foram preparadas as diluições em série transferindo alíquotas de 1mL para cada um dos cinco tubos contendo meio estéril (em ambiente de assepsia), a partir da mais alta diluição preparada. Este mesmo procedimento foi repetido para as outras quatro diluições mais baixas.
- Os tubos inoculados devem ser incubados por 3 semanas a 28°C, juntamente com uma seqüência de tubos não inoculados (brancos), utilizados como controle.
- No final do período de incubação, deve ser testado apenas nitrito usando o reagente de Griess Ilosvay.
- O teste será considerado positivo para *Nitrobacter* se o meio não desenvolver coloração avermelhada (coloração característica de nitrito) e negativo se apresentar coloração.

Leitura das amostras

- De acordo com o número de positivos nas cinco repetições de cada diluição deve-se consultar a tabela do Standard Methods (2005) encontrando o valor de NMP/ml de amostra inoculada.
- O valor encontrado na tabela deve ser multiplicado pelo inverso da diluição média.